

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

Caracterização de acessos e controle químico de *Paspalum virgatum* L.

Renata Thaysa da Silva Santos

Engenheira Agrônoma

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Caracterização de acessos e controle químico de *Paspalum virgatum* L.

Renata Thaysa da Silva Santos
Orientador: Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves
Co-Orientador: Prof. Dr. Mateus Mondin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

S237c Santos, Renata Thaysa da Silva
Caracterização de acessos e controle químico de *Paspalum virgatum* L. / Renata Thaysa da Silva Santos. -- Jaboticabal, 2021
115 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Pedro Luis da Costa Aguiar Alves
Coorientador: Mateus Mondin

1. Erva daninha. 2. Morfologia vegetal. 3. Herbicidas. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

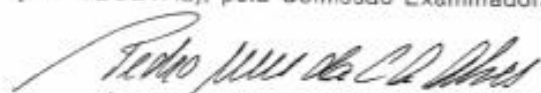
TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS E CONTROLE QUÍMICO DE *Paspalum virgatum* L.

AUTORA: RENATA THAYSA DA SILVA SANTOS

ORIENTADOR: PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES

COORIENTADOR: MATEUS MONDIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. GRISEL MARIOM FERNANDEZ CHILDS (Participação Virtual)
Facultad de Agronomía-Universidad de la República do Uruguay / Paysandu/Uruguay 

Prof. Dr. JOÃO MARTIM DE PORTUGAL E VASCONCELOS FERNANDES (Participação Virtual)
Instituto Politécnico de Beja(ESA-IPBeja) / Beja/Portugal 

Profa. Dra. VIVIANA CASTRO CEPERO (Participação Virtual)
Universidad Nacional Agraria La Molina / La Molina/Peru 

Pesquisadora Dra. JUCILEIA IRIAN DOS SANTOS WAGAFSUMA (Participação Virtual)
Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável-CDRS / Itapeva/SP 

Jaboticabal, 22 de abril de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RENATA THAYSA DA SILVA SANTOS – nascida em Jacundá, Pará, no dia 25 de julho de 1993, filha de Solange da Silva Santos e Valderon da Silva Santos. Coursou o Ensino Fundamental na Escola Municipal Rosália Correia e Ensino Médio na Escola Estadual Professora Maria da Glória Rodrigues Paixão, tendo finalizado no ano de 2009. Ingressou no Ensino Superior no ano de 2010 no curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Câmpus de Parauapebas, obtendo o título de Engenheira Agrônoma, em julho de 2015. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica, três anos como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e um ano como bolsista da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA), na área de manejo de plantas daninhas, sob orientação do Prof. Dr. Rafael Gomes Viana, sendo integrante do grupo Manejo Integrado de Plantas Daninhas na Amazônia (MIPDAM). Devido ao vínculo do grupo com a empresa VALE S. A., foram realizados trabalhos na área de entomologia e manejo de espécies exóticas na Floresta Nacional de Carajás (FLONA). Em agosto de 2015, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, no Programa de Produção Vegetal, com concentração na área de Tecnologia de Aplicação de Produtos Fitossanitários, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo da Costa Ferreira, sendo integrante do grupo Núcleo de Estudos e Desenvolvimento em Tecnologia de Aplicação (NEDTA), localizada no Departamento de Fitossanidade dessa instituição, com bolsa concedida pelo CNPq. Em agosto de 2017, iniciou o curso de doutorado em Agronomia, no Programa de Produção Vegetal, com concentração na área de Manejo de plantas daninhas, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves, sendo integrante do grupo Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA) com bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“[...] And in my hour of darkness

She is standing right in front of me

Speaking words of wisdom

Let it be

Let it be, let it be

Let it be, let it be

Whisper words of wisdom

Let it be [...]”

John Lennon e Paul McCartney.

Ao meu pai (*in memorian*), que se foi sem que eu pudesse dar meu último adeus!! À minha mãe, que sempre foi exemplo de força, disciplina e dedicação! À minha irmã, sempre ao meu lado, fornecendo toda a força e amor necessário para que eu conseguisse superar todos os obstáculos.

Dedico

À todas as pessoas que passaram pela minha vida e deixaram grandes ensinamentos.

Obrigada!

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao senhor Deus, que guiou os meus passos e as decisões que tomei durante essa caminhada, e nos piores momentos me sustentou para que eu continuasse firme.

À minha mãe e à minha irmã, que são exemplos de mulheres guerreiras, fortes e de extrema inteligência; sem o apoio e dedicação de vocês, eu jamais finalizaria essa etapa da minha vida. Ao meu pai, que não poderá ver a sua caçula finalizar o doutoramento, mas que devido aos seus cuidados, incentivos e ensinamentos, me fizeram ser quem eu sou hoje; serei eternamente grata ao senhor! E a todos os familiares pela união e apoio, que infelizmente foi evidente devido a perda de duas pessoas tão importante para o nosso ceio familiar no doloroso ano de 2020.

À Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), na figura do coordenador do Programa, Prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas no início do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas (Número dos projetos: 2018/06172-1 e 2019/06378-1) e oportunidade de realizar um estágio de pesquisa no exterior.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves, pelos ensinamentos, solidariedade, compreensão e humanidade nos momentos de imensa tristeza durante a minha caminhada, a sua tranquilidade, paciência e conselhos, que foram tão importantes para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada!

Ao meu coorientador, Dr. Mateus Mondin, por ter acreditado no projeto, auxiliando e ensinando com paciência os assuntos relacionados à genética, e a todos os integrantes do grupo Cyngela que me receberam e ajudaram durante esse período, especialmente ao Gabriel Silva. O meu supervisor de estágio BEPE, Dr. Esteban Fernando Rios e Dra. Yolanda Lopez, que receberam em seu grupo de pesquisa na Universidade da Flórida, período este que foi de enorme aprendizado e expansão mental.

Aos professores: Dr. Eduardo C. Gasparino, Dr. Wellington Clarindo, Dr. Marcelo C. Ferreira, Dr^a. Priscila L. Gratão, Dr. Vitor F. O. Miranda e Dr. Fernando J. Zara, que disponibilizaram seus laboratórios e equipe para nos auxiliar no desenvolvimento nesse projeto.

A todos que me acolheram e conviveram comigo durante o intercâmbio, no qual tive a oportunidade de conviver com profissionais exemplares, em especial, à Mariana Neves, Cleber Souza, Gisele Assis, Antônio Porto, Raquel Ruaro e Flávia Souza.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial ao José V. F. Martins, pela disposição em ensinar. Agradeço muito por ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender com você.

Ao grupo de pesquisa LAPDA, em especial às pessoas que contribuíram durante os anos de doutoramento: Mariluce Nepomuceno, Neriane Hijano, Willians Carrega, Isa Marcela, Izabela Orzari, Allan Bacha, Josiel Soares, José Davi Felipe, Laura Gregghi, Ebson Silva e Miguel Frago. À Aline Brufato, pela oportunidade que tive em coorientá-la, podendo conviver com um ser tão dedicado a tudo que faz, sendo um exemplo a todos que estão a sua volta. Muito obrigada Aline por tudo que você contribuiu nesse projeto, pelos seus ensinamentos e pela sua amizade.

Obrigada, mais que especial, para Juliana Souza, Jaqueline Della Vechia e Andreísa Flores, pelo companheirismo durante esse período, compartilhando momentos de alegrias e tristezas. Obrigada por todo incentivo durante esse período. A alegria e leveza de vocês contribuíram para que os meus dias fossem mais leves. Admiro muito vocês.

À empresa Sumitomo Chemical pelo apoio dado ao desenvolvimento desse projeto.

A todo o corpo docente e de servidores da FCAV-UNESP que fizeram parte da minha formação.

À todas as pessoas que conheci durante o doutorado que não foram citadas, mas que tanto me ensinaram.

Muito obrigada!

Sumário

Capítulo 1- Considerações gerais	12
1. Introdução	12
2. Revisão de literatura	14
2.1 Pastagem e as Plantas daninhas	14
2.2 Espécie <i>Paspalum virgatum</i> L.....	16
2.3 A importância de caracterização morfoanatômica e estudo genético das plantas daninhas	18
2.4 Controle químico como estratégia de manejo	20
3. Referências.....	22
Chapter 2- Ploidy determination and herbicide effectiveness in <i>Paspalum urvillei</i> Steud	29
1. Introduction	29
2. Material and Methods	31
3. Results.....	34
4. Discussion	39
5. Conclusion	43
6. References	43
Capítulo 3- Caracterização morfoanatômica e genética de acessos de <i>Paspalum virgatum</i> L.....	48
1. Introdução.....	49
2. Material e métodos	51
3. Resultados.....	58
4. Discussão	78
5. Conclusão.....	83
6. Referências.....	83
Capítulo 4- Aplicação sequencial de herbicidas em acessos de <i>Paspalum virgatum</i> L.	88
1. Introdução.....	89
2. Material e métodos	91
3. Resultados.....	94
4. Discussão	105
5. Conclusão.....	109
6. Referências.....	109
Capítulo 5- Considerações finais	114
Anexo	115

Caracterização de acessos e o controle de *Paspalum virgatum* L.

Resumo

O capim-navalha (*Paspalum virgatum* L.) é um importante planta daninha em áreas agropecuárias no Brasil e no mundo. Por pertencer a família Poaceae, apresenta similariedade botânica com espécies utilizadas para alimentação animal, sendo este fato um desafio no manejo da espécie. Durante a década de 80, houve um volume significativo de trabalhos de pesquisa com a espécie, mas depois poucos trabalhos foram realizados. Porém, nos últimos anos, devido ao prejuízo econômico causado pela presença da planta na área destinada ao pasto, tornou-se evidente a necessidade de mais conhecimento sobre a espécie, principalmente para elaboração de estratégias de manejo eficientes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo a caracterização de quatro acessos desta espécie a nível morfológico, anatômico e genético e relacionando-os com o controle químico. Para tanto, o trabalho foi dividido em três capítulos, o primeiro destinado ao estudo de nível de ploidia e controle químico de duas populações de *Paspalum urvillei* Steud, considerado por alguns taxonomistas sinonímia do *P. virgatum*. O segundo capítulo, o estudo de caracterização morfológica, anatômica e genética das quatro populações de *P. virgatum*. E o terceiro capítulo, o estudo sobre a eficácia da aplicação sequencial de herbicidas no manejo dos acessos. Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível compreender as diferenças entre os acessos, como, por exemplo tamanho da lâmina foliar e quantidade de DNA satélite, e a interferência na resposta da planta a aplicação de herbicida.

Palavras-chave: Capim-navalha, citometria de fluxo, DNA repetitivo, glyphosate, imazetapir, pastagem.

Characterization of accessions and control of *Paspalum virgatum* L.

Abstract

Talquezal (*Paspalum virgatum* L.) is an important weed in agricultural areas in Brazil and worldwide. Because it belongs to the Poaceae family, it has botanical similarity with species used for animal feed, which is a challenge in the management of the species. During the 1980s, there was a significant volume of research work with the species, but afterward few studies were carried out. However, in recent years, due to the economic damage caused by the presence of the plant in the area destined to pasture, the need for more knowledge about the species has become evident, mainly for the elaboration of efficient management strategies. Therefore, this work aimed to characterize four accessions of this species at the morphological, anatomical, and genetic level and relating them to chemical control. For this purpose, the work was divided into three chapters, the first dedicated to the study of ploidy level and chemical control of two populations of *Paspalum urvillei* Steud, considered by some taxonomists to be synonymous with *P. virgatum*. The second chapter, the study of morphological, anatomical and genetic characterization of the four populations of *P. virgatum*. And the third chapter, the study on the effectiveness of the sequential application of herbicides in the management of accessions. With the results obtained in these studies, it was possible to understand the differences between accessions, for example leaf blade size and amount of satellite DNA, and interference in plant response to herbicide application.

Keyword: Talquezal, flow cytometry, repetitive DNA, glyphosate, imazetapyr, pasture.

Capítulo 1- Considerações gerais

1. Introdução

As áreas de pastagem apresentam grande importância na produção pecuária em todo mundo, pois é o alimento principal para o rebanho bovino. No entanto, uma grande parte desse pasto encontra-se em algum estágio de degradação, sendo um dos fatores a presença de plantas daninhas. As plantas daninhas são espécies que ocupam áreas de interesse agropecuários, causando prejuízos econômicos e podendo ser hospedeiras de pragas e doenças (Costa et al., 2008; Tuffi Santos et al., 2004; Pitelli, 1987). Em estudos fitossociológicos realizados em áreas de pastagem, as famílias mais frequentes são as Fabaceae, Malvaceae e as Poaceae (Inoue et al., 2012; Tuffi-Santos et al., 2004).

Dentro da família Poaceae, o gênero que apresenta maior número de espécies é o *Paspalum*, sendo um dos gêneros mais difíceis para as áreas de pastagem no Brasil e no Mundo (Maciel et al., 2009). Galvão et al. (2011) relataram a presença de *Paspalum fasciculatum* Willd. ex Flugge em pastagens de várzea no município de Autazes, estado do Amazonas. Andrade et al. (2012) relataram a dificuldade de controle do capim-navalha (*Paspalum virgatum* L.) em pastagem no estado do Acre, mas essa espécie ocorre em todo território nacional.

O capim-navalha é uma planta daninha importante para o setor pecuário e, como alternativa no manejo dessa espécie, tem sido utilizada a aplicação de herbicidas. Porém, devido à similaridade botânica com as espécies forrageiras, a escolha do herbicida para o controle torna-se difícil. Além disso, a eficiência no controle químico das plantas daninhas depende de outros fatores, como o índice de infestação e o estágio de desenvolvimento das plantas, visto que plantas entouceiradas podem apresentar menor porcentagem de controle (Goulart et al., 2012).

A escolha adequada do herbicida também é importante para o controle eficiente. Marchioretto e Dal Magro (2017) verificaram que a aplicação de cletodim e imazethapyr controlou *Digitaria* spp., sendo essa da mesma família de *P. virgatum*. Braz et al. (2016) recomendaram a aplicação de imazethapyr em pós emergência para o manejo das plantas daninhas. Aliás, esses herbicidas são recomendados para o controle de diversas espécies de plantas monocotiledôneas.

A dificuldade de controle do *P. Virgatum*, pode estar relacionado também com os fatores intrínsecos da planta, como a anatomia e a morfologia, e por fatores genéticos.

Devido a aplicação de herbicidas, as plantas com maior capacidade de tolerância são selecionadas. Por isso, é importante para a elaboração de estratégias de manejo o conhecimento sobre as características intrínsecas das plantas alvo. Alves et al. (2003) avaliaram acessos da espécie capim-camalote (*Rottboellia cochinchinensis* L.) de várias localidades e constataram diferenças anatômicas e genéticas entre eles, como, por exemplo, a poliploidia, que poderiam justificar a diferença na eficácia de controle químico desses acessos. Além disso, essas diferenças podem corroborar na seleção de biótipos resistentes, visto que a natureza da poliploidia pode ser um processo na evolução da planta, acarretando o surgimento de possíveis mecanismos para a resistência aos herbicidas. Portanto, essa ferramenta pode auxiliar na identificação dos acessos e, direcionar para estratégias de controle eficazes.

A caracterização morfoanatômica de diversos acessos de *P. virgatum* poderá descrever particularidades de interesse, como o número de folhas, área e ângulo foliar, espessura da cutícula, números de tricomas, dentre outros, que estão diretamente relacionados a eficácia de herbicidas aplicados em pós-emergência. A partir das características da planta e com o uso de metodologias estatísticas é possível analisar a diversidade genética dos diferentes acessos e avaliar seu potencial de uso e perpetuação em uma área (Marin et al., 2009). Dessa forma, tem-se como hipótese que acessos de *P. virgatum* oriundos de diferentes localidades do Brasil possuem características morfológicas, anatômicas e genéticas distintas que poderão estar correlacionadas com a eficácia de seu controle químico.

1.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar os acessos de capim-navalha (*Paspalum virgatum* L.) oriundos de diferentes localidades, e relacionar as características morfológicas, anatômicas e genéticas destes acessos com a eficácia de herbicidas para o controle em pós-emergência.

1.2 Objetivos específicos

- Estudar o nível de ploidia e o controle químico de duas populações de *Paspalum urvillei* Steud exposto a prática de manejo diferente, na Flórida, Estados Unidos da América.

- Identificar e caracterizar a morfologia, anatomia e genética dos quatro acessos de *Paspalum virgatum* L. oriundos de diferentes localidades do Brasil.
- Avaliar a eficácia da aplicação sequencial de herbicidas com mecanismo de ação ALS, ACCase e EPSPS nos quatro acessos de *P. virgatum*.

2 Revisão de literatura

2.1 Pastagem e as Plantas daninhas

A pastagem, para setor pecuário, é de extrema importância, uma vez que é responsável por fornecer alimento para os animais. Estima-se que 95% da carne bovina no mundo seja oriunda de produções a pasto e, além disso, exerce um papel social, pois ao prover alimento para os animais, conseqüentemente promove alimento para sociedade, renda, emprego e dentre outros benefícios (Thorntona e Herrero, 2010; Pastagem.org, 2020; Parente et al., 2019).

No Brasil, estima-se que haja 182 milhões de hectares destinados a pastagem (Pastagem.org, 2020), sendo que 15,5 milhões de hectares encontram-se em algum estágio de degradação (ABIEC, 2020). Porém, incluindo a pecuária leiteira, estima-se que sejam 99 milhões de hectares com indícios de degradação, ou seja, 11,68% das pastagens no Brasil (Pastagem.org, 2020).

A degradação de pastagens é resultado de vários fatores entre eles, o preparo incorreto do solo, na escolha inadequada da forrageira para a região, superpastejo, a não reposição de nutrientes e a presença de plantas daninhas, dentre outros (Carvalho et al., 2017; Dias-filho, 2006; Volpe et al., 2008; Tuffi-Santos, 2004).

As plantas daninhas são plantas indesejáveis à atividade humana, ou seja, causam prejuízos econômicos. Podem ser plantas que ocorrem fora da área de distribuição geográfica ou com população acima do esperado, e outros termos podem ser usados para designar estas plantas, como plantas invasoras ou infestantes (Pitelli, 2015).

Essas plantas podem causar efeito adversos nas plantas forrageiras, interferindo na produção de biomassa, crescimento e desenvolvimento, causando enormes prejuízos a capacidade de suporte das forrageiras, dada a competição por luz, nutrientes e água, que quase sempre é vantajosa para as plantas daninhas, devido sua agressividade e adaptabilidade a ambientes poucos favoráveis (Hijano et al., 2021; Al-Tawaha et al., 2008).

Embora seja amplamente difundido o conhecimento sobre os danos que as plantas daninhas podem ocasionar no pasto, ainda é pouco realizado o manejo adequado das espécies. Para o manejo de plantas daninhas existem diversos métodos que podem ser utilizados, como o cultural, biológico, mecânico e químico, sendo que a integração dos métodos é a recomendada. O manejo integrado das plantas daninhas consiste na união de métodos de controle de modo a promover para a cultura uma vantagem sobre as plantas daninhas. Porém, em alguns lugares, o pasto encontra-se em áreas com declive acentuado ou mesmo devido ao tamanho da área, opta-se em utilizar um único método de controle, geralmente, o controle químico (Pitelli, 1987; Al-Tawaha et al., 2008; Costa et al., 2018; Harker e O'Donovan, 2013).

Estima-se que em 2019 que o gasto médio com agrotóxicos, fertilizantes e sementes foi entorno de R\$ 12.335,5 milhões, sendo a menor fração destinada a compra de agrotóxicos (ABIEC, 2020). Porém, é importante ressaltar que o uso de agrotóxicos, especialmente, herbicidas, precisam ser realizados corretamente, para que seja possível a continuação da eficiência do controle químico. Portanto, ainda se faz necessárias mais pesquisas sobre o controle de plantas daninhas em áreas destinadas a pastagem, tanto no que envolve a biologia das plantas como os custos econômicos na adoção de cada método.

2.2 Espécie *Paspalum virgatum* L.

A família Poaceae, conhecida também como Gramineae, possui cerca de 720 gêneros, distribuídos em cinco subfamílias: Pooideae, Bambusoideae, Arundinoideae, Chloridoideae e Panicoideae. Conta com aproximadamente 11.500 espécies, sendo essa família de extrema importância ecológica e agrônômica; além disso, é também uma das famílias com maior expressividade evolutiva (Watson, Clifford e Dallwitz, 1985; Hodkinson, 2018).

Dentro da família, o gênero *Paspalum* se destaca com aproximadamente 400 espécies distribuídas em todas as regiões tropical e subtropical do mundo (Oliveira e Valls, 2002; Maciel, Oliveira e Alves, 2009). É um dos principais gêneros de gramíneas nativas presente em pastagens naturais, pois, reúne o maior número de espécies que apresentam um bom valor forrageiro (Baréa, Scheffer-Basso e Favero, 2006). Uma das mais importantes espécies com valor econômico pertencentes ao gênero, é o *Paspalum notatum* Flugge, que conhecida popularmente como grama-batatais ou grama-bahia. É uma espécie bastante utilizada na pecuária para formação de pasto,

e, por isso, apresenta mais pesquisas visando o melhoramento genético da espécie (Hirata, Kunieda e Tobisa, 2017).

Apesar da representatividade do gênero para a produção forrageira, outras espécies não apresentam cunho comercial, sendo consideradas em diversas situações plantas daninhas, por exemplo, *Paspalum conjugatum* P.J. Bergius, *Paspalum plicatulum* Michx., *Paspalum urvillei* Steud., *Paspalum virgatum* L e *Paspalum fasciculatum* Willd. ex. Fluegge (Brosnan et al., 2009; Headford, 1966; Ferri, Eltz e Lopes, 2001; Jeffries, Gannon e Yelverton, 2017; Ramirez, Munoz e Edouarzin, 1990; Camacho, Argel e Doll, 1974; Fernandez e Ortiz, 1995).

Atualmente, a espécie *Paspalum virgatum* L. tornou-se um importante para o setor pecuário, não pelo seu viés forrageiro, mas por causar do enorme prejuízo econômico ao setor ao redor do mundo. *Paspalum virgatum* é conhecido popularmente no Brasil como capim-navalha, em Cuba como Caguete, nos Estados Unidos da América como Talquezal, na Costa Rica como Zacaton, nas Antilhas como Razorgrass, dentre outros. A planta apresenta distribuição na América do Central, Norte e Sul, sendo nativa em alguns países, como é o caso do Brasil, mas introduzidas em outros países como é o caso da Austrália (Figura 1) (Rojas-Sandoval, 2018; Chase, 1929; Báez, Zamora-Crescencio e Villegas, 2016).

A espécie é uma gramínea perene considerada planta daninha de difícil controle, podendo chegar até 2 metros de altura; apresenta folhas largas e com estruturas cortantes ao redor do limbo foliar; é uma gramínea cespitosa e rizomatosa, podendo se reproduzir por sementes ou rizomas, sendo que a dispersão geralmente por zoocoria. A inflorescência é formada por uma panícula de coloração castanhada com até 12 cm de comprimento e com a produção de 1500 sementes (Chase 1929; Rojas-Sandoval, 2018; Dias-Filho, 1990; Sistachs e León, 1987). Para alguns taxonomistas *P. virgatum* L. é sinonímia de *Paspalum urvillei* Steud., ou seja, para alguns pesquisadores *Paspalum virgatum* var. *parviflorum* Doll é o *Paspalum urvillei* Steud. (Jeffries, Gannon e Yelverton, 2017; Lorenzi, 2008).

Paspalum virgatum L. possui alta agressividade mesmo em condições não favoráveis, como fácil adaptação a solos com baixa fertilidade; além disso, possui atividade alelopática, que auxilia a planta no processo competitivo (Silva et al., 2020; Marques et al., 2019).

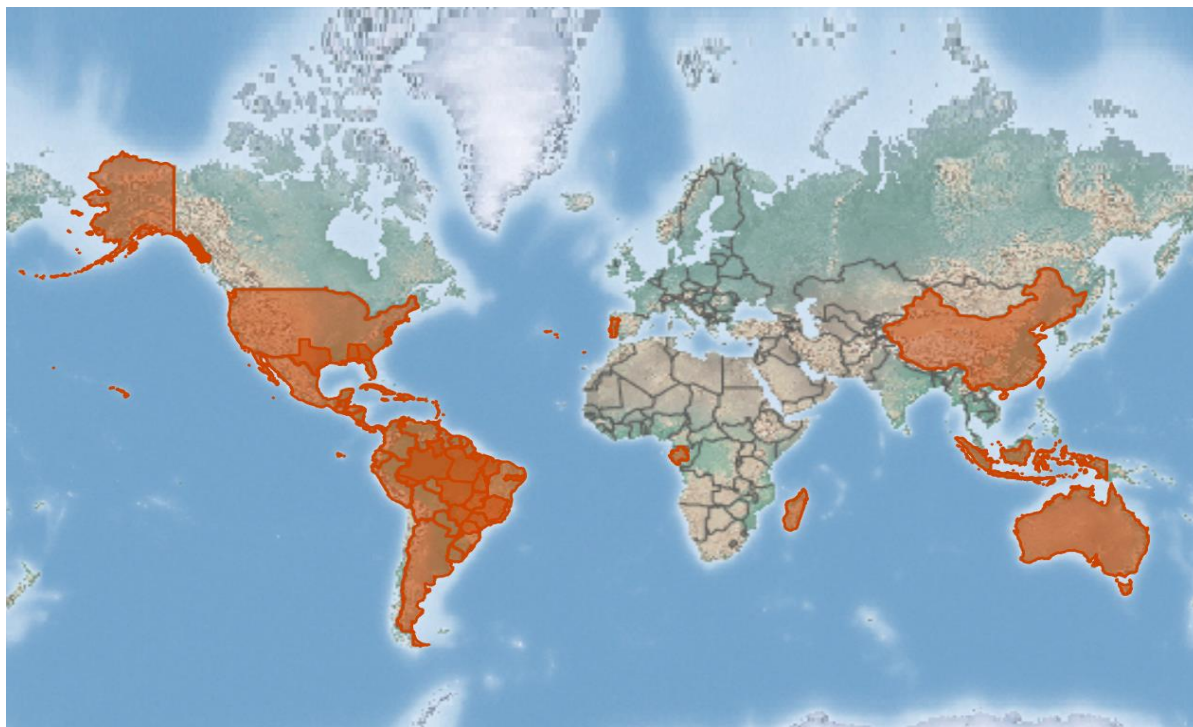


Figura 1. Distribuição geográfica da espécie *Paspalum virgatum* L. ao redor do mundo. Fonte: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109622>.

Apesar das diferenças na nomenclatura da espécie, de modo geral, a comunidade científica aceita que são espécies diferentes. Um importante fator é que a planta apresenta distribuição em quase todos os continentes e, portanto, tornou-se um problema global para setor pecuário. A dificuldade de controle se deve a alta adaptabilidade da espécie, alta produção de sementes por planta e, o mais importante, a semelhança botânica com as espécies forrageiras, semelhanças botânicas, fisiológicas e bioquímicas. As pesquisas com espécie foram frequentes na década de 80 e 90, principalmente no intuito de utilizá-la em cruzamentos para melhoramento genético das forrageiras. Depois, as pesquisas envolvendo essa espécie foram sendo reduzidas gradativamente, especialmente na área de planta daninha, mas nos últimos anos a pesquisa voltou a estudá-la, devido ao aumento da sua abundância em áreas de pastagens (Burson e Quarín, 1982; Sistachs, Fernandez e León, 1982; Sistachs e León, 1987; Andrade et al., 2012; Marchi et al., 2020; Silva et al., 2020; Takeshida et al., 2018).

2.3 A importância de caracterização morfoanatômica e estudo genético das plantas daninhas

A morfologia e anatomia vegetal são ciências especializadas no estudo das estruturas, sendo consideradas estruturas, as raízes, folhas, caule, flores e frutos. Na anatomia ocorre o estudo das células e dos tecidos, ou seja, são ciências complementares e, devido a isso, essas duas ciências são tão importantes na identificação de espécies e averiguação das diferenças dentro da própria espécie (Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro, 2006; Taiz e Zeiger, 2012).

Assim, a caracterização morfológica e anatômica fornece informações importantes sobre uma planta para qualquer finalidade de estudo, seja para identificação de espécies, melhoramento genético, propagação e manejo. Essa ferramenta auxilia na correta identificação da espécie, determinação de estágio fenológico, entre outros. Para Grisi et al. (2011) os caracteres morfoanatômicos são bastante úteis para descrição da espécie, especialmente para avaliar o grau de adaptação de uma planta a determinados ambientes, sendo possível avaliar a plasticidade anatômica por meio da interferência ambiental.

Para a ciência das plantas daninhas, a caracterização morfológica e anatômica é importante para elaboração correta do manejo. Essa é uma importante ferramenta, especialmente em casos de plantas que apresentam resistências aos herbicidas. Machado et al. (2008) relataram que o estudo da folha, colmo e rizoma da espécie *Digitaria insularis* L. permitiu relacionar com a tolerância da planta ao herbicida glyphosate.

Portanto, o estudo morfológico é imprescindível para estudo de gramíneas tropicais e subtropicais, principalmente para gramíneas que são nativas, e, por isso, muitas vezes são pouco estudadas. O conhecimento sobre as características da planta, como fenologia, tamanho do limbo foliar, persistência da planta em uma área dentre outros, pode permitir que técnicas de manejo sejam adotadas (Costa e Scheffer- Basso, 2003).

Outra ferramenta utilizada para caracterização das espécies é o estudo genético das plantas, sendo importante para o melhoramento genético. Porém, nos últimos anos, tem sido um instrumento de extrema relevância para a ciência das plantas daninhas, principalmente em estudos relacionados a resistência de plantas aos herbicidas, como por exemplo em estudos de resistência de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) ao glyphosate, na qual o uso contínuo acarretou na seleção de biótipos resistentes, em que a suscetibilidade ou não se deve as características morfológicas, anatômicas e genéticas das plantas (Ruchel et al., 2015).

Maroli et al. (2018) relataram o avanço no conhecimento da ciência das plantas daninhas após a adoção das técnicas genômicas, especialmente por compreender a hibridização e agressividade das espécies. Além disso, os autores enfatizam a necessidade dos profissionais da área em adotar as técnicas denominadas de “ômicas”, ou seja, incluir nas pesquisas análises metabolômicas, proteômicas e genômicas, uma vez que o uso das técnicas pode ajudar os cientistas a reduzirem as lacunas no conhecimento e compreensão sobre as características das plantas daninhas. Alves et al. (2003) também destacaram a importância da caracterização das plantas não apenas pela análise morfológicas, mas pela análise genética, ou seja, a determinação do nível de ploidia pode fornecer diferenças importantes para a resposta da planta a aplicação de herbicidas.

O sequenciamento de DNA (ácido desoxirribonucleico) contribui para o avanço no estudo evolutivo e adaptativo das gramíneas, fornecendo conhecimento para compreensão da fisiologia e ecologia das espécies. A identificação de alelos/genes que conferem resistência das plantas aos herbicidas, ou mesmo, a expressão fenotípica das plantas está relacionada com o nível de ploidia da espécie (Hodkinson, 2018; Franco et al., 2017; Rojano-Delgado et al., 2019; Gaines et al., 2020). A alta variabilidade genética e/ou diferentes posições de aminoácidos encontradas dentro de uma espécie permitem relacionar a diversos acontecimentos durante o processo evolutivo que acarretaram a adaptabilidade em uma determinada espécie a ambientes hostis (Torra et al., 2020). Vieira et al. (2007) estudaram acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e relataram uma enorme variabilidade genética determinadas por marcadores moleculares, e as diferenças observadas não estavam relacionadas a distribuição geográfica dos acessos.

As gramíneas apresentam uma grande variabilidade genética, sendo evidente no nível de ploidia das espécies, sendo este fato bastante explorado no melhoramento genético. Porém, é conhecido que o nível de ploidia também pode interferir no manejo das plantas daninhas. Para a espécie *Lolium multiflorum* Lam. foi relatado que plantas tetraplóides foram mais competitivas que as plantas diplóides (Schmitz et al., 2019). Burson e Quarín (1982) determinaram que *P. virgatum* apresenta $2n = 4x = 40$ cromossomos, ou seja, é uma espécie tetraplóide, podendo esse ser um fator que contribui para maior competitividade da espécie.

Há alguns anos atrás, o estudo do nível de ploidia de uma espécie demandava bastante tempo dos pesquisadores, principalmente quando trabalhava com uma

diversidade enorme de espécies, o que ocasionava a pouca utilização da técnica na ciência das plantas daninhas. No entanto, atualmente, a técnica de determinação por citometria de fluxo possibilitou maior uso pelos cientistas. A determinação do valor 2C de DNA permite substituir a contagem de cromossomos, especialmente em espécies que apresentam grande número, como é o caso do *P. virgatum*. Apesar da facilidade, rapidez e praticidade da técnica, a mesma apresenta uma desvantagem, o custo da análise por amostra (Schifino-Wittmann, 2001). Porém, é entendível que o manejo das plantas daninhas assertivo esteja diretamente relacionado com a caracterização dos acessos da espécie, especialmente o conhecimento acerca da variabilidade genética dentro da espécie.

2.4 Controle químico como estratégia de manejo

O controle químico das plantas daninhas é o método mais utilizado, principalmente em grandes áreas. Esse método consiste no uso de produtos químicos, denominados herbicidas. Os herbicidas causam modificações no metabolismo, que ocasionam danos no desenvolvimento e crescimento das plantas, podendo resultar na morte delas. Além do mais, é um método que permite rápidos resultados, ou seja, as plantas podem ser controladas antes ou depois da emergência.

Embora o uso constante de herbicidas possa causar uma pressão de seleção na comunidade de plantas, podendo resultar na resistência, é importante ressaltar que o surgimento dessas plantas resistentes está relacionado ao uso inadequado dos herbicidas, geralmente, em altas doses e/ou falta de rotação de herbicidas com mecanismos de ação diferentes. Por isso, o desafio do uso do controle químico é a determinação de qual molécula utilizar para o controle das plantas presentes na área, qual a dosagem que irá resultar em controle satisfatório, principalmente em pastos (Passini e Kranz, 1997).

Na literatura encontra-se diversos artigos científicos que estudam o controle químico das plantas daninhas em pastagens, porém, quase todos direcionados ao controle químico em plantas dicotiledôneas. Os principais herbicidas utilizados nas pesquisas são o 2,4-D, picloram, triclopir, ou seja, mimetizadores de auxina que controlam as plantas denominadas “folhas largas”; ou quando deseja realizar a aplicação localizada ou renovação do pasto utiliza-se o glifosato. Entretanto, a diversidade biológica encontrada em pastagens é enorme, em estudos

fitossociológicos é possível encontrar plantas de quase todas as famílias, Amaranthaceae, Asteraceae, Commelinaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Poaceae entre outras. O desafio do controle químico de plantas daninhas em pastagem é principalmente a escolha do herbicida que controla espécies da família Poaceae, e seja seletivo a forrageira (Gonzalez-Ibáñez 1984; Santos et al., 2006; Tuffi-Santos et al., 2004; Inoue et al., 2012; Galvão et al., 2011; Ferreira et al., 2014).

O melhoramento genético de forrageiras e leguminosas para pasto está nos últimos anos pesquisando e desenvolvendo plantas tolerantes ao herbicida. Bunnell et al. (2003) avaliaram que as cultivares de *Paspalum notatum* Flugge, pensacola, argentine, paraguaio e tifton-9 foram tolerante a aplicação do herbicida metsulfuron, permitindo serem utilizadas em pastagem. Outra linha de pesquisa está sendo a determinação de doses de herbicidas que controle a planta daninha sem causar danos permanentes nas forrageiras. Takeshita et al. (2018) estudaram o uso do herbicida atrazine para controle de *P. virgatum* em pastagens formadas por *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) e observaram que a dose de 500g ha⁻¹ de ingrediente ativo resultou no controle satisfatório da planta daninha, mas com o aumento da dose a forrageira apresentou danos significativos.

Portanto, para a determinação do herbicida e da dose inicialmente deve ser realizado um estudo fitossociológicos na área, para averiguar a diversidade da flora existente. Além disso, é importante acompanhar as condições climáticas e averiguar o equipamento adequado para aplicação dos produtos, pois em áreas com declive acentuado a pulverização com autopropelido não é recomendada, tornando-se a aplicação aérea uma alternativa viável (Pitelli, 1987; Carvalho et al., 2008; Carbonari et al., 2011). Aliás, é importante ressaltar que a união multidisciplinar (agronômos, biólogos, ecologistas etc.) auxiliará na melhor compreensão sobre as plantas daninhas e assim na elaboração de estratégias de manejo mais eficientes e menos impactantes ao meio (Busi et al., 2013).

3 Referências

ABIEC -Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil 2020. Disponível em <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020>>. Acesso em: 10 de janeiro. de 2021.

Alves, PLC., Bachega, MF., Moro, JR., Lemos, MVF., Alves, EC., Silva, MAS., Moro, FV. Identification and characterization of different accessions of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*). **Weed Science**, p. 177-180, 2003.

Andrade, CMS., Fontes, JRA., Oliveira, TK., Farinatti, LHE. Reforma de pastagens com alta infestação de capim-navalha (*Paspalum virgatum*). **Embrapa Acre-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2012.

Báez, CG., Zamora-Crescencio, P., Villegas, P. Listado florístico del Municipio de Campeche, Campeche, México. **Foresta Veracruzana**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2016.

Baréa, K., Scheffer-Basso, SM., Favero, D. Desenvolvimento morfológico de *Paspalum paniculatum* L. (Poaceae). **Biotemas**, v. 19, n. 4, p. 33-39, 2006.

Braz, GBP., Oliveira Júnior, RSD., Constantin, J., Takano, HK., Godinho, FB. Selectivity of herbicides applied in post-emergence of showycrotalaria. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 4, p. 918-926, 2016.

Brosnan, JT., DeFrank, J., Woods, MS., Breeden, GK. Sodium chloride salt applications provide effective control of sourgrass (*Paspalum conjugatum*) in seashore paspalum turf. **Weed technology**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2009.

Bunnell, BT., Baker, RD., McCARTY, LB., Hall, DW., Colvin, DL. Differential Response of Five Bahiagrass (*Paspalum notatum*) Cultivars to Metsulfuron. **Weed technology**, v. 17, n. 3, p. 550-553, 2003.

Burson, BL., Quarin, CL. Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 24, n. 2, p. 219-226, 1982.

Busi, R., Vila-Aiub, MM., Beckie, HJ., Gaines, TA., Goggin, DE., Kaundun, SS., Powles, SB. Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 8, p. 1218-1221, 2013.

Camacho, AJ., Argel, P., Doll, J. Control of *Paspalum fasciculatum* Willd. with dalapon and glyphosate and establishment of *Brachiaria mutica*. **Revista Comalfi**, v. 1, n. 4, p. 176-184, 1974.

Carbonari, CA., Velini, ED., Gomes, GLGC., Siono, LM., Takahashi, E.N., Bentivenha, SRP. Aplicação aérea de grânulos de argila como veículo de herbicidas para o controle de plantas daninhas em área de reforma de eucalipto. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 3, p. 257-265, 2011.

Carvalho, LD., Pitelli, RA., Cecílio Filho, AB., Bianco, S., Guzzo, CD. Interferência e estudo fitossociológico da comunidade infestante em beterraba de semeadura direta. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 291-299, 2008.

Carvalho, WTV., Minighin, DC., Gonçalves, LC., Villanova, DFQ., Mauricio, RM., Pereira, RVG. Pastagens degradadas e técnicas de recuperação: Revisão. **Pubvet**, v. 11, p. 0947-1073, 2017.

Chase, A. **The north American species of Paspalum**. US Government Printing Office, 1929.

Costa, C., Meirelles, PRL., Silva, JJ., Factori, MA. Evolução das pastagens cultivadas e do efetivo bovino no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 8-17, 2008.

Costa, DI., Scheffer-Basso, SM. Caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo Virasoro e *Festuca arundinacea* Schreb: 1. Desenvolvimento morfológico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1054-1060, 2003.

Costa, NV., Rodrigues-Costa, ACP., Coelho, ÉMP., Ferreira, SD., Araujo Barbosa, J. Métodos de controle de plantas daninhas em sistemas orgânicos: breve revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 25-44, 2018

Dias-Filho, MB. Plantas invasoras em pastagens cultivadas da Amazônia: estratégias de manejo e controle. Belém, PA: **EMBRAPA-CPATU**, 1990. 103 p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 52).

Dias-Filho, MB. Sistemas silvipastoris na recuperação de pastagens degradadas. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

Fernandez, O., Ortiz, RA. Gramineous herbicide evaluation for controlling (*Paspalum fasciculatum* Wild.) in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Agronomía Mesoamericana**, v. 6, p. 15-22, 1995.

Ferreira, EA., Fernandez, AG., Souza, CPD., Felipe, MA., Santos, JBD., Silva, DV., Guimarães, FAR. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas em pastagens degradadas do Médio Vale do Rio Doce, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 502-510, 2014.

Ferri, MVW., Eltz, FLF., Lopes, SJ. Aplicação de herbicidas dessecantes em pastagens nativas construídas por diferentes espécies do gênero *Paspalum*. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 589-595, 2001

Franco, JJ., Agostinetto, D., Langaro, AC., Perboni, LT., Vargas, L.. Relative competitiveness of goosegrass biotypes and soybean crops. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 2, p. 271-277, 2017.

Gaines, TA., Duke, SO., Morran, S., Rigon, CA., Tranel, PJ., Küpper, A., Dayan, FE. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 30, p. 10307-10330, 2020.

Galvão, AKDL., Silva, JFD., Albertino, SMF., Monteiro, GFP., Calvalcante, DP. Levantamento fitossociológico em pastagens de várzea no Estado do Amazonas. **Planta daninha**, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2011.

Ghanizadeh, H., Harrington, KC. Weed management in New Zealand pastures. **Agronomy**, v. 9, n. 8, p. 448, 2019.

Glória, BA., Guerreiro, CSM. **Anatomia vegetal**. Universidade de São Paulo. ESALQ, 2006.

González-Ibáñez, J. Glyphosate for weed control in Puerto Rican pastures. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 68, n. 3, p. 289-296, 1984.

Goulart, ICGR., Nunes, AL., Kupas, V., Merotto Junior, A. Interações entre herbicidas e protetores para o controle de capim-annoni em pastagem natural. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, 2012.

Grisi, FA., Angelo, AC., Boeger, MR., Leitão, CAE., Galvão, SF., Wendling, I. Morfoanatomia foliar em mudas de *Schinus terebinthifolius* sob diferentes níveis de saturação hídrica. **Floresta**, v. 41, n. 4, 2011.

Harker, KN., O'Donovan, JT. Recent weed control, weed management, and integrated weed management. **Weed Technology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2013.

Headford, DWR. An improved method of control of *Paspalum conjugatum* with amitrole-T and paraquat. **Weed Research**, v. 6, n. 4, p. 304-313, 1966.

Hijano, N., Orzari, I., Colombo, WL., Nepomuceno, MP., Alves, PLCA. Interferência: conhecer para usá-la a nosso favor. In: Barroso, A. A. M., Murata, A. T. **Matologia: estudos sobre plantas daninhas**. Jaboticabal: Fábrica da palavra. 2021 p.106-121.

Hirata, M., Kunieda, E., Tobisa, M. Preference of cattle grazing conterminous monocultures of centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides*) and bahiagrass (*Paspalum notatum*) with contrasting regrowth durations. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 6, p. 909-917, 2017.

Hodkinson, TR. Evolution and taxonomy of the grasses (Poaceae): A model family for the study of species-rich Groups. **Annual Plant Reviews Online**, p. 255-294, 2018.

Inoue, MH., Silva, BE., Pereira, KM., Santana, DC., Conciani, PA., Sztoltz, CL. Levantamento fitossociológico em pastagens. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 55-63, 2012.

Jeffries, MD., Gannon, TW., Yelverton, FH. Herbicide Inputs and Mowing Affect Vaseygrass (*Paspalum urvillei*) Control. **Weed Technology**, v. 31, n. 1, p. 120-129, 2017.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: H. Lorenzi, 2008.

Machado, AFL., Meira, RMS., Ferreira, LR., Ferreira, FA., Tuffi Santos, LD., Fialho, CMT., Machado, MS. Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008.

Maciel, JR., Oliveira, RC., Alves, M. *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) in Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1145-1161, 2009.

Marchi, SRF, Marques, R., M Souza, R., F Justo, C., Martins, CC. Straw interference in the emergence of talquezal seeds from different origins. **Planta Daninha**, v. 38, 2020.

Marchioretto, LDR., Dal Magro, T. Weed contro land crops electivity of post-emergence herbicides in common beans. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, p.1-6, 2017.

Marim, BG., Caliman, FRB., Mattedi, AP., Silva, DJHD., Miranda, G. V., Carneiro, PCS. Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.10, p.1283-1290, 2009.

Maroli, AS., Gaines, TA., Foley, ME., Duke, SO., Doğramacı, M., Anderson, JV., Tharayil, N: A perspective from genomics, transcriptomics, and metabolomics approaches. **Weed Science**, v. 66, n. 6, p. 681-695, 2018.

Marques, AS., Marchi, SR., Pinheiro, GHR., Marques, RF., Martins, CC. Emergence of Razor Grass on the Basis of Origin and Seed Depth in the Soil Profile. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

Oliveira, RC., Valls, JFM. Taxonomia de *Paspalum* L., grupo Linearia (Gramineae-Paniceae) do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, n. 4, p. 371-389, 2002

Parente, L., Mesquita, V., Miziara, F., Baumann, L., Ferreira, L.. Assessing the pasturelands and livestock dynamics in Brazil, from 1985 to 2017: A novel approach based on high spatial resolution imagery and Google Earth Engine cloud computing. **Remote Sensing of Environment**, v. 232, p. 111301, 2019.

Passini, T.; Kranz, WM. Eficácia de herbicidas no controle de amarelinho (*Tecoma stans*) em pastagem. **Planta Daninha**, v. 15, n. 2, p. 190-197, 1997.

PASTAGEM. ORG. Atlas digital das pastagens brasileiras. Disponível em <https://pastagem.org/atlas/map>. Acesso em: 09 de dez. de 2020.

Pitelli, RA. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série técnica IPEF**, v. 4, n. 12, p. 1-24, 1987.

Pitelli, RA. O termo planta-daninha. **Planta Daninha**, v. 33, n. 3, p. 622-623, 2015.

Ramirez, JF., Munoz, D., Edouarzin, AM. A study of three methods for controlling razor grass (*Paspalum virgatum*) in pastures. **Ciencia y Tecnica en la Agricultura. Pastos y Forrajes**, v. 13, n. 2, p. 49-57, 1990

Rojano-Delgado, AM., Portugal, JM., Palma-Bautista, C., Alcántara-de la Cruz, R., Torra, J., Alcántara, E., De Prado, R. Target site as the main mechanism of resistance to imazamox in a *Euphorbia heterophylla* biotype. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

Rojas-Sandoval, J. *Paspalum virgatum* (Sword grass). Disponível em <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/109622>>. Acesso em 24 de outubro de 2020.

Ruchel, Q., Vargas, L., Agostinetto, D., Fernando, JA., Lüdtke, R., Bobrowski, VL. Caracterização morfoanatômica, contagem cromossômica e viabilidade polínica de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 33, n. 3, p. 567-578, 2015.

Santos, MV., Freitas, FC., Ferreira, FA., Viana, RG., Tuffi Santos, LD., Fonseca, DM. Eficácia e persistência no solo de herbicidas utilizados em pastagem. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 391-398, 2006.

Schifino-Wittmann, MT. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência rural**, v. 31, n. 5, p. 897-902, 2001.

Schmitz, MF., Cechin, J., Henckes, JR., Piasecki, C., Agostinetto, D., Vargas, L. Fitness cost and competitive ability to different ploidy levels in ryegrass genotypes. **Planta Daninha**, v. 37, 2019

Scursoni, JA., Vera, ACD., Oreja, FH., Kruk, BC., de la Fuente, EB. Weed management practices in Argentina crops. **Weed Technology**, v. 33, n. 3, p. 459-463, 2019.

Silva, PCL., Yamashita, OM., DA Silva, IV., DA Rocha, AM., Brito, BZ., DE Andrade Royo, V., Andrea, AABR. Qualitative characterization of secondary metabolites of *Paspalum virgatum* weed under different water conditions. **Australian Journal of Crop Science**. 14(10):1563-1567 (2020).

Sistachs, CM., León, JJ. El caguazo (*Paspalum virgatum* L.): aspectos biológicos, su control em pastizales. **Havana: Edica**, 1987. 57 p.

Sistachs, CM., Fernandez, L., León, JJ. Susceptibilidad de la semilla de caguazo (*Paspalum virgatum* L.) a diferentes herbicidas. **Revista Cubana de Ciencias Agrícolas**, v.16, p.113-117, 1982.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719p.

Takeshita, V., Mendes, KF., Inoue, MH., Guimarães, ACD. Eficácia de atrazine sobre populações de *Paspalum virgatum* L. e seletividade em duas variedades de pastagem. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 3, p. 594-1-12), 2018.

Thornton, PK., Herrero, M. Potential for reduced methane and carbon dioxide emissions from livestock and pasture management in the tropics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 19667-19672, 2010.

Torra, J., Royo-Esnal, A., Romano, Y., Osuna, MD., León, RG., Recasens, J. *Amaranthus palmeri* a New Invasive Weed in Spain with Herbicide Resistant Biotypes. **Agronomy**, v. 10, n. 7, p. 993, 2020.

Tuffi Santos, LD., Santos, IC., Oliveira, CH., Santos, MV., Ferreira, FA., Queiroz, DS Levantamento fitossociológico em pastagens degradadas sob condições de várzea. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 343-349, 2004.

Vieira, VC., Alves, PLCA., Lemos, MVF., Sena, JA. Variabilidade genética em acessos de *Trapoeiraba* (*Commelina benghalensis* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 4, p. 315-320, 2007.

Volpe, E., Marchetti, ME., Macedo, MCM., Rosa Junior, EJ. Renovação de pastagem degradada com calagem, adubação e leguminosa consorciada em Neossolo Quartzarênico. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 131-138, 2008.

Watson, L., Clifford, HT., Dallwitz, MJ. The classification of Poaceae: subfamilies and supertribes. **Australian Journal of Botany**, v. 33, n. 4, p. 433-484, 1985.

Chapter 2 - Ploidy determination and herbicide effectiveness in *Paspalum urvillei* Steud

Abstract

Paspalum urvillei Steud (Vaseygrass) is a plant with potential to be used as forage in Brazil, particularly in the State of Rio Grande do Sul. However, in the United States, Vaseygrass is considered to be a weed specie difficult to control. Therefore, the objective was to evaluate the ploidy level of two populations of Vaseygrass exposed to different weed management practices in Florida. To evaluate their ploidy level using flow cytometry and the efficiency in chemical control for these two populations, we used five treatments: T1-Control, T2- Imazapic, T3- Nicosulfuron, T4- Glyphosate and T5- Nicosulfuron + glyphosate, were evaluated: visual injury, plant height, stem diameter, number of leaves, SPAD and number of tillers were measured. The results from the ploidy analysis revealed that both populations had similar DNA content and were classified as tetraploids. The average DNA content in accessions of Vaseygrass was 2.31 pg for Fence and 2.25 pg for Pasture. For visual intoxication, the use of glyphosate and nicosulfuron + glyphosate caused strong herbicide injury at 7 days. Glyphosate (1,16 L ha⁻¹) or imazapic (0,29 L ha⁻¹) resulted in total destruction of the plant, regardless of the history of weed management in both populations.

Keywords: Flow cytometry; Pasture; Vaseygrass; Weeds.

1 Introduction

Pasture areas are of great importance in livestock production because they provide feed to the livestock at lower costs compared other feed sources. However, the carrying capacity of forage plants may decrease due to the presence of weeds, and the Poaceae family has the most representative and frequent weeds in pasture areas (Costa et al., 2008; Tuffi Santos et al, 2004).

In the Poaceae family, *Paspalum* L. stands out as being one of the largest genus with approximately 400 species. Most *Paspalum* species are native to Tropical and Subtropical America, with some species native to the old world (Maciel et al., 2009). Given the range of occurrence and the difficulty in their control, species such as *Paspalum fasciculatum* Willd. ex Flügge and *Paspalum virgatum* L. (Talquezal) have

become the most problematic weeds in pasture areas of several regions in Brazil (Galvão et al., 2011; Andrade et al., 2012). There are also recent reports about the presence of plants of this genus infesting important annual crops, such as corn (*Zea mays* L.), soybeans (*Glycine max* L.) and sugarcane (*Saccharum* L.) (James and Rahman, 1997; Takin and Amodu, 2013; Silva et al., 2018).

In recent years, talquezal has become an important weed for pasture areas and its management is considered difficult. Just as talquezal is considered a weed problem in Brazil, vaseygrass is also a weed problem in the United States of America and around the world, as reported in New Zealand, Australia, Porto Rico, and Argentina (González-Ibáñez, 1987; Percival, 1977). Vaseygrass is native to South America, is a C4 perennial plant, which became a common weed in pastures, highways, and in other locations, due to its aggressiveness and easy propagation, it has become an important weed for growers (USDA, 2020; Lorenzi, 2008). Vaseygrass was introduced in the southeastern United States and became a weed common in pastures (Newman and Sollenberger, 2005). According to North American taxonomists, vaseygrass is considered a synonym for talquezal (Jeffries et al., 2017)

In order to deal with the aggressiveness of this plant, the use of herbicides has become an important and most used strategy for control. However, due to the botanical closeness to forage species, the chemical control became difficult (Goulart et al., 2012). Application of cletodim with grass cut improved the control percentage, but the same results were not found for the application of imazapic, metsulfuron + nicosulfuron (Jeffries et al., 2017).

Due to the difficulty in obtaining acceptable weed control for vaseygrass, it is questioned which factors might be related to the efficacy of control. Previous reports show that intrinsic factors such as the plants' genetic composition and the genetic diversity found in the species might be influencing its response to herbicide tolerance. It has been showing that approximately 75% of the 350 known species of *Paspalum* (Poaceae) are polyploid, and the majority of polyploids are apomitic (Galdeano et al., 2016). In diploid cytotypes of *Paspalum stellatum* Humb & Bonpl. Ex Flügge, *Paspalum malmeanum* Ekman and *Paspalum schesslii* Bonasora & Rua, the generation of interspecific hybrids is occurring, which gives rise to allopolyploid complexes (Bonasora et al., 2018), but vaseygrass has been reported as tetraploid (Vaio et al., 2007).

Among the various techniques available for the study of polyploidy, flow cytometry is a technique that has been used to characterize ploidy level in several *Paspalum* populations (Schifino-Wittman, 2001; Ortiz et al., 2013; Sartor et al., 2011; Siena et al., 2008). The determination of the amount of nuclear DNA in a group of organisms can be extremely relevant, since this information is essential to the knowledge about the species being studied (Schifino-Wittman, 2001). The author reports that the quantification of chromosomes by the flow cytometry method is advantageous, since the process of sample preparation is associated with the large number of nuclei that can be analyzed. Also, by using small amounts of tissue, it is possible to obtain results quickly. Therefore, the plant for being from the same family as forage plants can make it difficult to choose herbicides that perform effective control, in addition to the genetic variation directly influencing the plant's response to the herbicide. However, this study aimed to analyze the ploidy level of two populations of Vaseygrass and the effectiveness of weed control options.

2 Material and Methods

The seeds were collected in 2019 from two locations at the Agronomy Forage Research Unit, Hague, Florida. The populations selected for seed collection have undergone a different history for weed control: i) The population 1: a population of plants growing in proximity to a fence and exposed to only chemical control, with herbicides glyphosate and 2,4-D (29.80 Latitude and -82.42 Longitude) and ii) Population 2: it went through constant mechanical control management in a pasture area (29.63 Latitude and -82.35 Longitude). Mature seeds of the two populations were harvested individually, transported to the Forage Breeding and Genetics laboratory in Gainesville, FL, and they were individually threshed and cleaned.

After cleaning, the seeds were sown in plastic trays with 72 cells and placed in the greenhouse for 25 days. For transplanting, the seedlings were planted in commercial substrate (composed of Canadian *Sphagnum peat* moss (85%), Perlite, Vermiculite, Dolomitic and calcitic limestone and wetting agent) in plastic 1.2 liters volume pots and were irrigated daily. During the whole experiment, the plants were kept in the greenhouse where each pot received 30 ml of liquid fertilizer in commercial formulation (Nitrogen 24%, Phosphate 8%, Potash 16%, Boron 0.02%, Copper 0.07%,

Iron 0.15%, Manganese 0.05%, Molybdenum 0.0005% and Zinc 0.06% commercial Market Miracle-Gro®) every 3 days.

2.1 Ploidy level

For flow cytometry, approximately 100 mg of Vaseygrass leaves in vegetative stage were used, sectioned in 1.0 mm and placed in Petri dishes in 500 μ L of commercial extraction solution (Rios et al., 2015). The leaf tissue was cut and incubated in solution for 30 seconds. The samples were filtered through Partec 50 μ m CellTrics (Sysmex®) and 2 mL of staining solution containing propidium iodide and RNase (CyStain PI, P absolute, Sysmex®) was added to stain the extracted cores. The samples were kept refrigerated in a polystyrene box with ice for 5 min and analyzed immediately at the BD Accuri C6 Flow scintimeter using the FL2 channel (Accuri Cytometers, Ann Arbor, Michigan, United State of America).

For each sample, at least 5000 nuclei were counted and analyzed using the BD Accuri CFlow software. Samples with histograms showing peaks with coefficients of variation less than 10% were considered for analysis. For control, diploid and tetraploid *Paspalum notatum* Flügge. Parodi, cultivars, Pensacola ($2n=2x=20$) and Argentine ($2n=4x=40$) were used as controls, and “B73” maize (*Zea mays*) was used to estimate genome size in vaseygrass. To evaluate the level of ploidy and estimate the size of the genome, the solution containing propidium iodide binds to DNA and fluoresces when excited by an energy source. The amount of propidium iodide that binds to DNA is proportional to the amount of DNA present in the sample and, therefore, the fluorescence intensity recorded by the flow cytometer is an accurate estimator of the DNA content per cell. Thus, the flow cytometer recorded the fluorescence intensity of the propidium iodide bound to the DNA of the cells in periods G1 and G2 present in the leaf samples. Therefore, the amount of DNA contained in the diploid nuclei (2C DNA content) was calculated based on the fluorescence intensity recorded for the G1 peak (Rios et al., 2015).

2.2 Effectiveness of chemical control

The experiment was carried out in a greenhouse at the Forage Breeding and Genetics Lab, Gainesville, FL between (The experiment starts in 2019 and finish in 2020). The 500ml volume pots were filled with commercial substrates composed of

Canadian *Sphagnum peat* moss (85%), Perlite, Vermiculite, Dolomitic and calcitic limestone and wetting agent. Seedlings were transplanted after 25 days into 300ml pots. 35 days after transplanting, the plants were replicated and planted in 500ml pots. When the plants reached full vegetative state after 20 days of replication, the seedlings were subjected to the treatments.

The experimental design was a randomized complete block in a 2 x 5 factorial treatment arrangement with four replicates. The experiment was performed twice to validate the data, thus is possible to better understand the biological response of plants to the treatments used. Factor A consisted in the two populations of Vaseygrass. Factor B consisted in the treatments: T1-Control, T2- Imazapic, T3- Nicosulfuron, T4- Glyphosate and T5- Nicosulfuron + glyphosate and in all treatments a non-ionic adjuvant (composition was alkyl aryl polyoxyl kane ethers and free fatty acids) was added. The dosage used was based on the recommendation provided in the product labels for grass control (Table 1). For the treatment application, we used a spray chamber with constant pressure (CO₂), equipped with the bar automatically activated in the control panel, containing a Teejet tip of the plan jet model TT 11005 and adjusted to distribute 187 L ha⁻¹ of spray solution, with 2.8 bar pressure. At 7, 14 and 21 days after the treatments (DAT) were applied, visual injury evaluation of the plants were performed (Table 2) (EWRC, 1964). Concomitant to these assessments, photographic records of the symptoms of plant injury were collected. Plant height (cm), stem diameter (cm), number of leaves and number of tillers were measured. At day 21, shoots were cut and placed in an oven with air circulation at a temperature of 45 °C for 96 hours, to determine dry matter production in a precision scale.

Table 1- Commercial products, active ingredients, formulation and rates tested this study.

Commercial name	Active ingredient	Formulation type	Rate of pulverization	Quantity of product per ha ⁻¹
Accent®	Nicosulfuron	WG	18.2	170. 24*
Cadre®	Imazapic	SL	4	0.2924**
Sunphosate®	Glyphosate	SL	16	1.1696**
Induce®	Non-ionic adjuvant	SL	0.25	0.5**

WG= Dispersible granules. SL = Concentrate soluble. *g ha⁻¹. ** L ha⁻¹.

The data obtained were subjected to normality analysis of the residuals by the Shapiro-Wilk test at 5% probability and the Bartlett test at 5% probability in order to verify the homogeneity of the variance. The variables plant stem diameter and number of plant leaves considered non-normal were transformed using the Box-Cox method. For the visual intoxication variable, the transformation of the data into square root $x + 0.5$ was used. The model used consists of $y = \text{populations} * \text{herbicide} + \text{control} * \text{trials}$. The population factor composed of plants originated from seeds collected in the area of fence and pasture. The herbicide factor was composed of treatments with isolated herbicide, mixture, and control treatment. Trials factor was composed of the repetition experiment for validation and understanding of the data. Then, the analysis of variance was performed using the F test, with significance being compared by Tukey test ($p > 0.05$), using the R Core Team software (R core team, 2019).

Table 2- Adopted scale used for the visual evaluation of phytotoxicity caused by the four commercial products herbicides pulverization in plants of the *Paspalum urvillei* Steud (Vaseygrass), adapted from European Weed Research Council (1964).

Note	Phytotoxicity
1	Null
2	Very light
3	Light
4	Regular
5	Average
6	Almost strong
7	Strong
8	Very strong
9	Extremely strong
10	Total destruction

3 Results

3.1 Ploidy level

The results from the ploidy analysis revealed that both populations had similar DNA content, and both were classified as tetraploid ($2n=4x=40$) based on the comparison with their G1 peaks and the G1 peak in the tetraploid bahiagrass cultivar Argentine ($2n=4x=40$). There was consistency between the results obtained by

evaluating ploidy level two times in both populations. The average DNA content in accessions of Vaseygrass was 2.31 pg for population 1 and 2.25 pg for population 2 (Figure 1).

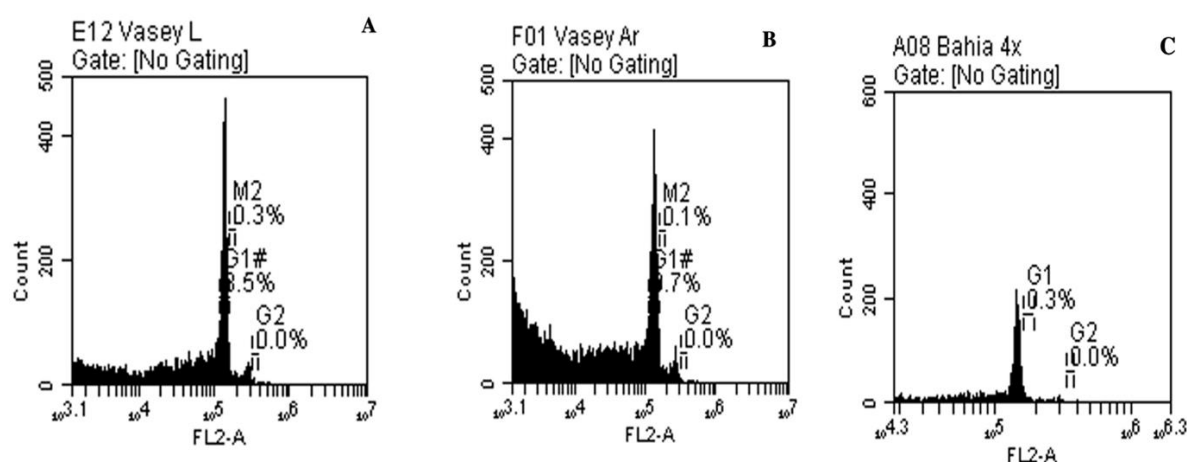


Figure 1- Histograms of the fluorescence intensity to DNA in cell nuclei extracted from leaves of (A) Population of vaseygrass from fence area, (B) Population of vaseygrass from pasture area and (C) Population of *Paspalum notatum* Flugge. Parodi cv. Argentine.

3. 2 Effectiveness of chemical control

The test for chemical control allowed us to observe the response of the two populations to different chemical treatments. Significant ($P < 0.05$) two-way interactions were observed for plant height between population and treatments (7 DAT and 14 DAT). At 7 DAT treatments were observed the fence was affected with used herbicides Nicosulfuron and Glyphosate. 21 DAT treatment had a significant ($P < 0.001$) effect in plant height and all treatments showed smaller plants compared to the control (Table 3).

Number of leaves interactions were observed ($P < 0.05$) between treatment and trial (7 DAT), treatment and trial, treatment and population (14 DAT), treatment and population (21 DAT) (Table 3). The number of leaves was lower after the treatment with glyphosate, when compared with the treatments nicosulfuron and imazapic at 7 DAT, also, at 7 and 14 DAT were had significant for trial because the plants had differences between first and second trial, consequently, were observed differences response for treatments. At 14 and 21 DAT were observed difference population fence and pasture, because plants from fence area were a lower number of leaves in treatment control (Table 3).

Table 3- Average values of plant height (cm) (PH) and Number of plant leaves (NPL) measured at 7, 14 and 21 days after application of treatments on *Paspalum urvillei* Steud (Vaseygrass).

Treatments	Population	PH 7	PH 14	PH 21	NPL 7	NPL 14	NPL 21
Control	Fence	13.40aA	17.2aA	20.19aA	8.00aAB	13.00bA	17.0bA
	Pasture	12.20aAB	15.6aA	16.98aA	8.00aAB	19.00aA	23.5aA
Imazapic	Fence	9.82aA	8.25aB	4.05aB	8.25aA	7.25aB	1.5aC
	Pasture	10.5aAB	8.48aA	3.59aB	8.25aA	7.75aB	1.0aBC
Nicosulfuron	Fence	7.91bA	7.90aB	5.55aB	9.00aA	9.50aB	6.50aB
	Pasture	15.7aA	12.6aA	4.81aB	9.00aA	10.0aB	4.75aB
Glyphosate	Fence	9.42aA	8.70bAB	4.83aB	5.00aB	7.5aB	0.0aC
	Pasture	7.78aB	7.69bA	6.02aB	5.00aB	7.5aB	2.0aBC
Nicosulfuron + Glyphosate	Fence	8.21aA	6.18aB	3.85aB	6.66aAB	9.00aB	0aC
	Pasture	10.3aAB	10.6aA	3.88aB	6.66aAB	8.33aB	0aC

The same lowercase letters in the column means that the population does not differ from each other by the Tukey test ($p > 0.05$). Capital letters in the column mean that the treatments do not differ by Tukey's test ($p > 0.05$).

For number of plants tillers significant ($P < 0.05$) two-way interactions were observed for populations, between treatment and trial (7 DAT, 14 DAT and 21 DAT) and population and treatments (14 DAT) (Table 4). But, at 7 DAT the population significance ($P < 0.05$) was observed, at the glyphosate and nicosulfuron + glyphosate treatment the plants from the fence were a lower number of tillers. At 14 DAT the differences were observed because all tillers died, that is, pulverization of herbicide resulted in a decrease in the number of tillers (Table 4). Finally, at 21 DAT were observed that plants from the fence area had a lower number of tillers in the control treatment, with all treatments that used herbicides were different from control treatments.

Plant stem diameter were observed significant ($P < 0.05$) two-way interactions between treatment and trial (7 DAT), also, were observed difference for treatments, trial and interaction between treatment and trial (21 DAT) (Table 4). The stem diameter decreased after the pulverization of herbicides, as a result of physiological responses, for exemplo, photosynthesis reduction. The same pattern was observed for the other variables evaluated previously. At 7 DAT in treatment control, the plant's fence had a

lower diameter compared to other treatments and the plant's pasture (Table 4). 21 DAT, all treatments were different from control, no have difference between herbicides.

The SPAD was observed significant ($P < 0.05$) interactions between treatment and trial (7 DAT, 14 DAT and 21 DAT). In this work, the SPAD index (Table 5), combined with other variables previously showed, allows to understand the plants' response to the herbicides applied. Regarding the response of plants to the herbicides, it is possible to observe that at 7 DAT there was no difference between the control and the treatments, except for the herbicide nicosulfuron. 14 DAT, the differences in the treatments glyphosate, nicosulfuron + glyphosate and imazapic in population pasture were perceived (Table 5). At 21 DAT, there was a difference between the populations treated and the control, since these plants had all the symptoms of visual injury, such as loss of photosynthetically active tissue (Table 5). The highest SPAD values indicate that the plants have good the level of chlorophyll and thus, indicates that the plants are healthy, according to the values 34.70 and 31.90 observed in the control for populations fence and pasture, respectively. Similarly, for the previous variables for factor trial and interaction with the trial was significant ($P < 0.05$) for the same reason previously described.

Table 4- Average values of Number of Plant Tillers (NPT) and Plant stem diameter (PSD) (mm) at 7, 14 and 21 days after application of treatments on *Paspalum urvillei* Steud (Vaseygrass).

Treatments	Population	NPT 7	NPT 14	NPT 21	PSD 7	PSD 14	PSD 21
Control	Fence	1.33aA	4.00aA	6.00aA	3.36bA	4.77aA	6.12aA
	Pasture	2.00aA	3.33aA	5.00bA	5.32aA	5.93aA	4.60aA
Imazapic	Fence	1.0aA	0.5aBC	0.00aB	3.87aA	2.40aBC	1.57aBC
	Pasture	1.5aA	1.0aBC	0.25aB	3.55aA	2.05aB	0.85aB
Nicosulfuron	Fence	1.50aA	1.25aB	0.75aB	3.63aA	4.60aAB	2.5aB
	Pasture	1.75aA	1.75aB	0.50aB	4.50aA	3.45aAB	2.6aB
Glyphosate	Fence	0.33bA	0.00bC	0.00aB	3.77aA	2.10aABC	1.6aBC
	Pasture	2.00aA	1.5aB	0.00aB	4.07aA	2.82aB	1.7aB
Nicosulfuron + Glyphosate	Fence	0.5bA	0.25aBC	0.00aB	3.05aA	2.02aC	0.52aC
	Pasture	1.5aA	0.00aC	0.00aB	3.13aA	2.38aB	1.17aB

The same lowercase letters in the column means that the population does not differ from each other by the Tukey test ($p > 0.05$). Capital letters in the column mean that the treatments do not differ by Tukey's test ($p > 0.05$).

Visual injury observed were significant ($P < 0.05$) for treatment and interactions between treatment and trial (7 DAT, 14 DAT and 21 DAT) (Table 5). The scores for visual injury of the plants showed that glyphosate and the mixture of nicosulfuron + glyphosate caused strong symptoms of intoxication by the herbicides at 7 DAT at 14 DAT (Table 5). Nevertheless, after the application of nicosulfuron, plants did not show strong visual injury as the other herbicides (Table 5). At 21 days, all treatments were different from the control. However, the treatments glyphosate and imazapic resulted in the total destruction of the plant. Although the herbicide nicosulfuron resulted in the efficient control of the plants, the effect was lower when compared with the other herbicides (Table 5). The interactions treatment and trial showed that the first trial had more scores of visual intoxications compared the second trial. Despite the difference, the treatments in both trials showed the same behavior for Tukey results, with the exception of the nicosulfuron treatment, which showed a statistical difference between the trials with better control scores in the second trial. For dry matter, significant ($P < 0.05$) were observed difference only for treatments (Figure 2), in which, were observed difference between treatment control and treatments with herbicides. Figure 2 shows that the use of herbicides reduced plants' dry biomass, causing a reduction of approximately 74% compared to the control.

Table 5- Average values of SPAD and Visual intoxication (VI) at 7, 14 and 21 days after application of treatments on *Paspalum urvillei* Steud (Vaseygrass).

Treatments	Population	SPAD 7	SPAD 14	SPAD 21	VI 7	VI 14	VI21
Control	Fence	43.55aA	35.70aA	34.70aA	1.00aD	1.00aE	1.00aC
	Pasture	36.17aA	32.45aA	31.90aA	1.00aD	1.00aE	1.00aC
Imazapic	Fence	34.40aAB	24.92aAB	1.00aB	4.25aBC	7.00aC	9.75aA
	Pasture	28.70bA	16.50aBC	3.72aB	4.25aB	7.00aC	9.75aA
Nicosulfuron	Fence	23.72aB	30.80aA	8.95aB	3.75aC	6.00aD	8.50aB
	Pasture	40.55aA	29.10aAB	6.35aB	3.33aB	6.00aD	8.75aB
Glyphosate	Fence	34.07aAB	9.90aB	1.00aB	5.5aAB	8.00aB	10.0aA
	Pasture	27.30aA	13.35aBC	1.00aB	5.5aA	8.00aB	10.0aA

Nicosulfuron + Glyphosate	Fence	27.45aAB	10.67aB	1.00aB	6.5aA	9.00aA	10.0aA
	Pasture	26.35aA	7.75aC	1.00aB	6.5aA	9.00aA	10.0aA

The same lowercase letters in the column means that the population does not differ from each other by the Tukey test ($p > 0.05$). Capital letters in the column mean that the treatments do not differ by Tukey's test ($p > 0.05$).

4 Discussion

4.1 Ploidy level

The ploidy level found in this study showed both populations were tetraploid. This information is important for the *P. urvillei* control plants, since it makes it possible to confirm, quickly and accurately, the species and ploidy level of genotypes collected on pastures. In species studied in the genus *Paspalum* from South America, the authors reported 2C values between 2.29 pg and 2.43 pg for *Paspalum urvillei* and 2.40 pg for species in Brazil (Vaio et al., 2007). Burson (1979) studying crosses of *Paspalum urvillei* × *P. intermedium* founded that plants tetraploid as same as found in this study. In studied about crosses of several species in the genus *Paspalum* and found that *P. urvillei* has $2n = 40$ (Burson, 1979), corroborating the level of ploidy found in the populations in this study.

The knowledge about the ploidy level in *Paspalum* species is important to elaborate an efficient weed control management of the plants in a given area, for example, in plants with different levels of ploidy, usually have leaves of different sizes, because of this, the drop size needs to be adjusted at the time of application so that the product is absorbed. In addition to that, genetic differences between populations may justify hindrances in control, for example, resistant plants appearance, an also enhance the understanding of evolutionary processes, which might result in resistant plants to a certain herbicide. In a study with camalote grass (*Rottboellia cochinchinensis*) accessions from several locations, founded all accessions were polyploid, which could explain the difference in the effectiveness of chemical control (Alves et al., 2003).

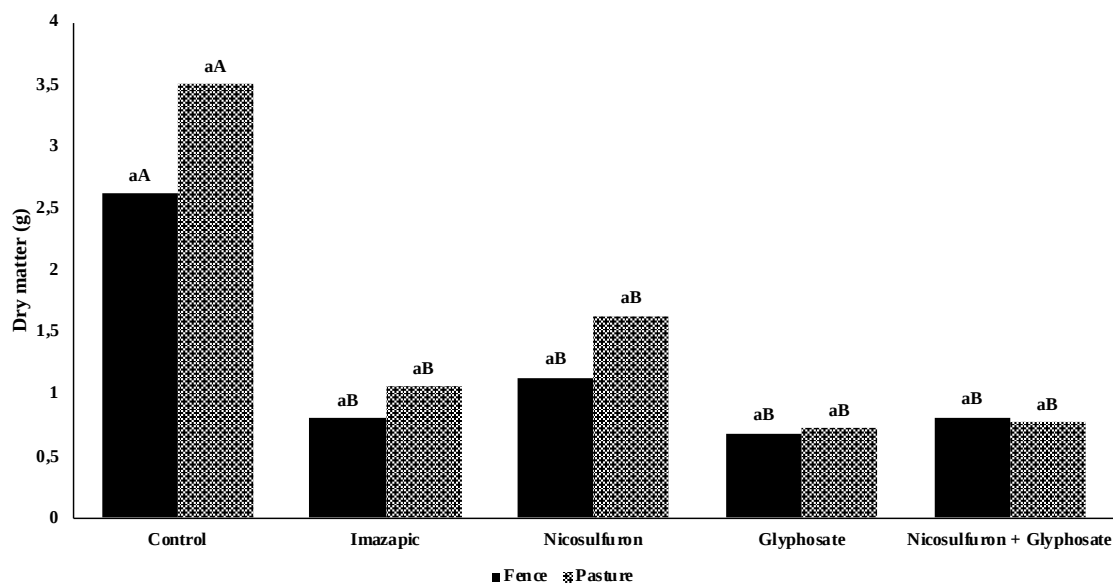


Figure 2- Average values of dry matter (g) at 21 days after application of treatments on vaseygrass. The residual standard deviation was 0.1473. The same lowercase letters mean that the population did not differ from each other by the Tukey test ($p > 0.05$). Capital letters mean that the treatments did not differ by Tukey's test ($p > 0.05$). Colors black for plants from fence area and grating for plants from pasture area.

In studied *Lolium perenne* L. Dors et al. (2010) it was founded those diploid genotypes showed differential susceptibility to glyphosate, while tetraploid genotypes showed more tolerant to this herbicide. Therefore, plants characterized as diploids presented greater susceptibility to glyphosate when compared with tetraploids.

4. 2 Effectiveness of chemical control

For plant height, the decrease is recurrent to the extreme damage caused by the herbicide. Glyphosate is an EPSPS enzyme inhibitor (5-enolpyruvoylshiquime 3-phosphate synthase), a broad-spectrum and post emergence herbicide This herbicide is widely used in leaf desiccation and pasture renovation. In general, symptoms start in the first week after pulverization, followed by leaf necrosis in the following days (Duke and Powles, 2008). These symptoms were observed during the experiment, showing the susceptibility of both populations evaluated.

In management, all Poaceae weed species are not difficult to control in the pasture, because the number of tillers is important for perpetuation of the species. The herbicides that affect the tillers can cause a decrease in regrowth of the plants, especially for weeds that have bunch-type growth habit. All treatments were statistically different from the control and presented less tillers, which means that after the

herbicides caused a decreased in the reserves directed to the tiller formation (Harmony, Stahlman, Hickman, 2004). The use of herbicides in this study caused a decrease in the perpetuation of the plants. For weeds, it is interesting to reduce the number of tillers as it compromises plants' persistence in the infested area, different from what is desired for forage plants (Santos et al., 2009).

In general, stem diameter decreased after the pulverization of herbicides. The herbicides imazapic and nicosulfuron presents the same mode of action - acetolactate synthase (ALS) inhibitors - but different chemical groups. The effects of those herbicides consist in reducing stem thickness and internode length, causing the death of grasses between 10 and 60 days after application. Thus, the results obtained from stem diameter were similar to the results reported in the literature (Zhou et al., 2007; Orcaray et al., 2009).

The SPAD index is an equipment developed for the instant diagnosis of chlorophyll content in leaves without causing damage to the plant. The SPAD index has the ability to detect genetic variability between accessions, along with other analyzes such as plant height (Oliveira et al., 2020). In studies were observed SPAD index values for healthy *P. notatum* plants between 37.67 to 39.80, while for species *P. regnellii*, *P. conspersum*, *P. malacophyllum* and found SPAD values of 34.16, 34.48 and 33.5, respectively (Pereira et al., 2017; Beloni et al., 2017). In a variety of *Oryza sativa* was found that SPAD values are different for each variety, but in this study, no differences were observed between populations (Rahman et al., 2017). However, although the SPAD index is important, further information is needed, such as morphological characteristics and climatic conditions at the time of the readings, especially when performed in field conditions (Simili et al., 2019).

For chemical control, several works have highlighted the level of visual injury considered satisfactory. In a study with *Ventenata dubia* was found that the use of imazapic to control exotic species reduced coverage and plant density in the area, with levels of control between 82% to 94%, which was considered satisfactory by the author (Davies and Hamerlynck, 2019) For plants in the vegetative stage used in this work, the imazapic control percentage was 97%. In a study carried out with glyphosate for the control of *Nassella trichotoma*, the authors did not achieve acceptable control of plants (above 90%) (Campbell and Gilmour, 1979), unlike this study, in which the percentage of control was 100%. Low doses of glyphosate (133.60 and 365.63 g ha⁻¹) were able control of *Urochloa brizantha* achieving 90% by sequential pulverization in

a pasture area with Tifton 85 (*Cynodon* spp.), without compromising the forage yield (Santos et al., 2007). Thom, Wildermoth and Taylor (1993) found that the use of glyphosate in low doses controlled an infestation of *P. dilatatum* in a pasture of *Lolium perenne* L. Also, the presence of *P. dilatatum* increased the accumulation of forage in later years due to higher competition with the weeds. Therefore, the use of herbicides can support the competitiveness of forages in an area, by enlarging the dossal of cultivated plants and consequently, shading the weeds.

According to the variables presented and the conditions of the experiment carried out, glyphosate can be recommended to suppress Vaseygrass in Florida pastures, since there was no difference between its effects when applied isolated or in the mixture. Despite the efficient control of nicosulfuron and imazapic, they have residual effect, which may affect the production of dry matter in forages. In addition, the sandy soils in Florida, and shallow water tables can cause environmental impacts for ALS herbicides due to the leaching process of chemical products in sandy soils (Gonzalez and Ukrainczyk, 1996; Jhala and Singh, 2012). In studied the degradation of imazapic in rice production system Pinto et al. (2011) founded that herbicide leave residues in the soil enough to interfere negatively in plant growth and productivity. But for beans, cucumbers and sunflowers were found can only be sown in areas that nicosulfuron was pulverization after 30 days (Carvalho, Moretti, Souza, 2010).

The use of glyphosate should also be carried out with caution, in terms of its broad-spectrum control There is practically no selectivity for pasture and the symptoms of visual injury of the plant appears 15 days after spraying the herbicide. Regarding the use of glyphosate in established pastures, it can cause severe damage to forage species, so the adoption of specific application technology for localized control is preferred. However, glyphosate can be used in total area application when the goal is to restore the pasture (Mello, Souza, Tironi, 2017).

In the current perspective it is important to understand that the use of one of the all herbicides used in these studies should be carried out with caution. Since, there are several reported cases of resistance from ALS and EPSPS (Gaeddert, Peterson, Horak, 1997). Furthermore, the plants' response to glyphosate may diversify due to several biochemical and physiological factors, including changes in CO₂ concentration (Fernando et al., 2016). According to Fernando et al. (2016) weeds with C3 metabolism respond to carbon concentration and can be more susceptible to the appearance of

resistant plant cases. As *P. urvillei* plants has C4 metabolism and the population of this assay are tetraploid, it might have resulted in efficient control of both populations.

5 Conclusions

Flow cytometry allowed the rapid determination of the ploidy level of *Paspalum urvillei* plants. The two populations of vaseygrass were classified as tetraploid, with 2C values 2.31 pg and 2.25 pg for population 1 and 2, respectively. The application of glyphosate (1.1696 L ha^{-1}) controlled 100% of the plants of *Paspalum urvillei* under the conditions of this study. The destruction of the plants happened at 21 days after the pulverization of the herbicide.

6 References

- Alves PLC, Bachega MF, Moro JR, Lemos MVF, Alves EC, Silva MAS, Moro FV. Identification and characterization of different accessions of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*). **Weed Science**, v. 51, p.177-180, 2003.
- Andrade CMS, Fontes J, Oliveira TK, Farinatti L. Reforma de pastagens com alta infestação de capim-navalha (*Paspalum virgatum*). Embrapa Acre-**Circular Técnica** 64. <https://www.embrapa.br/acre/busca-de-publicacoes/-/publicacao/948671/reforma-de-pastagens-com-alta-infestacao-de-capim-navalha-paspalum-virgatum> [accessed June 7, 2019].
- Beloni T, Pezzopane CDG, Rovadoscki GA, Fávero AP, Dias-filho MB, Santos PM. Morphological and physiological responses and the recovery ability of *Paspalum* accessions to water deficit and waterlogging. **Grass and forage sci.** v.72, p. 840-850, 2017.
- Bonasora MG, López A, Vaio M, Speranza PR, Honfi AI, Rua GH. Origins of polyploidy in *Paspalum stellatum* and related species (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae) inferred from phylogenetic and cytogenetic analyses. **Botan Jour of the Lin Society** v. 188, p. 21-33, 2018.
- Burson BL. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* × *P. intermedium* and *P. dilatatum* × *P. paniculatum* Hybrids 1. **Crop Science**, v.19, p.534-538,1979.
- Campbell MH, Gilmour AR. Effect of time and rate of application of herbicides on serrated tussock (*Nassella trichotoma*) and improved pasture species. 1. Glyphosate and 2, 2-DPA. **Aust Jour of Exp Agric.** v.19, p.472-475, 1979.
- Carvalho FT, Moretti TB, Souza PA. Efeito do residual no solo de nicosulfuron isolado e em mistura com atrazine sobre culturas agrícolas subsequentes. **Rev Bras de Herb.** v.9, p.26-34, 2010.

Costa C, Meirelles PRL, Silva JJ, Factori MA. Evolução das pastagens cultivadas e do efetivo bovino no Brasil. **Arq Bras de Med Vet e Zoot.** v.15, p.8-17, 2008.

Davies KW, Hamerlynck E. Ventenata and Other Coexisting Exotic Annual Grass Control and Plant Community Response to Increasing Imazapic Application Rates. **Rang Ecol & Manag.** v.72, p.700-705, 2019.

Dors CA, Christoffoleti PJ, Sanchotene DM, Dias ACR, Manfron PA, Dornelles SHB. Suscetibilidade de genótipos de *Lolium multiflorum* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha** v.28, p. 401-410, 2010.

Duke SO, Powles SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Manage Sci** v.64, p. 319-325, 2008.

European Weed Research Council (EWRC) Report of the 3rd and 4th meetings of EWRC Comittee of Methods in Weed Research. **Weed Research** v.4, p.88 (1964).

Fernando N, Manalil S, Florentine SK, Chauhan BS, Seneweera S. Glyphosate resistance of C3 and C4 weeds under rising atmospheric CO₂. **Frontiers in plant science** v.7, p.910-915, 2016.

Gaeddert J W, Peterson DE, Horak MJ. Control and cross-resistance of an acetolactate synthase inhibitor-resistant Palmer Amaranth. **Weed technology** v.11, p.132-137, 1997.

Galdeano F, Urbani MH, Sartor ME, Honfi AI, Espinoza F, Quarín CL. Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. **Journal of plant research** v.129, p.697-710, 2016.

Galvão AKDL, Silva JFD, Albertino SMF, Monteiro GFP, Cavalcante DP. Levantamento fitossociológico em pastagens de várzea no Estado do Amazonas. **Planta Daninha**, v. 29, n. 1, 2011.

Goulart ICGR, Nunes AL, Kupas V, Merotto Junior A. Interações entre herbicidas e protetores para o controle de capim-anonni em pastagem natural. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, 2012.

Gonzalez JM, Ukrainczyk L. Adsorption and desorption of nicosulfuron in soils. **Jour of environ qual.** v. 25, n. 6, p. 1186-1192, 1996.

González-Ibáñez J. Pre-and pos-emergence control of Vasey grass (*Paspalum urvillei* Steud.) with several herbicides. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.71, n.2, p. 233-234, 1987.

Harmony KR, Stahlman PW, Hickman KR. Herbicide Effects on Established Yellow Old World Bluestem (*Bothriochloa ischaemum*) 1. **Weed Technology**, v. 18, n. 3, p. 545-550, 2004.

JAMES, T. K.; RAHMAN, A. Control of couch (*Elytrigia repens*) and Mercer grass (*Paspalum distichum*) in maize with nicosulfuron. In: Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference. 1997. p. 467-471
https://pdfs.semanticscholar.org/11e3/48863155aed2bd73ae85cc55f30d32814bf9.pdf?_ga=2.145442551.238519923.1596484454-1988165363.1596484454. Accessed April 12, 2020.

Jeffries MD, Gannon TW, Yelverton FH. Herbicide Inputs and Mowing Affect Vaseygrass (*Paspalum urvillei*) Control. **Weed Technology**, v. 31, n. 1, p. 120-129 (2017).

Jhala AJ, Singh M. Leaching of indaziflam compared with residual herbicides commonly used in Florida citrus. **Weed Technology**, v. 26, n. 3, p. 602-607, 2012.

Lorenzi H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

Maciel JR, Oliveira RC, Alves M. Padrões de distribuição das espécies de *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae:Paniceae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 3, p. 597-605, 2009.

Mello JP, Souza RC, Tironi SP. Controle Químico em Pós-Emergência de Capim-Gengibre (*Paspalum maritimum* Trin.). **Rev Ciência Agríc.** v. 14, n. 1, p. 67-71, 2017.

Newman YC, Sollenberger LE. Grazing management and nitrogen fertilization effects on vaseygrass persistence in limpograss pastures. **Crop science** v.45, p. 2038-2043, 2005.

Oliveira PS, Suzuki LS, Carneiro JC, Machado JC, Prates JF. Use of SPAD index in elephant grass pre-breeding. **Semina: Ciências Agrárias** v.41, p.1047-1052, 2020.

Orcaray L, Igal M, Marino D, Zabalza A, Royuela M. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Manage Sci.** v. 66, p.262-269, 2010.

Ortiz JPA, Quarín CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ, Espinoza F, Pupilli F. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany** v.112, p.767-787, 2013.

Percival NS. Survey of paspalum in New Zealand pastures, New Zealand. **Journal of Experimental Agriculture**, v. 5, n.3, p. 219-226,1977.

Pereira MC, Rios EF, Kenworthy KE, Quesenberry KH, Blount A, Erickson J, Munoz P. Comparisons of Turf-Type Bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) Lines for Root and Shoot Traits under Various Nitrogen Regimes. **International Turfgrass Society Research Journal**, v. 13, n. 1, p. 443-453, 2017.

Pinto JJO, Noldin JA, Sousa CP, Agostinetto D, Piveta L, Donida A. Atividade residual de imazethapyr+ imazapic em arroz semeado em rotação com o arroz Clearfield®. **Planta Daninha** v.29, p.205-216, 2011.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2019.

Rahman AA, Islam AM, Arefin MA, Rahman MR, Anwar MP. Competitiveness of winter rice varieties against weed under dry direct seeded conditions. **Agricultural Sciences**, v. 8, n. 12, p. 1415-1438, 2017.

Rios EF, Kenworthy KE, Munoz PR. Association of phenotypic traits with ploidy and genome size in annual ryegrass. **Crop Science**, v. 55, n. 5, p. 2078-2090, 2015.

Santos MER, Fonseca DMD, Balbino EM, Monnerat JPIDS, Silva SPD. Caracterização dos perfilhos em pastos de capim-braquiária diferidos e adubados com nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 643-649, 2009.

Santos MV, Ferreira FA, Freitas FCL, Tuffi Santos LD, Viana JM, Rocha DC C, Fialho CMT. Controle de *Brachiaria brizantha*, com uso do glyphosate, na formação de pastagem de Tifton 85 (*Cynodon* spp.). **Planta Daninha** v. 25, n. 1, p. 149-155, 2007.

Sartor ME, Quarin CL, Urbani MH, Espinoza F. Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. **Plant System and Evol.** v. 293, p.31-41, 2011.

Schifino-Wittmann MT. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural** v.31, p.897-902, 2001.

Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarin CL, Ortiz JPA. Genetic and embryological evidence of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent autopolyploidization in the species. **Sexual Plant Reproduction** v.21, p.205-215, 2008.

Silva DA, Albuquerque JDAA, Alves JMA, Rocha PRR, Medeiros RD, Finoto EL, Menezes PHS. Caracterização de plantas daninhas em área rotacionada de milho e feijão-caupi em plantio direto. **Scientia Agropecuaria** v.9, p.7-15, 2018.

Simili FF, Barbosa KRS, Augusto JG, Menegatto LS, Mendonça GG, Bonacim PM, Savegnago RP. Study of the chemical composition of *Urochloa brizantha* using the SPAD index, neural networks, multiple linear models, principal components and cluster analysis. **Animal Feed Sci and Tech.** v. 258, p. 114307, 2019.

Takim FO, Amodu A. Quantitative estimate of weeds of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) crop in Ilorin, Southern Guinea Savanna of Nigeria. **Ethiopian Jour of Environ Studies and Manage.** v. 6, n. 6, p. 611-619, 2013.

Thom ER, Wildermoth DD, Taylor MJ. Growth and persistence of perennial ryegrass and white clover direct-drilled into a *Paspalum*-dominant dairy pasture treated with glyphosate. **New Zealand jour of agri res.** v. 36, n. 2, p. 197-207, 1993.

Tuffi Santos L, Santos IC, Oliveira CH, Santos MV, Ferreira FA, Queiroz DS. Levantamento fitossociológico em pastagens degradadas sob condições de várzea. **Planta Daninha** v. 22, n. 3, p. 343-349, 2004.

USDA- United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service, Vasey's Grass Plant Profile. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=PAUR2>. [Accessed March 22, 2020].

Vaio M, Mazzella C, Porro V, Speranza P, López-carro B, Estramil E, Folle GA. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. **Plant Systematics and Evolution** v. 265, n. 1-2, p. 109-121, 2007.

Zhou Q, Liu W, Zhang Y, Liu KK. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide biochemistry and physiology** v. 89, n. 2, p. 89-96, 2007.

Capítulo 3 – Caracterização morfoanatômica e genética de acessos de *Paspalum virgatum* L.

Resumo

O capim-navalha (*Paspalum virgatum* L.) é uma planta daninha importante em áreas de pastagem, causando prejuízos significativos aos pecuaristas, sendo considerada uma espécie de difícil controle. A caracterização dos acessos poderá descrever particularidades de interesse que estão diretamente relacionados a eficácia de herbicidas. Assim, objetivou-se identificar e caracterizar a morfoanatomia e a genética dos acessos de capim-navalha oriundos de diferentes localidades do Brasil. Foram coletados quatro acessos da espécie (PAVML, PAVRL, PAVME e PAVRE), submetidos a: ensaios biométricos e germinativos das sementes; caracterização anatômica, com cortes histológicos transversais; imagens topográficas das superfícies adaxial e abaxial; caracterização morfológicas das plantas nos estágios vegetativos e reprodutivos; determinação do teor de clorofila e quantificação da cera epicuticular dos acessos; determinação do nível de ploidia; e a estimativa do tamanho do genoma, pelo método da citometria de fluxo. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias ao teste de Tukey ($p > 0,05$). Os resultados demonstram que existem diferenças morfológicas, anatômicas e genéticas entre os acessos. Os acessos PAVRL e PAVML não apresentaram diferenças estatísticas entre si, mas foram diferentes dos acessos PAVME e PAVRE em diversas variáveis estudadas, como peso de mil sementes, comprimento da semente e coloração das sementes, comprimento da folha, ângulo de inserção das folhas, comprimento do parênquima, comprimento da nervura central, teor de clorofila e entre outras. Além disso, os acessos apresentam o valor 2C de 2,85pg. Contudo, acessos são identificados botanicamente como sendo exemplares de *Paspalum virgatum* L. O PAVRE e PAVME têm menor comprimento de lâmina foliar e todos os acessos são plantas tetraploides.

Palavras-chave: Biometria, capim-navalha, citometria de fluxo, cera epicuticular.

Abstract

Taquelzal (*Paspalum virgatum* L.) is an important weed in pasture areas, causing significant damage to ranchers, is considered difficult to control. The characterization of the accessions may describe particularities of interest that are directly related to the

effectiveness of herbicides. Thus, the objective was to identify and characterize morphoanatomical and genetic accessions of taquelzal (*Paspalum virgatum* L.) from different locations in Brazil. Four accessions of the species were collected (PAVML, PAVRL, PAVME, and PAVRE), and subjected to biometric and germinative tests of the seeds; anatomical characterization, with transversal histological sections; topographic images of the adaxial and abaxial surfaces; morphological characterization of the plants in the vegetative and reproductive stages; determination of the chlorophyll content; quantification of the epicuticular wax of the accessions; the determination of the level of ploidy; and the estimation of the size of the genome, by the method of flow cytometry. The data obtained were submitted to analysis of variance and the averages analyzed by the Tukey's test ($p > 0.05$). The results showed that there were differences among the accesses. PAVRL and PAVML access did not present statistical differences between them, however, they were different from the PAVME and PAVRE access, in several studied variables, such as weight of a thousand seeds, length of the seed and color of the seeds, leaf length, leaf insertion angle, parenchyma length, central vein length, chlorophyll content, and others. In addition, the accesses have a $2C$ value of $2.85pg$. Nevertheless, accessions were identified botanically as being examples of *Paspalum virgatum* L. The PAVRE and PAVME accesses had shorter leaf blade length, and all accessions are tetraploid plants.

Keywords: Biometrics, Taquelzal, flow cytometry, epicuticular wax.

1 Introdução

O gênero *Paspalum* pertencente a família Poaceae, é um importante gênero por incluir diversas espécies de importância econômica, sejam plantas destinadas a formação de pasto, sejam gramados esportivos ou como ornamentais. As espécies do gênero *Paspalum* são naturalmente distribuídas nas regiões tropical e subtropical (Cidade et al., 2013; Sartor, Quarin e Espinoza, 2009). No entanto, esse gênero também inclui importantes plantas daninhas, como, por exemplo, *Paspalum fasciculatum* Willd. ex. Fluegge (capim-Morí) e o *Paspalum virgatum* L. (capim-navalha) (Galvão et al., 2011; Andrade et al., 2012; Silva et al., 2020).

O capim-navalha é uma planta daninha perene, ereta, com até 150 cm de altura, fibrosa e não palatável aos animais; a reprodução é por sementes e rizomas, e geralmente o florescimento ocorre no verão. É uma infestante importante em áreas de pastagem, causando prejuízos significativos aos pecuaristas, sendo consideradas

plantas de difícil controle. É uma planta daninha que apresentam agressividade, com elevada capacidade de multiplicação por sementes, fácil adaptação a solos de baixa fertilidade, com atividade alelopática, mas o maior desafio para seu controle é relativo às semelhanças fisiológicas e morfológicas com as gramíneas usadas como plantas forrageiras (Silva et al., 2020; Marques et al., 2019; Lozenzi, 2008).

Entretanto, é uma espécie pouco estudada no meio científico, mas devido a sua importância como planta daninha e a dificuldade em realizar o seu manejo adequado, se faz necessária a caracterização de exemplares da espécie. A dificuldade de controle do *P. virgatum* pode estar relacionado também com os fatores intrínsecos da planta, como a anatomia e a morfologia e por fatores genéticos. Hani, Lebzada e Feni (2017) estudando plantas da família Poaceae, relataram que informações sobre as sementes podem auxiliar na identificação da espécie. Marques et al. (2012) estudaram espécies do gênero *Urochloa* e observaram que as plantas em estágio reprodutivo apresentaram alta porcentagem de parênquima, 60,34%, fazendo com que a absorção de herbicidas seja mais difícil. Alves et al. (2003) estudaram acessos da espécie capim-camalote (*Rottboellia cochinchinensis* Lour.) e constataram diferenças anatômicas e genéticas entre eles, como, por exemplo, o comprimento total dos cromossomos, poliploidia e a análise de DNA repetitivo que poderiam justificar a diferença na eficácia de controle químico desses acessos. Uma forma rápida e precisa para determinação do nível de ploidia é a determinação pelo método de citometria de fluxo. Para Galdeano et al. (2016), o uso dessa ferramenta para estimar o DNA nos núcleos das plantas facilitou a determinação e a velocidade de processamento de uma maior quantidade de material.

O DNA satélite ou repetitivo é importante para o estudo das plantas, uma vez que, devido a acumulação nas variações na sequência e no número de cópias durante a evolução, essa informação pode auxiliar na compreensão da organização, evolução e comportamento dos genomas, e com a adoção do sequenciamento da próxima geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS) permite analisar genomas complexos e decifrar o potencial dos DNA satélites (Garrido-Ramos, 2015; Mehrotra e Goyal, 2014; González, Chiapella e Urdampilleta, 2018). Diante disso, a caracterização de diversos acessos de *P. virgatum* poderá descrever características de interesse, como ângulo foliar, espessura da epiderme, comprimento da folha, dentre outros, que estão diretamente relacionados a eficácia de herbicidas aplicados em pós-emergência. Dessa forma, objetiva-se identificar e caracterizar morfoanatômica e geneticamente

os acessos de capim-navalha (*Paspalum virgatum* L.) oriundos de diferentes localidades do Brasil.

2 Material e métodos

As sementes de *P. virgatum* foram coletadas de plantas em dois estados do País, Mato Grosso e Pará, nos quais foram relatadas a infestação da espécie em área de pastagem, sendo que as plantas apresentavam diferenças visuais, ou seja, morfológicas, entre elas e eram consideradas de difícil controle pelos profissionais da área. No total, foram coletados quatro acessos, dois de cada estado, sendo um caracterizado com o limbo foliar mais estreito e outro mais largo. Dessa forma, denominou-se os acessos como: PAVML (Plantas coletadas no estado de Mato Grosso com limbo foliar mais largo), PAVME (Plantas coletadas no estado de Mato Grosso com limbo foliar estreito), PAVRL (Plantas coletadas no estado do Pará com limbo foliar mais largo, 8° 6'9.56"S Latitude 50° 20'48.74"O Longitude) e PAVRE (Plantas coletadas no estado do Pará com limbo foliar estreito, 8° 8'15.97"S Latitude 50° 24'27.21"O Longitude), na qual, havia sido relatado que as plantas com limbo foliar estreito eram que apresentavam menor taxa de controle.

As sementes de *P. virgatum* coletadas foram armazenadas em sacos de papel e transportadas ao laboratório. Foi realizada a limpeza e separação, em seguida, realizado o ensaio de teste de germinação das sementes e análise biométrica. Inicialmente, foram realizadas análises biométricas com 50 sementes de *P. virgatum* L. de cada acesso, separadas aleatoriamente de uma amostra composta e determinado o peso de mil sementes (PMS) obtido a partir dez subamostras de 100 sementes (BRASIL, 2009). Para a análise da germinação, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso em tratamento fatorial 4x3, constituído de quatro acessos e três tratamentos (T1- testemunha (Água em temperatura ambiente); T2- nitrato de potássio a 0,2%; T3- água à 60°C por cinco minutos), com quatro repetições de 100 sementes cada, totalizando 400 sementes por tratamento. O experimento foi conduzido em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) ajustada para temperatura constante de 30 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro.

Foram avaliados o percentual de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de plântulas normais (%PN), comprimento da parte

aérea (CPA) e da raiz das plântulas (CRP) (BRASIL, 2009). Para o cálculo do índice de velocidade de germinação foi utilizado a metodologia de Maguire (1962).

Para o teste germinativo, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial da marca Bioplant[®] (composto por turfa de *Sphagnum*, fibra de coco, casca de arroz, casca de *Pinus*, vermiculita, gesso agrícola, carbonato de cálcio, magnésio, termofosfato magnésiano (Yoorin) e aditivos (fertilizantes)). Foram depositadas 10 sementes por célula, devido a baixa porcentagem de germinação. Após 30 dias da semeadura, devido ao lento crescimento das plântulas, mantidas em casa de vegetação, estas foram transplantadas para copos plásticos com capacidade para 0,5 L contendo o mesmo substrato comercial.

Aos 15 dias após o transplântio (DAT), as mudas foram plantadas em vasos de cinco litros contendo uma mistura de terra e areia, na proporção de 2:1 v/v. Realizou-se a coleta de amostra da mistura de terra e areia para análise química (Tabela 1). Assim, uma parte das mudas foi mantida nos copos plásticos de 0,5 L visando o uso em análises laboratoriais e a outra parte em vasos de 5,0 L para os experimentos de controle químico. Além disso, todos os meses foram semeadas sementes dos quatro acessos em bandejas plásticas contendo areia, de modo que fosse possível obter plantas em diversos estádios de desenvolvimento. As plantas foram irrigadas diariamente e receberam complementação nutricional por meio da adição da solução de Hoagland e Arnon (1950) na concentração de 50%. As plantas que estavam em vasos foram adubados com base na recomendação para adubação de pastagens formada por *Urocloa brizantha*.

Tabela 1. Análise química da amostra coletada do substrato (terra e areia) utilizada durante a condução dos experimentos.

pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	Na	K	Al	H+Al	S.B.	CTC	Sat.	Sat.	
									SMP	S.B.		Bases	Al	
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----mmol _c dm ⁻³ -----						-----				V%	m%
5,5	12	12	6	18	9	NS	6,9	0	19	34,5	53,5	64	1	

SMP: valor do pH equilíbrio obtido na suspensão do solo com a solução tampão. SB: Soma de Bases. NS: Não solicitado.

2.1 Caracterização morfológica e anatômica dos quatro acessos

Aos 60 dias após o transplante (DAT), as plantas que se encontravam em pleno estágio vegetativo foram separadas em dez plantas de cada acesso e mensurado o teor relativo de clorofila total (ClorofiLog, Falker) na terceira folha totalmente expandida. Em seguida, os exemplares dos quatro acessos foram separados e preparadas as exsiccatas do material vegetal para envio e identificação botânica oficial do Instituto de Botânica de São Paulo.

Para o estudo anatômico, foram coletadas folhas totalmente expandidas dos quatros acessos, quando as plantas estavam em pleno estágio vegetativo. Para tanto, foram feitos cortes de 1 cm² na terceira folha totalmente expandida e preparadas, para posterior mensuração e análises anatômicas. O material de estudo anatômico consistiu em três repetições por acesso, sendo cada repetição constituída de três sub-repetições e cada lâmina continha quatro recortes. Foram fixados em solução de FAA 50 (Álcool etílico + Ácido acético glacial + Formaldeído+ Água destilada) por 48 horas e armazenados em solução de etanol a 70% e preparadas as lâminas, de acordo com a metodologia descrita por Johansen (1940). Os cortes histológicos foram realizados usando um micrótomo rotativo (10 micrometros), utilizando a albumina de Mayer como adesivo (uma parte composta por clara de ovo, 1,0 mL de glicerina e 0,5g de salicilato de sódio). Posteriormente, foram feitas a coloração de azul de toluidina e a desparafinação, seguindo a metodologia descrita por Sakai (1973). As estruturas anatômicas foram observadas em microscópio óptico (Bel Photonics, Monza, Itália), com aumento de 10x e 40x, as imagens foram fotografadas por meio da câmera acoplada no equipamento. Além disso, foram feitas imagens fotográficas utilizando contraste de modulação Hoffman (microscopia HMC).

Na visualização das folhas dos quatros acessos foram utilizadas folhas totalmente expandidas das plantas adultas em pleno estágio vegetativo. Sendo assim, após a coleta, o material foi fixado em glutaraldeído na concentração de 3% em tampão fosfato a 0,1 M com pH 7,2 por 72 horas na temperatura de 4 °C. Após esse período, o material foi lavado para retirada completa do glutaraldeído em solução tampão por três vezes. Em seguida, foi acrescentado o tetróxido de ósmio na concentração de 1% por aproximadamente 16 horas, retirou-se a solução e desidratou-se o material em solução alcoólica nas concentrações de 30, 50, 70, 90 e 100%, de modo crescente, sendo que o tempo em cada concentração foi entorno de 20 minutos. Em seguida, o material foi colocado em stanbes para serem levados para secagem em ponto crítico. Posteriormente, as amostras foram metalizadas em ouro.

Após o preparo dos stanbes foram feitas as fotografias da superfície adaxial e abaxial dos acessos, de modo a visualizar a topografia da lâmina foliar, estômatos, bordas, tricomas e pelos.

O estudo morfológico consistiu na mensuração de características essenciais para diferenciação dos acessos e, para tanto, foram separadas quinze plantas de cada acesso, em dois estágios de desenvolvimento, vegetativo (90 dias após o transplântio) e reprodutivo (515 dias após o transplântio). Em cada planta foram mensurados o comprimento e a largura da terceira folha totalmente expandida com auxílio de uma régua graduada em centímetros, determinado o ângulo de inserção da folha com um transferidor de grau. Apenas nas plantas em estágio reprodutivo foram mensurados o comprimento e largura das espiguetas, e comprimento e largura das inflorescências.

2.2 Quantificação da cera epicuticular dos acessos

Para a quantificação da cera epicuticular dos acessos, foram utilizadas plantas adultas em pleno estágio vegetativo. A metodologia utilizada foi descrita por Ebercon, Blum e Jordan (1976). Inicialmente, foram coletadas folhas dos quatros acessos e levadas ao laboratório, onde o material foi cortado e pesado, de modo que houvesse o equivalente a 0,5, 0,7, 0,8, 1,00 e 1,20 gramas de folhas fresca. Portanto, os tratamentos foram constituídos de quatros acessos de *P. virgatum* e o PEG (Polyethylene glycol, Dinâmica®) como tratamento padrão, em três repetições. Assim, foi realizada a diluição do dicromato de potássio em água deionizada e, posteriormente, adicionada ao ácido sulfúrico PA e aquecido em banho-maria. As folhas foram submersas em clorofórmio por 15 segundos e o extrato obtido foi filtrado e evaporado em banho maria. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL da solução de dicromato de potássio + ácido sulfúrico e aquecido em banho maria por 30 minutos; após o resfriamento, foram adicionados 5,0 mL de água deionizada. Para a estimativa do teor, foi realizada a extrapolação em regressão da curva padrão, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 590 nm.

2.3 Determinação do nível de ploidia e análise de DNA satélite dos acessos

O nível de ploidia dos acessos foi determinado utilizando a técnica de citometria de fluxo. Foram coletadas folhas de plantas jovens, saudáveis e sem injúrias de 40 indivíduos de *P. virgatum*, ou seja, foram dez indivíduos por acesso, para a

determinação do nível de ploidia de DNA e a mensuração do valor 2C nuclear. Como planta padrão foi utilizado *Solanum lycopersicum* L., 1753, 'Stupické' (2C = 2,00 pg, Praça-Fontes et al., 2011). Um fragmento foliar de ~2 cm² de cada indivíduo dos quatro acessos e do padrão interno foram simultaneamente retalhados (Galbraith et al., 1983) por cerca de 30s em placa de Petri contendo 0,5 mL do tampão OTTO-I (Otto, 1990) suplementado com 50 µg mL⁻¹ RNase e 2 mM ditioneitol (Praça-Fontes et al., 2011), e incubados por 3 min 0,5 mL do mesmo tampão foi adicionado e a suspensão foi filtrada em filtro de nylon (Partec®) de 30 µm de diâmetro num microtubo de 2,0 mL.

Após centrifugação a 100 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e 100 µL do mesmo tampão foram adicionados ao precipitado; o material foi homogeneizado em vortex e incubado durante 10 min. Posteriormente, 0,5 mL do tampão de coloração OTTO-II (Otto, 1990; Praça-Fontes et al., 2011) modificado (400 mM Na₂HPO₄.H₂O, 2 mM ditioneitol, 50 µg mL⁻¹ RNase, e 75 µg mL⁻¹ iodeto de propídeo –IP – comprimentos de onda de excitação/emissão: 480–575/550–740 nm) foi adicionado às suspensões. As suspensões foram filtradas em malha de nylon (Partec®) de 20 µm para os tubos de leitura (Partec®) e mantidas por 30 min no escuro para coloração dos núcleos.

Em seguida, as suspensões foram analisadas em citômetro de fluxo (BD Accuri C6 flow cytometer, Accuri cytometers, Belgium) equipado com laser 488 nm para promover excitação do IP e emissão deste para os filtros FL2 (615 – 670 nm) e FL3 (> 670 nm). Os picos de fluorescência dos núcleos G0/G1 de cada indivíduo de *Paspalum virgatum* e do padrão interno foram analisados a partir de histogramas utilizando o software BD Accuri™ C6.

Os picos G0/G1 com coeficiente de variação (CV) menor do que 5% foram considerados para a determinação do nível de ploidia de DNA e o mensuramento do conteúdo de DNA nuclear. Para o cálculo do conteúdo de DNA nuclear de cada indivíduo de *Paspalum virgatum* em picogramas (pg) foi utilizada a seguinte fórmula:

$$2C\ DNA = \frac{\left[\left(\text{mean position} \frac{G0}{G1} \text{ Paspalum virgatum} \right) * 2C\ DNA\ \text{espécie padrão} \right]}{\left(\text{mean position} \frac{G0}{G1} \text{ S. lycopersicum} \right)}$$

Onde,

2C DNA é o conteúdo de DNA de cada indivíduo de *Paspalum virgatum* em picogramas (pg), na qual, um picograma equivale a 978 megabases (Mb).

Mean position é o canal médio do pico G0/G1 de cada indivíduo de Paspalum virgatum ou da espécie padrão.

2C DNA espécie padrão é o valor do conteúdo de DNA da espécie padrão utilizada, ou seja, o valor já conhecido.

Para a extração de DNA, foram coletadas folhas saudáveis de três indivíduos de cada um dos quatro acessos de *P. virgatum*. As folhas foram cortadas e maceradas no cadinho submersos em nitrogênio líquido até obter um pó fino. Imediatamente, as amostras foram transferidas para o tubo do tipo Eppendorf, mantidas refrigeradas em nitrogênio líquido, de modo que as amostras não descongelassem. Para tanto, foram utilizados dois protocolos para o isolamento do DNA: O Dneasy Plant mini kit (Qiagen®) e a extração por tampão CTAB.

O Dneasy Plant mini kit - nas amostras armazenadas em nitrogênio líquido foram adicionados 400 µL do tampão AP1 e a solução estoque de Rnase A (100 mg/mL) em 20 mg de tecido vegetal seco e misturada imediatamente no vortex. Depois, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos e invertendo os tubos, para que assim ocorresse a quebra das células. Para precipitar as proteínas e os polissacarídeos adicionou-se 13000µL do tampão A2 e incubado em gelo por 5 minutos, após os quais o lizado foi colocado nas colunas de “QIAshredder spin” colocada sobre um tubo de coleta de 2ml e centrifugado por 2 minutos; ao líquido filtrado foi adicionado 1,5 volumes do tampão AP3/E e misturado, centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm e descartado o sobrenadante. Posteriormente, foram adicionados 500µL do tampão AW e centrifugado por 8000 rpm; ao final, adicionou-se 100 µL do tampão AE pré-aquecido a 65°C e centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20°C.

A extração por tampão CTAB - extenuou maior tempo em relação ao protocolo anterior, pois primeiro o tampão CTAB teve que ser preparado com Tris HCl, NaCl, CTAB, EDTA e PVP. As amostras mantidas em nitrogênio líquido foram adicionadas 1% (v/v) de mercaptoenol e, em seguida, adicionada a solução do tampão CTAB pré-aquecido a 65°C, as amostras com a solução foram agitadas por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de clorofórmio-etanol (proporção 24:1) e homogeneizadas rapidamente no vortex, e centrifugada a 9500rpm, por 10 minutos a 20°C. A fase aquosa foi transferida para tubos novos e adicionados 2/3 do volume de

isopropanol e, após 30 minutos, foram centrifugadas a 9500rpm na temperatura constante de 20°C por 15 minutos.

Os sobrenadantes foram descartados e a cada pellet foi adicionada a solução de lavagem, composta por etanol e acetato de amônia; novamente descartou-se o sobrenadante e os pellets foram colocados em superfície lisa e esterilizados para secagem. Depois, adicionou-se 1 mL de TE, etanol e acetato de amônia por 30 minutos, após a centrifugação a 9500rpm, por 4 minutos a 20°C, descarta-se novamente o sobrenadante, ressuspendeu o pellet gelatinoso em 200 µL de TE. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente “overnight” e armazenadas sob refrigeração a -20°C.

Em ambos os protocolos, as amostras foram quantificadas e analisadas quanto a pureza, com auxílio do equipamento NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific™). Posteriormente, foram armazenadas em caixas de isopor contendo gelo seco para envio para empresa responsável pelo sequenciamento.

Portanto, os genomas de triplicata dos quatro acessos de *P. virgatum* foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina NovaSeq 6000 (2x150 pb). Os *reads* obtidos desses sequenciamentos foram utilizados para a análise comparativa de famílias de DNA Satélites presentes nessa espécie. Todos esses *reads* foram processados, filtrados e entrelaçados por meio da utilização das ferramentas disponíveis na plataforma Galaxy/RepeatExplorer (Novák et al. 2013). Para otimizar o processamento dessas análises, criou-se três grupos diferentes desses sequenciamentos que contém o genoma de todos os acessos: a) PAVME_1, PAVRE_1, PAVML_1 e PAVRL_1; b) PAVME_2, PAVRE_2, PAVML_2 e PAVRL_2; e c) PAVME_3, PAVRE_5, PAVML_3 e PAVRL_3.

Em cada grupo foram realizados os seguintes procedimentos dentro da plataforma: a) as opções padrões presentes na ferramenta “*Preprocessing of FASTQ paired-end-reads*” com uma amostragem de 500.000 *reads* para cada triplicata; b) a ferramenta “*Concatenate Datasets tail-to-head*” para concatenar os sequenciamentos de cada grupo; e c) a ferramenta “*RepeatExplorer2 clustering*” utilizando a opção avançada *Perform Comparative Analysis* para gerar a cluterização baseada em gráficos.

Como resultado final foram apresentadas todas as possíveis famílias de DNA satélites presentes nos 4 acessos e a comparação da estimativa da abundância de cada uma dessas famílias. No primeiro momento, o resultado foi obtido

separadamente em cada um dos três grupos citados acima, depois foi feita a média aritmética da abundância dos mesmos DNAs satélites presentes nesses grupos. Para este estudo, foram selecionadas as sete famílias mais abundantes de DNAs satélites com o objetivo de fazer uma primeira análise exploratória sobre as sequências repetitivas entre os diferentes acessos e suas características fenotípicas.

Para comprovar que as sete famílias de DNAs satélite selecionadas são diferentes, foi construído um gráfico DotPlot por meio do software jdotter (Brodie, Roper e Upton, 2004) cruzando os motivos consensos das famílias gerado pelo Galaxy/RepeatExplorer (Novák et al. 2013) contra si mesmas.

2.4 Análise estatística

Os dados obtidos do ensaio de germinação foram submetidos a análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade e ao teste de Bartlett a 5% de probabilidade no intuito de verificar a homogeneidade da variância. Em seguida, foram realizadas a análise de variância pelo teste F, havendo significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para os dados das avaliações anatômicas e morfológicas foram feitas a análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade e ao teste de Bartlett a 5% de probabilidade no intuito de verificar a homogeneidade da variância. As variáveis comprimento e largura do parênquima, espessura abaxial e adaxial, ângulo de inserção no estágio reprodutivo e largura das espiguetas consideradas não normais foram transformadas pelo método Box-Cox estimada e aplicada como proposto por Hawkins e Weisberg (2017). Em seguida foram realizadas a análise de variância pelo teste F, havendo significância as médias foram comparadas ao teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os dados de quantificação da cera epicuticular foram submetidos a análise de regressão para realização da curva padrão e em seguida as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), utilizando o software Agroestat (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015).

3 Resultados

De modo geral, os acessos PAVML, PAVME, PAVRL e PAVRE apresentaram diferenças significativas entre si em vários aspectos importantes para caracterização morfoanatômica, como, porcentagem de germinação, índice de velocidade de

germinação, porcentagem de plântulas normais, teor relativo de clorofila, comprimento da nervura central, comprimento das folhas, ângulo de inserção das folhas, quantificação da cera epicuticular das folhas.

Na análise de sementes pode-se observar diferenças significativas para as variáveis estudadas. O comprimento da semente apresentou diferenças entre os acessos ($p>0,0001$). Os acessos PAVRL e PAVML não foram diferentes entre si, mas foram diferentes dos acessos PAVME e PAVRE; no entanto, os acessos PAVRE e PAVME foram diferentes entre si, com o menor comprimento de semente sendo observado para o acesso PAVRE (Tabela 2). Para a largura da semente, o fator acesso apresentou diferenças significativas ($p>0,0001$); sendo assim, todos os acessos foram diferentes entre si, com o menor valor para o acesso PAVRE, seguido dos acessos PAVME, PAVML e PAVRL (Tabela 2).

Para o peso de mil sementes, observou-se que o acesso, apresentou significância ($p>0,0001$). Os acessos PAVRE e PAVME não resultaram em diferenças estatísticas entre si, mas foram diferentes do PAVML e PAVRL, sendo estes diferentes entre si, sendo o maior valor de peso de mil sementes observado para o acesso PAVRL com 0,227g (Tabela 2).

Tabela 2–Valores médios de comprimento das sementes (CS), largura das sementes (LS) e peso de mil sementes (PMS) dos quatro acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acesso	CS (mm)	LS (mm)	PMS (g)
PAVRL	2,53 ± 0,17a	1,71± 0,09a	0,227± 0,029 a
PAVRE	1,50 ± 0,20c	1,04± 0,08d	0,0895±0,030 c
PAVML	2,39 ± 0,24a	1,56± 0,07b	0,1686±0,026 b
PAVME	2,07 ± 0,16b	1,40± 0,06c	0,0974±0,027 c
CV (%)	19,34	14,33	2,85
Cav	P valor	P valor	P valor
Acesso	0,0001**	0,0001**	0,0001**

Cav= causas da variação. CV= coeficiente da variação em porcentagem. pelo teste F. ** significativo a 1% de probabilidade. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Visualmente, é possível observar diferenças na coloração das sementes e os tamanhos diferentes (Figura 1). Os acessos PAVRL e PAVML apresentam sementes maiores com coloração marrom, mas os acessos PAVME e PAVRE apresentam coloração marrom-claro, e também menor tamanho.



Figura 1- As sementes dos quatro acessos da espécie *Paspalum virgatum* L. (A) exemplar do acesso PAVML. (B) exemplar do acesso PAVME. (C) exemplar do acesso PAVRL. (D) exemplar do acesso PAVRE.

No estudo germinativo das sementes, houve diferenças significativas ($p > 0,0001$) para o fator acesso, e para o fator tratamentos na variável porcentagem de germinação. Em geral, a maior valor de porcentagem de germinação obtida foi de aproximadamente 23%. Os acessos PAVRL e PAVML apresentaram maior porcentagem de germinação.

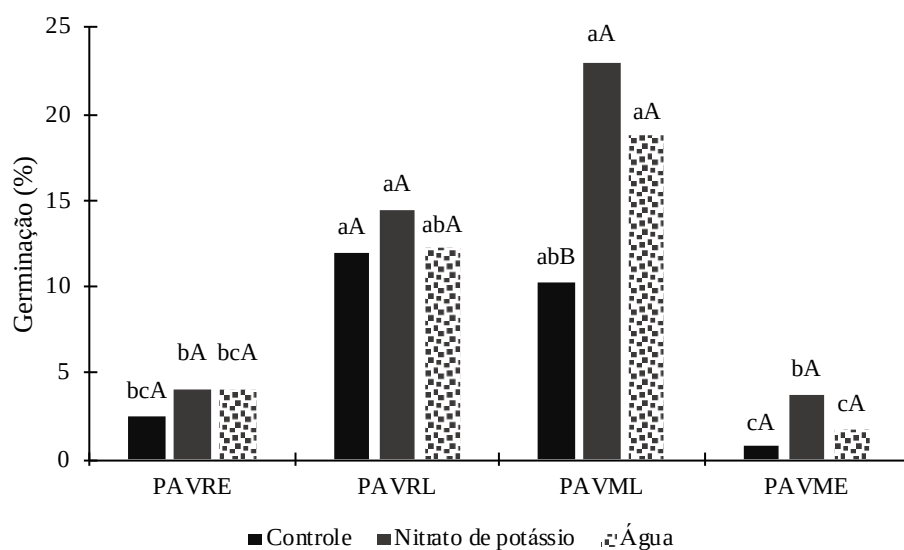


Figura 2 – Percentagem de germinação dos acessos em função dos tratamentos das sementes. Letras minúsculas estão comparando os acessos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) dentro de cada tratamento. Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro de cada acesso. Coeficiente de variação (%) 17,83.

O índice de velocidade de germinação (IVG) é importante por permitir compreender o estabelecimento das plântulas em uma determinada área. Sendo assim, para os acessos estudados foram observadas diferenças estatísticas entre os acessos. Assim, comparando os acessos, o PAVRL e PAVML apresentaram maior IVG (Figura 3 A). Assim como a maior porcentagem de germinação foi para os acessos PAVML e PAVRL, o maior número de plantas normais foi para esses acessos, com aproximadamente com cinco plântulas normais por repetição (Figura 3 B).

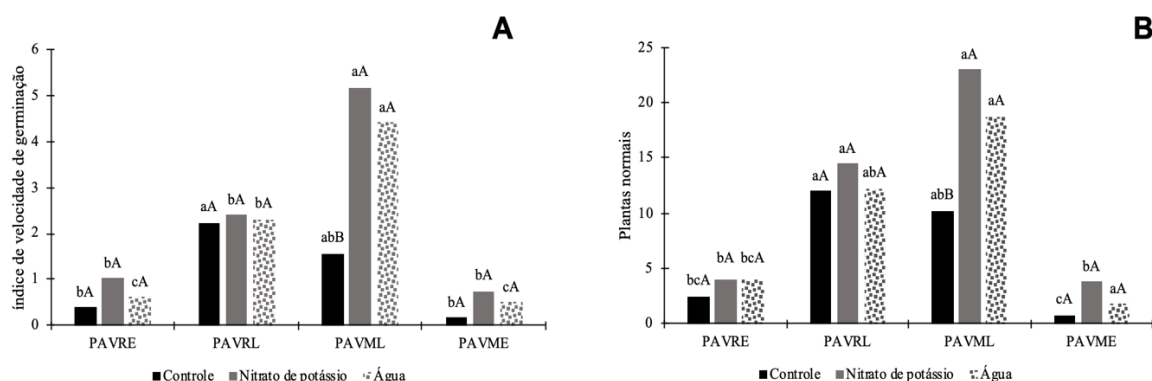


Figura 3- Índice de velocidade de germinação (A) e Plântulas normais (B) dos acessos em função dos tratamentos de sementes. Letras minúsculas estão comparando os acessos pelo teste de Tukey ($p>0,05$) dentro cada tratamento. Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro cada acesso. Coeficiente de variação (%) 48,91.

Para o comprimento da parte aérea e da raiz não foi observada significância para os acessos, apenas para os tratamentos ($p>0,001$). O acesso PAVME apresentou resposta diferente aos tratamentos pré-germinativos utilizados no estudo, sendo que o uso do nitrato de potássio a 2% resultou em plântulas maiores que os demais tratamentos utilizados, com aproximadamente 59 mm de comprimento (Figura 4 A). Como citado acima, o comprimento da raiz não resultou em diferenças estatísticas (Figura 4 B).

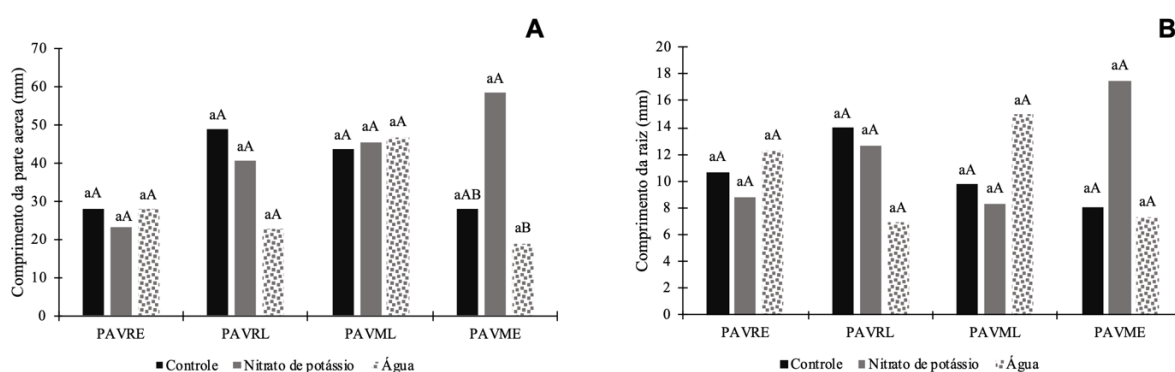


Figura 4- Comprimento da parte aérea (A) e da raiz (B) dos acessos em função do tratamento das sementes. Letras minúsculas estão comparando os acessos pelo teste de Tukey ($p>0,05$) dentro de cada tratamento. Letras maiúsculas comparam os

tratamentos dentro de cada acesso. Coeficiente de variação para comprimento da parte aérea e raiz: 39,09 e 46,60%, respectivamente.

3.1 Caracterização morfológica e anatômica dos quatro acessos

A identificação botânica das exsicatas dos acessos foi feita no Instituto Botânico de São Paulo. Foram identificados os quatro acessos enviados como pertencentes à família Poaceae, subfamília Panicoideae A. Braun, tribo Paspaleae J. Presl, gênero *Paspalum*, espécie *Paspalum virgatum* L (Anexo 1).

Em relação ao teor relativo de clorofila total, houve diferenças significativas ($p > 0,001$) para os acessos. Assim, o acesso PAVRE diferiu do acesso PAVRL, sendo que o PAVRE apresentou maior teor de clorofila; para os demais acessos não houve diferenças significativas (Figura 5).

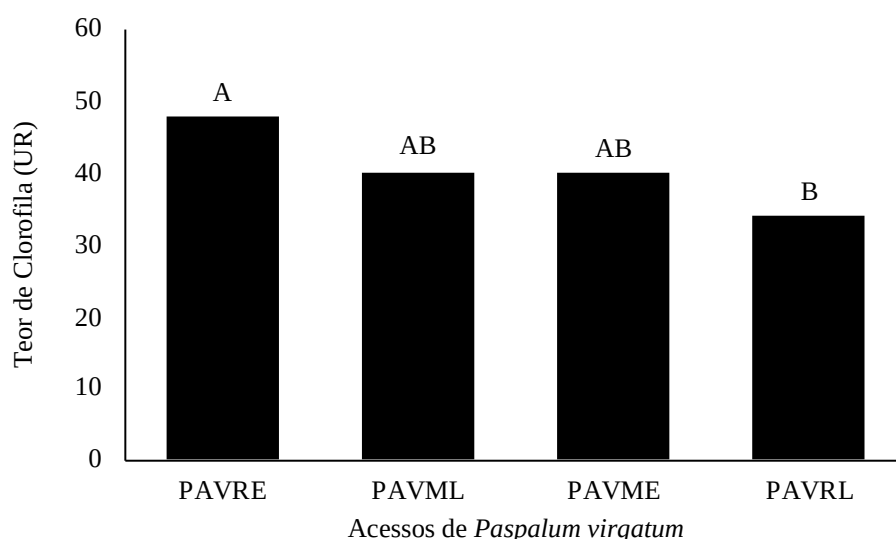


Figura 5- Teor relativo de clorofila total em folhas de acessos de *Paspalum virgatum* L. Coeficiente de variação = 13,23%.

As imagens topográficas das superfícies adaxial e abaxial da lâmina foliar dos quatro acessos permitem observar a disposição de estruturas importantes, como tricomas, estômatos entre outros. Na Figura 6 nota-se o detalhe da estrutura da borda da lâmina foliar comparando os quatros acessos. A borda das folhas dos acessos apresenta uma estrutura pontiagudas em forma de serra, com três fileiras, com as pontas postas no mesmo sentido (Figura 6). Essas estruturas são responsáveis pelo nome popular atribuído à espécie (capim-navalha); além disso, são responsáveis por

causar ferimentos ao couro dos animais e em humanos, além de causar danos em alguns casos irreversíveis ao aparelho digestivo dos animais que pastejam na área com a presença desta planta. Assim, em todos os acessos é possível observar a presença de poucos pelos curtos em ambas as superfícies, as células dispostas perpendicular as nervuras central e secundária da folha (Figura 7, 8, 9 e 10). Em ambas as superfícies e em todos os acessos observar-se a presença de estômatos abertos e fechados, com células subsidiárias turgidas ao redor dos estômatos, e também a visualização da disposição da cera epicuticular na superfície adaxial e abaxial da folha.

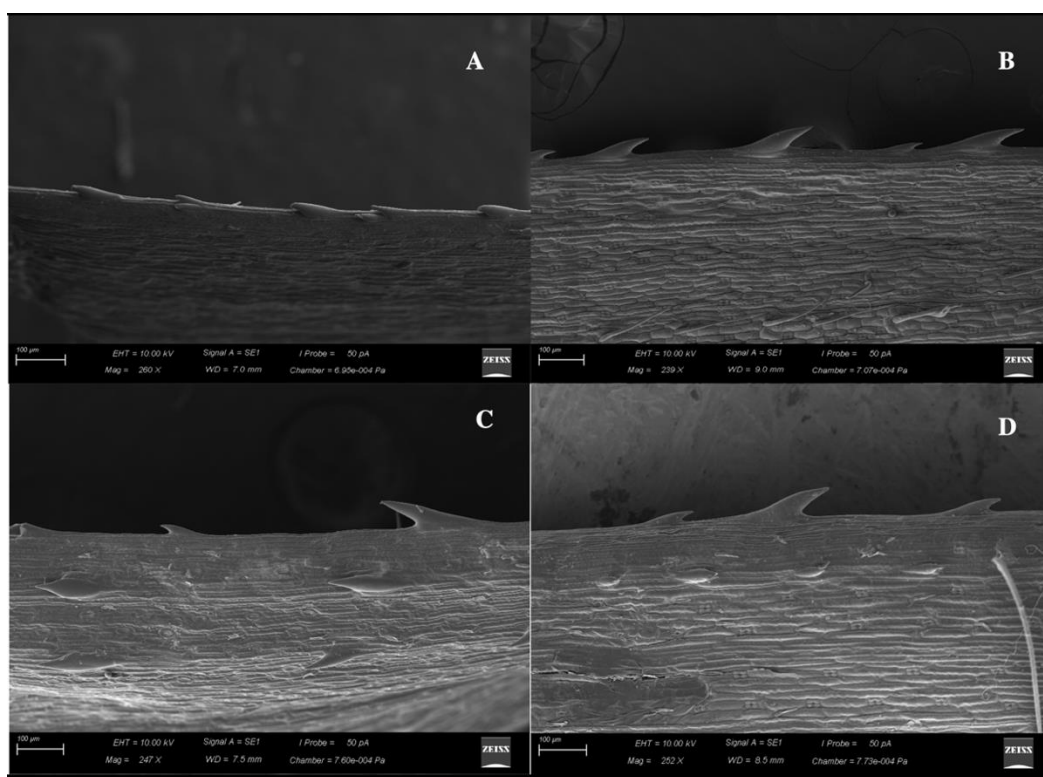


Figura 6 - Detalhe da borda serrada da lâmina foliar dos acessos de *Paspalum virgatum* L. A- PAVME. B- PAVML. C-PAVRE. D- PAVRL.

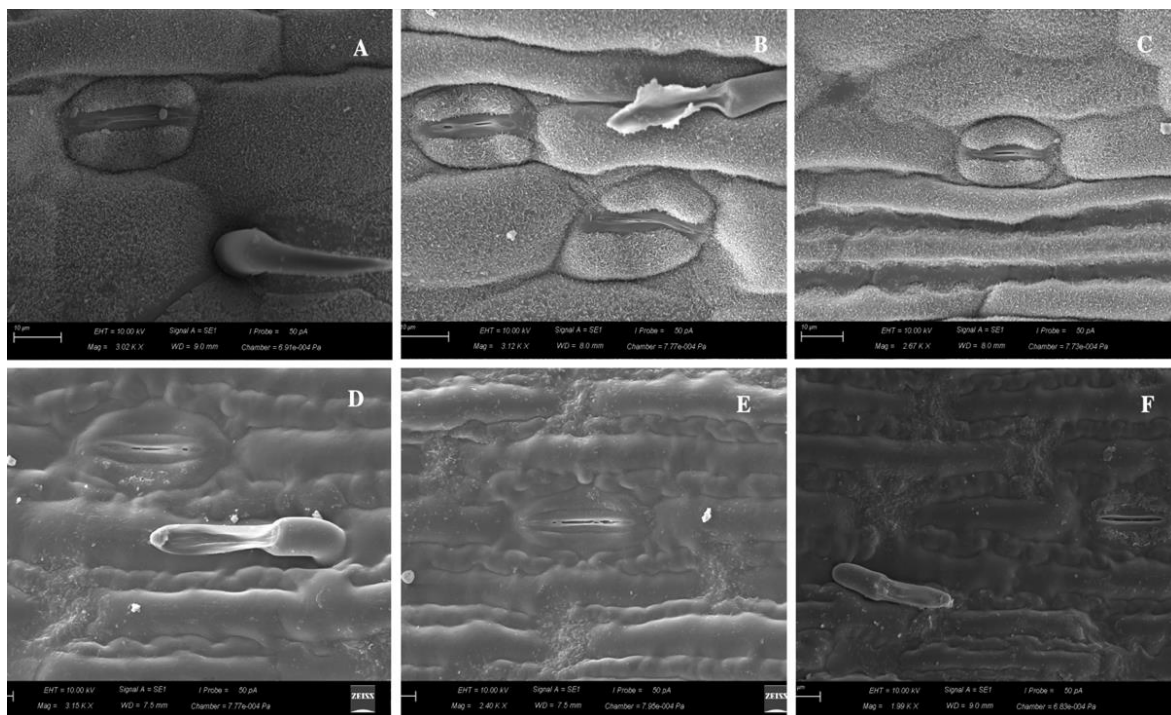


Figura 7- Visão da superfície adaxial e abaxial de *Paspalum virgatum* L., acesso PAVME. A, B e C superfície adaxial do acesso PAVME. D, E e F superfície abaxial do acesso PAVME.

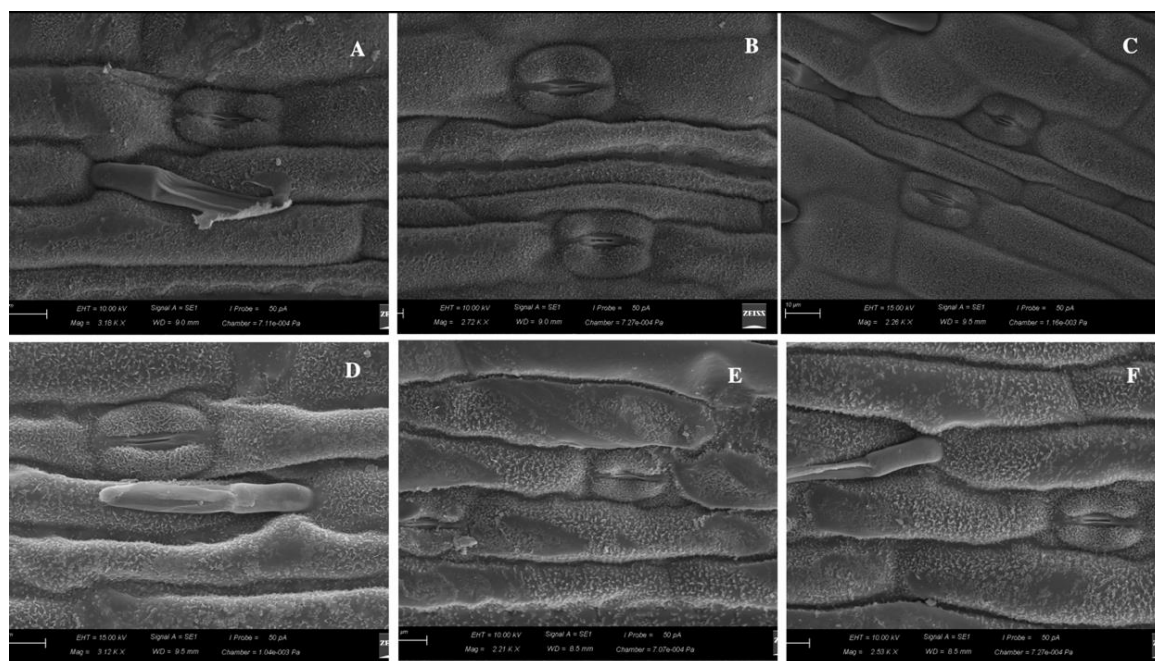


Figura 8- Visão da superfície adaxial e abaxial de *Paspalum virgatum* L., acesso PAVML. A, B e C superfície adaxial do acesso PAVML. D, E e F superfície abaxial do acesso PAVML.

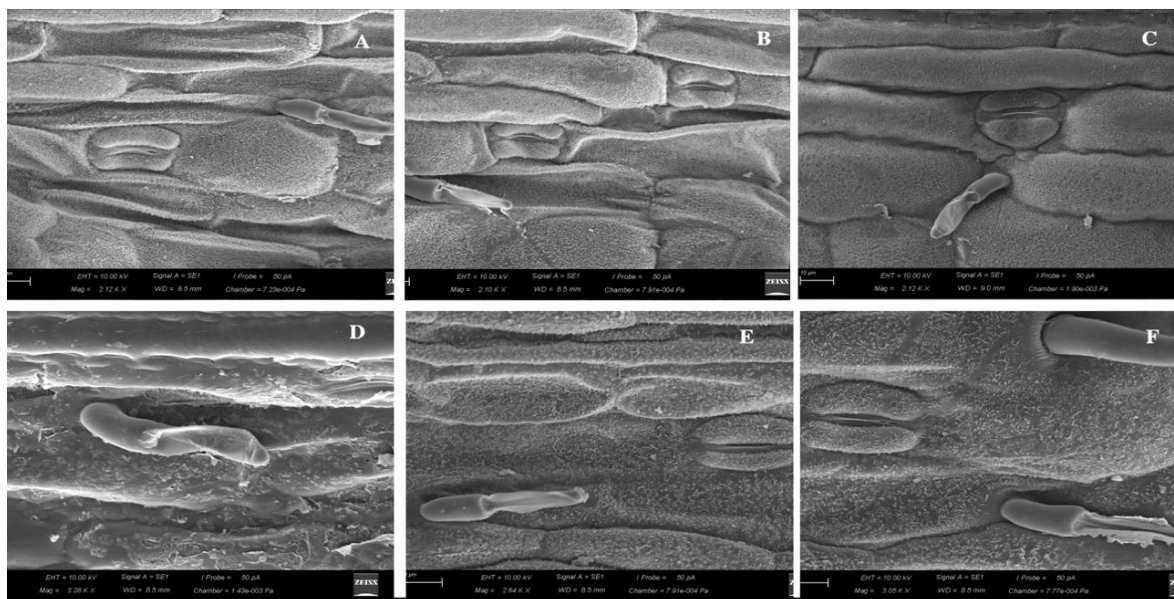


Figura 9- Visão da superfície adaxial e abaxial de *Paspalum virgatum* L., acesso PAVRE. A, B e C superfície adaxial do acesso PAVRE. D, E e F superfície abaxial do acesso PAVRE.

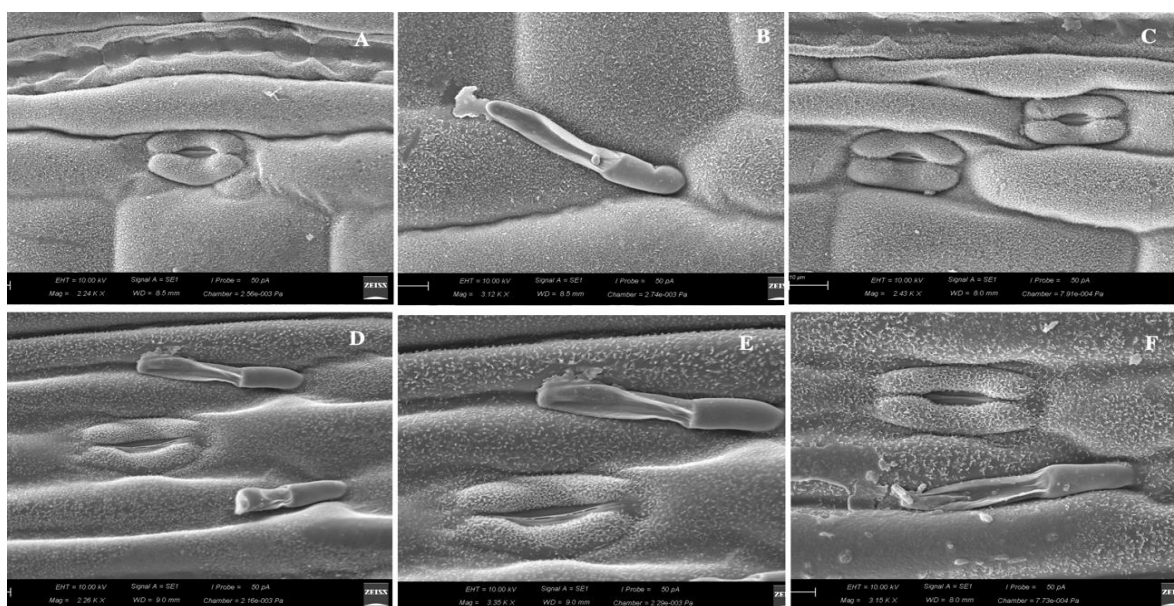


Figura 10- Visão da superfície adaxial e abaxial de *Paspalum virgatum* L., acesso PAVRL. A, B e C superfície adaxial do acesso PAVRL. D, E e F superfície abaxial do acesso PAVRL.

Na Figura 11 o corte histológico transversal das folhas dos acessos evidencia a diferença entre as lâminas foliares. O PAVME e PAVRE apresentam a estrutura foliar mais estreita e arqueada, ou seja, com a curvatura maior quando comparada

com a estrutura foliar dos acessos PAVML e PAVRL. Essa característica é importante por apresentar a diferença visual observada em campo e também podendo relacionar com outras variáveis mensurados neste estudo.

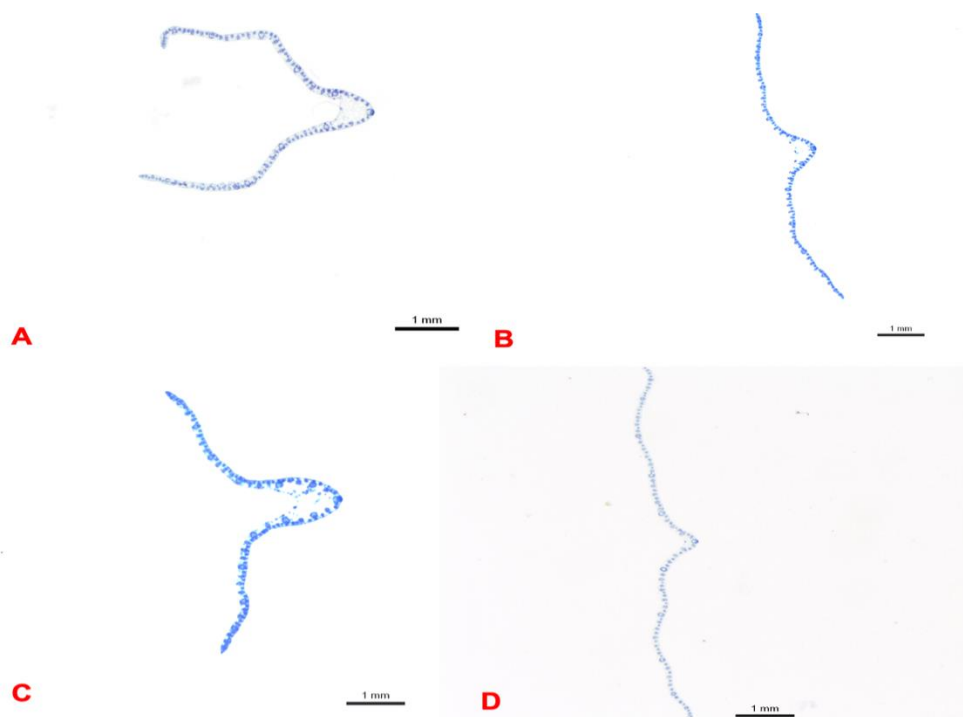


Figura 11- Cortes transversais da folha dos acessos de *Paspalum virgatum* L. (A) Acesso PAVME. (B) Acesso PAVML. (C) Acesso PAVRE. (D) Acesso PAVRL.

No corte histológico transversal dos quatro acessos permite comparar visualmente a quantidade de células parenquimáticas, evidenciando as diferenças existentes entre os acessos. O acesso PAVRL (Figura 12 D) apresentou menor comprimento do centro da lâmina foliar. Na Figura 13, com a imagem ampliada, é possível observar a disposição dos feixes vasculares (floema e xilema), a estrutura de sustentação e as células ao redor da bainha do feixe vascular mostrando a estrutura do limbo foliar de uma característica planta com mecanismo de fotossíntese C4. Já a Figura 14 mostra a extensão da folha, com a disposição dos feixes vasculares primários e secundários, a presença de células buliformes que são células motoras grandes próximo da epiderme das folhas, características de folhas monocotiledôneas, como da família Poaceae. Além disso, nota-se a espessura da epiderme, diferente entre os acessos, e as faces adaxial e abaxial.

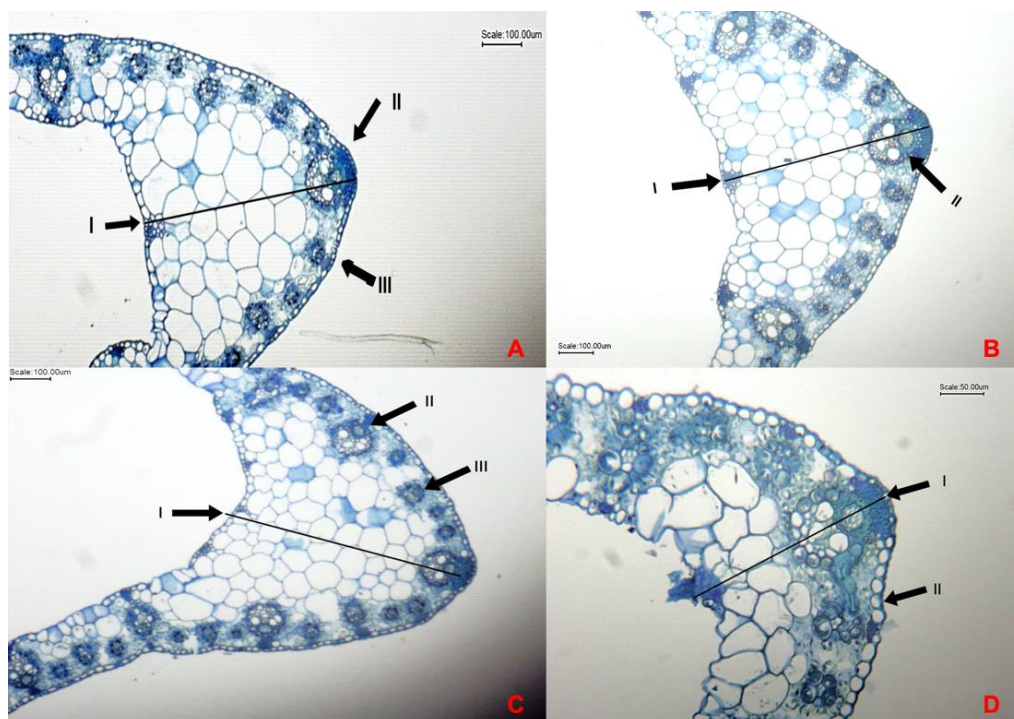


Figura 12- Cortes transversais da folha dos acessos de *Paspalum virgatum* L. (A) Acesso PAVME: I- Comprimento do centro da lâmina foliar. II- Tecido de sustentação. III- Feixes vasculares secundários. (B) Acesso PAVML: I- Comprimento do centro da lâmina foliar. II- Feixe vasculares. (C) Acesso PAVRE: I- Comprimento do centro da lâmina foliar. II e III- Feixes vasculares secundários. (D) Acesso PAVRL: I- Comprimento do centro da lâmina foliar. II- Feixe vasculares secundários.

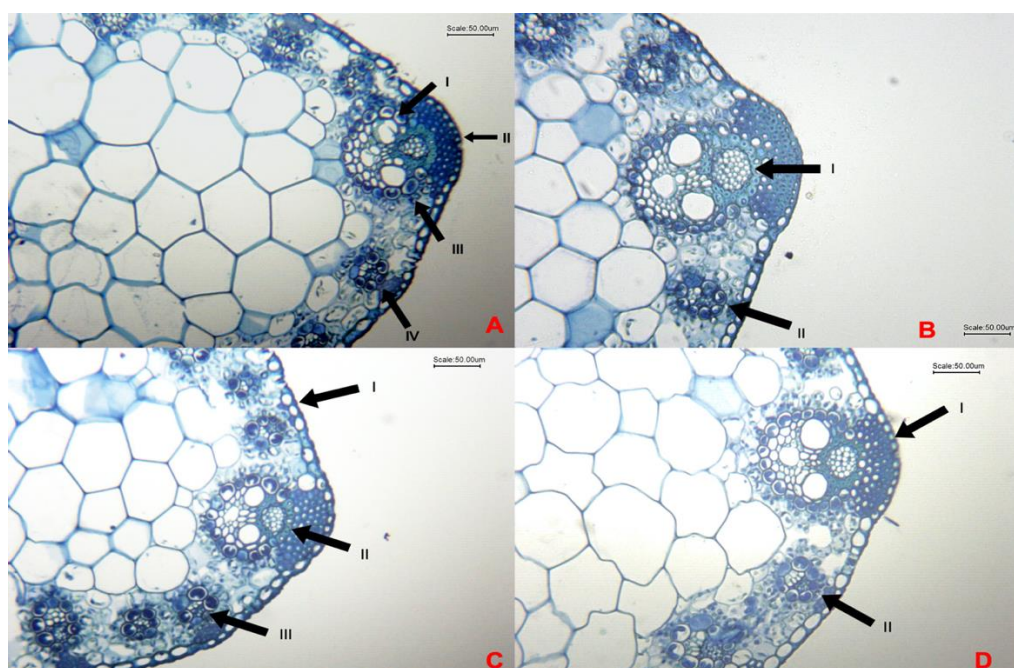


Figura 13- Cortes transversais da folha dos acessos de *Paspalum virgatum* L. (A) Acesso PAVME: I- Feixes vasculares. II- Tecido de sustentação. III- células da bainha

do feixe vascular. IV- Feixe vasculares secundários. (B) Acesso PAVML: I- Feixes vasculares. II- Feixe vasculares secundários. (C) Acesso PAVRE: I- Epiderme abaxial. II- Feixes vasculares. III- células da bainha do feixe vascular. (D) Acesso PAVRL: I- Feixes vasculares. II- Feixe vasculares secundários.

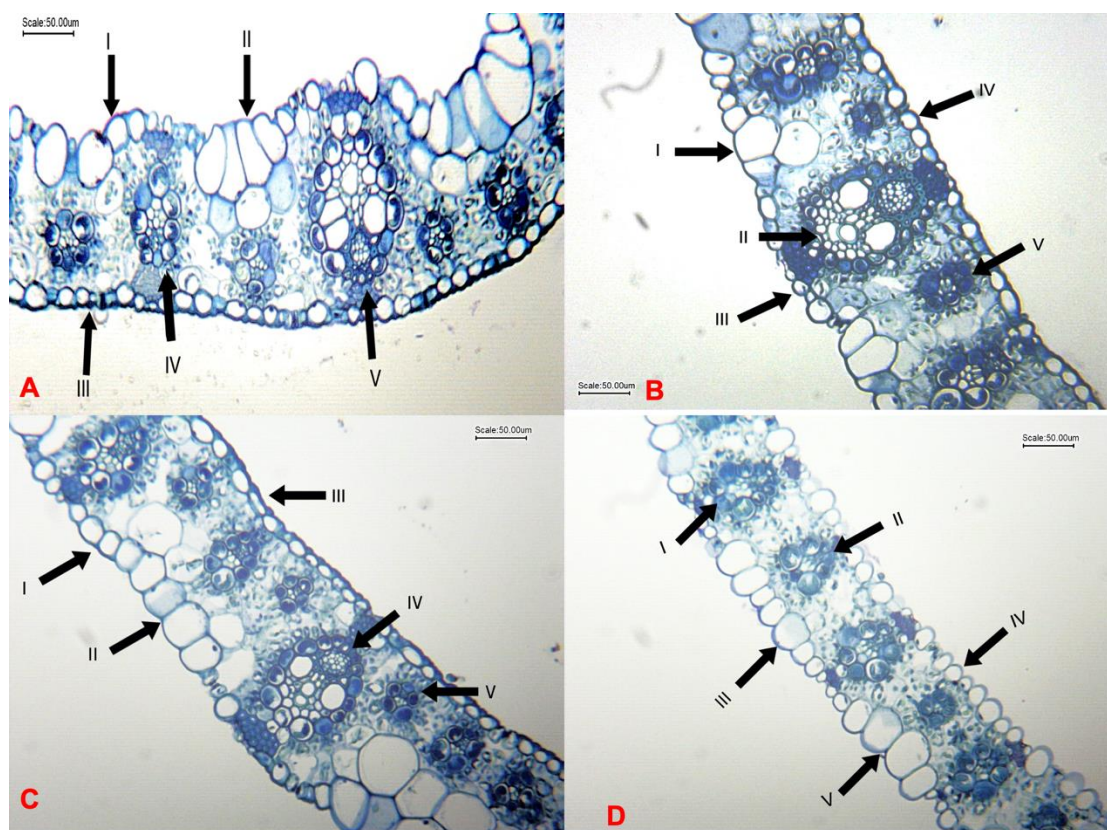


Figura 14- Cortes transversais da folha dos acessos de *Paspalum virgatum* L. (A) Acesso PAVME: I- Epiderme abaxial. II- Células buliformes. III- Epiderme adaxial. IV- Feixe vasculares secundários. V- Feixe vasculares. (B) Acesso PAVML: I- Células buliformes. II- Feixe vasculares. III- Epiderme abaxial. IV- Epiderme adaxial. V- Feixes vasculares secundários. (C) Acesso PAVRE: I- Epiderme abaxial. II- Células buliformes. III- Epiderme adaxial. IV- Feixes vasculares. V- Feixes vasculares secundários. (D) Acesso PAVRL: I e II- Feixes vasculares. III- Epiderme adaxial. IV- Epiderme abaxial. V- Células buliformes.

A mensuração das características anatômicas evidencia as diferenças já observadas anteriormente. Assim, o comprimento da nervura central, do limbo menor e do limbo maior foram significativas a ($p > 0,001$) para os acessos, mas não houve significância para a variável largura da nervura central ($p > 0,1137$). Para o comprimento da nervura central, os acessos PAVML E PAVRL não se diferenciaram estatisticamente entre si, mas foram diferentes do acesso PAVRE (Tabela 3). O comprimento do limbo menor, os acessos PAVML e PAVRL foram diferentes

estatisticamente dos acessos PAVRE e PAVME, desta forma, os acessos foram agrupados em dois grupos (Tabela 3). E para o comprimento do limbo maior observou-se que os acessos foram diferentes entre si, na qual, o acesso PAVRL apresentou menor comprimento, corroborando o observado visualmente na Figura 12.

Tabela 3- Valores médios e desvio padrão das características anatômicas mensuradas no estágio vegetativo dos quatro acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	CNC (μm)	LNC (μm)	CLME (μm)	CLMA (μm)
PAVME	533,85 $\pm$ 18,31ab	547,14 $\pm$ 14,25 a	120,00 $\pm$ 1,10a	150,00 $\pm$ 5,09a
PAVRL	509,29 $\pm$ 18,99b	601,79 $\pm$ 17,39 a	100,00 $\pm$ 0,75b	137,14 $\pm$ 6,08b
PAVRE	580,36 $\pm$ 24,01a	587,5 $\pm$ 16,45 a	121,79 $\pm$ 0,93a	159,29 $\pm$ 4,50a
PAVML	491,79 $\pm$ 23,83 b	545,71 $\pm$ 16,60 a	98,89 $\pm$ 0,95 b	151,15 $\pm$ 5,14a
CV(%)	21,75	26,94	6,72	8,84
Cav	P valor	P valor	P valor	P valor
Acessos	0,009**	0,1137 ns	0,001**	0,001**

CNC= comprimento da nervura central. LNC= largura da nervura central. CLME= comprimento do limbo menor. CLMA= comprimento do limbo maior. Cav= causas da variação. CV= coeficiente da variação em porcentagem. NS= não significativo pelo teste F. ** significativo a 1% de probabilidade. ** significativo a 5% de probabilidade. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Ademais, as variáveis comprimento do parênquima, espessura da epiderme adaxial e abaxial apresentaram significância para os acessos, com exceção da largura do parênquima ($p > 0,059$) (Tabela 4). O comprimento do parênquima foi maior para o acesso PAVRE, se diferenciando dos demais acessos, a espessura da epiderme adaxial resultou em diferenças entre os acessos, na qual o acesso PAVRE e PAVML foram diferentes entre si. O acesso PAVML foi diferente estatisticamente também do acesso PAVME, a espessura da epiderme adaxial foi maior para o acesso PAVRE. Para a variável espessura da epiderme abaxial houve diferença apenas do acesso PAVML para os demais acessos, com menor espessura (Tabela 4).

Tabela 4- Valores médios e desvio padrão das características anatômicas mensurados no estágio vegetativo dos quatro acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	CP (μm)	LP (μm)	EEAD (μm)	EEAB (μm)
PAVME	297,85 $\pm$ 114,45b	394,28 $\pm$ 91,14ab	2,14 $\pm$ 0,57ab	2,32 $\pm$ 0,44 a

PAVRL	315,71 ±113,02 b	376,07 ±88,87ab	1,96 ± 0,62bc	2,27±0,48 a
PAVRE	398,21 ± 102,48a	412,14± 68,81a	2,36 ± 0,39a	2,36 ± 0,39a
PAVML	296,07 ± 82,61b	353,21 ± 83,75b	1,60 ± 0,57c	1,74 ±0,62b
CV (%)	31,78	21,77	27,26	22,71
Cav	P valor	P valor	P valor	P valor
Acessos	0,0008**	0,059 ns	0,0001**	0,0002**

CP= comprimento do parênquima. LP= largura do parênquima. EEAD= espessura da epiderme adaxial. EEAB= espessura da epiderme abaxial. Cav= causas da variação. CV= coeficiente da variação em porcentagem. NS= não significativo pelo teste F. ** significativo a 1% de probabilidade. ** significativo a 5% de probabilidade. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Os resultados obtidos da mensuração das características morfológicas corroboram os resultados obtidos da análise anatômica. Assim, comprimento das folhas, largura e ângulo de inserção das folhas no estágio vegetativo apresentaram significância ($p<0,0001$) para os acessos e significância para os blocos (Tabela 5). O comprimento das folhas no estágio vegetativo, os acessos PAVML e PAVRL não apresentaram diferenças estatísticas entre si, porém, foram diferentes dos acessos PAVME e PAVRE, sendo estes também diferentes entre si, o acesso PAVRE apresentou menor comprimento foliar (Tabela 5).

Para a variável largura das folhas no estágio vegetativo, os acessos PAVML e PAVRL não apresentaram diferenças significativas entre si. O mesmo ocorreu para os acessos PAVRE e PAVME, ocorrendo a mesma formação de dois grupos como observado anteriormente para variável comprimento da nervura central (Tabela 3 e 5). O ângulo de inserção das folhas apresentou diferenças entre os acessos, sendo que o acesso PAVML apresentou maior ângulo quando comparado com os demais acessos (Tabela 5).

Tabela 5- Valores médios e desvio padrão das características morfológicas mensuradas no estágio vegetativo dos quatro acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	CFEV (cm)	LFEV (cm)	AIFEV (°)
PAVME	20,27±3,33b	0,75 ±0,18 b	0,64 ± 0,01b
PAVML	24,35 ± 2,97a	1,26 ±0,16 a	0,80 ± 0,01a
PAVRL	24,35 ±3,38 a	1,34± 0,21 a	0,64 ± 0,01b
PAVRE	16,12 ± 2,94 c	0,78 ± 0,21b	0,69 ± 0,02b

CV (%)	16,98	7,18	11,05
Causas de variação	P valor	P valor	P valor
Acessos	<0,0001 **	<0,0001**	<0,0001 **
Blocos	0,0133*	0,0463 *	0,0206 *

CFEV= comprimento das folhas no estágio vegetativo. LFEV= largura das folhas no estágio vegetativo. AIFEV= ângulo de inserção das folhas no estágio vegetativo. CV= coeficiente da variação em porcentagem. NS= não significativo pelo teste F. ** significativo a 1% de probabilidade. * significativo a 5% de probabilidade. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Para as características morfológicas, os resultados obtidos permitem observar as diferenças entre os acessos. Para as variáveis comprimento, largura e ângulo das folhas no estágio reprodutivo foram significativos para o fator acesso ($p>0,0001$), mas não significativo para bloco (Tabela 6). Assim, para o comprimento das folhas neste estágio observa-se que o acesso PAVME foi diferente estatisticamente apenas dos acessos PAVML e PAVRL, com menor comprimento. Para a largura das folhas no estágio reprodutivo, houve a formação de dois grupos, PAVML e PAVRL, PAVME e PAVRE, a largura da folha deste último grupo apresentou menores valores, corroborando com o observado no corte histológico transversal (Figura 11). O mesmo comportamento foi observado para o ângulo de inserção das folhas (Tabela 6).

Tabela 6- Valores médios e desvio padrão das características morfológicas mensurados no estágio reprodutivo dos quatro acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	CFER (cm)	LFER (cm)	AIER (°)
PAVME	30,79±0,56 b	0,82± 0,33b	9,85 ± 0,37 b
PAVML	37,13 ± 0,48a	1,74 ± 0,17a	19,85 ± 0,37 a
PAVRL	44,07±0,55 a	1,76 ± 0,29a	19,85± 0,37 a
PAVRE	36,85 ± 0,42 ab	0,72 ± 0,29 b	9,98 ±0,03 b
CV (%)	8,87	26,5	2,2
Causas de variação	P valor	P valor	P valor
Acessos	0,0001**	<0,0001**	<0,0001 **
Blocos	0,6691 ns	0,8677 ns	0,5154 ns

CFER= comprimento das folhas no estágio reprodutivo. LFER= largura das folhas no estágio reprodutivo. AIFER= ângulo de inserção das folhas no estágio reprodutivo. CV= coeficiente

da variação em porcentagem. NS= não significativo pelo teste F. ** significativo a 1% de probabilidade. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Para as variáveis mensuradas das estruturas reprodutivas, largura das espiguetas, comprimento e largura das inflorescências não apresentaram diferenças significativas ($p> 0,465$, $p> 0,4477$, $p> 0,79$, respectivamente) para os acessos e para os blocos, no entanto, houve significância estatística para a variável comprimento das espiguetas ($p> 0,004$) (Tabela 7). Portanto, o acesso PAVRL foi diferente estatisticamente do acesso PAVML, mas o PAVML não apresentou diferença dos acessos PAVRE e PAVME, de tal modo, o maior comprimento de espiguetas observado era do acesso PAVRL (Tabela 7).

Tabela 7- Valores médios e desvio padrão das características morfológicas mensurados no estágio reprodutivo dos quatro acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	CE (cm)	LE (cm)	CI (cm)	LI (cm)
PAVME	4,85 ± 0,98ab	0,24 ± 0,11a	11,37 ± 0,42a	4,93 ± 0,23 a
PAVML	4,75 ± 1,88 b	0,28 ± 0,10 a	11,33 ± 0,46 a	10,65 ± 0,38 a
PAVRL	6,78 ± 1,28a	0,30 ± 0,14 a	12,06 ± 0,41a	9,98 ± 0,35a
PAVRE	4,52 ± 0,99ab	0,24 ± 0,05 a	10,16 ± 0,40a	7,06 ± 0,27a
CV (%)	25,57	27,7	14,91	21,39
Causas de variação	P valor	P valor	P valor	P valor
Acessos	0,004 **	0,465 ns	0,4477 ns	0,79 ns
Blocos	0,3128 ns	0,2356 ns	0,5897 ns	0,5761 ns

CE= comprimento das espiguetas. LE= largura das espiguetas. CI= comprimento das inflorescências. CV= coeficiente da variação em porcentagem. NS= não significativo pelo teste F. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). ** significativo a 1% de probabilidade. ** significativo a 5% de probabilidade.

3.2 Quantificação da cera epicuticular dos acessos

A análise colorimétrica cera epicuticular dos acessos permite quantificar a quantidade de cera presente em uma superfície foliar, podendo ser utilizada para caracterizar plantas diferentes da mesma espécie, seja em diferentes estágios de desenvolvimento ou mesmo condições abióticas diferentes. As plantas utilizadas apresentavam as mesmas condições abióticas e de estágio de desenvolvimento.

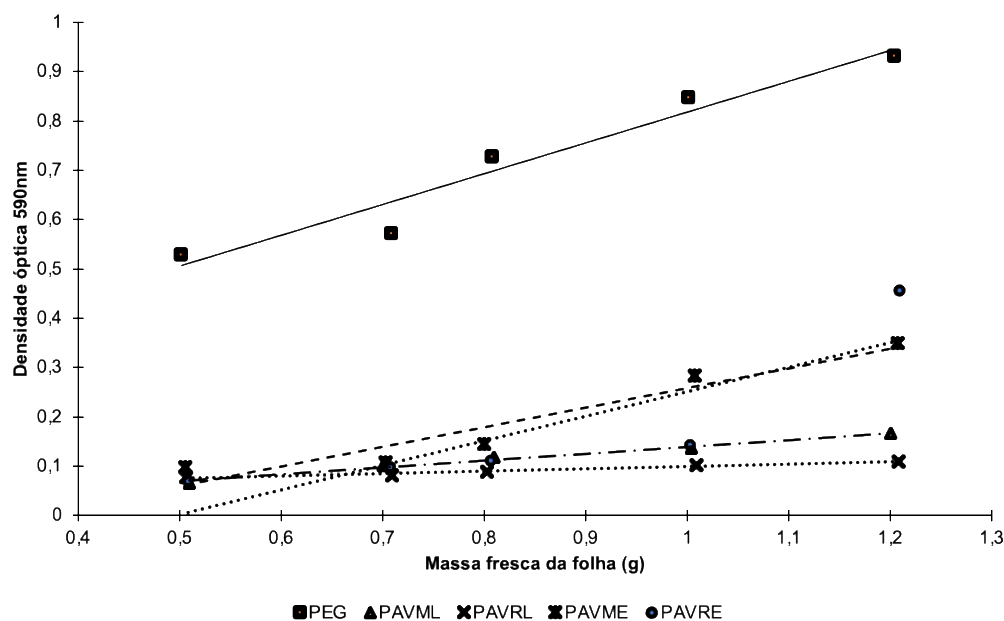


Figura 15- Curva padrão da quantificação da cera epicuticular para as folhas dos quatros acessos de *Paspalum virgatum* L e para testemunha (Polietileno glicol, marca Dinâmica®).

As curvas padrão dos acessos apresentaram diferenças da testemunha, ou seja, a densidade ótica foi menor (Figura 15). Contudo, os acessos e a testemunha apresentaram o mesmo comportamento linear. Além disso, observa-se que com o aumento da massa foliar há um consequentemente aumento a quantidade de cera epicuticular. Na Figura 15 é possível observar a ascensão dos acessos PAVRE e PAVME em relação aos demais acessos, sendo o maior ponto observado para o acesso PAVRE ($R^2 = 0,71$) com 1,2 g de folha fresca.

Na análise de regressão, a regressão linear foi a que melhor se adequou ao comportamento dos dados ($p > 0,001$), com valores de R^2 de 0,71 a 0,98 (Tabela 8). As médias obtidas de todas as leituras não resultaram em diferenças entre os acessos, mas houve diferença entre a testemunha, corroborando o observado na Figura 15.

Tabela 8- Valores médios e a análise de regressão da quantificação de cera epicuticular dos quatros acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	Equação	R^2	Média das leituras (nm)
Testemunha	$0,6230x + 0,1947$	0,9458	0,7210a

PAVRE	0,4999x - 0,2484	0,7188	0,1751 b
PAVME	0,3969x - 0,1379	0,9182	0,1973b
PAVML	0,1396x+0,0001	0,9849	0,1180b
PAVRL	0,0495x+ 0,0502	0,9609	0,0921b
CV (%)	28,32		
Pvalor	0,0001**		

Testemunha= Polietileno glicol, marca Dinâmica®. CV= coeficiente da variação em porcentagem. ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

3.3 Determinação do nível de ploidia e análise de DNA satélite dos acessos

Os indivíduos analisados apresentaram o mesmo valor de conteúdo de DNA, o valor 2C de 2,8514pg (desvio padrão= 0,0026). O conteúdo de DNA nuclear foi mensurado a partir de plantas de *Solanum lycopersicum*, como planta padrão; essa planta apresentou o conteúdo 2C DNA de 2,00 pg. Portanto, é possível concluir que todos os acessos de *Paspalum virgatum* L. estudados neste trabalho são classificados como tetraploides (Figura 17).

Durante a observação do fluxo gênico dos indivíduos, verificou-se que o acesso PAVME apresentou dois indivíduos com discrepância entre os demais exemplares do mesmo acesso e também em comparação com exemplares dos demais acessos. As amostras identificadas como 26 e 28 apresentaram valores 2C DNA de 3,3853 e 3,3342 pg, respectivamente, ou seja, apresentaram aproximadamente 17% a mais de DNA nuclear.

Os resultados da análise de sequenciamento para identificação dos DNA satélites dos acessos possibilitaram a identificação de sete sítios de DNA satélite em todos os acessos, sendo que as sequências repetitivas foram denominadas na escala de maior para menor ocorrência. Portanto, a sequência de maior repetição foi chamada de PAV_sat 1 e a de menor ocorrência PAV_sat 7 (Figura 18). A descrição da constituição da sequência de base nitrogenadas demonstra as diferenças entre os tamanhos e a organização dos DNA satélites.

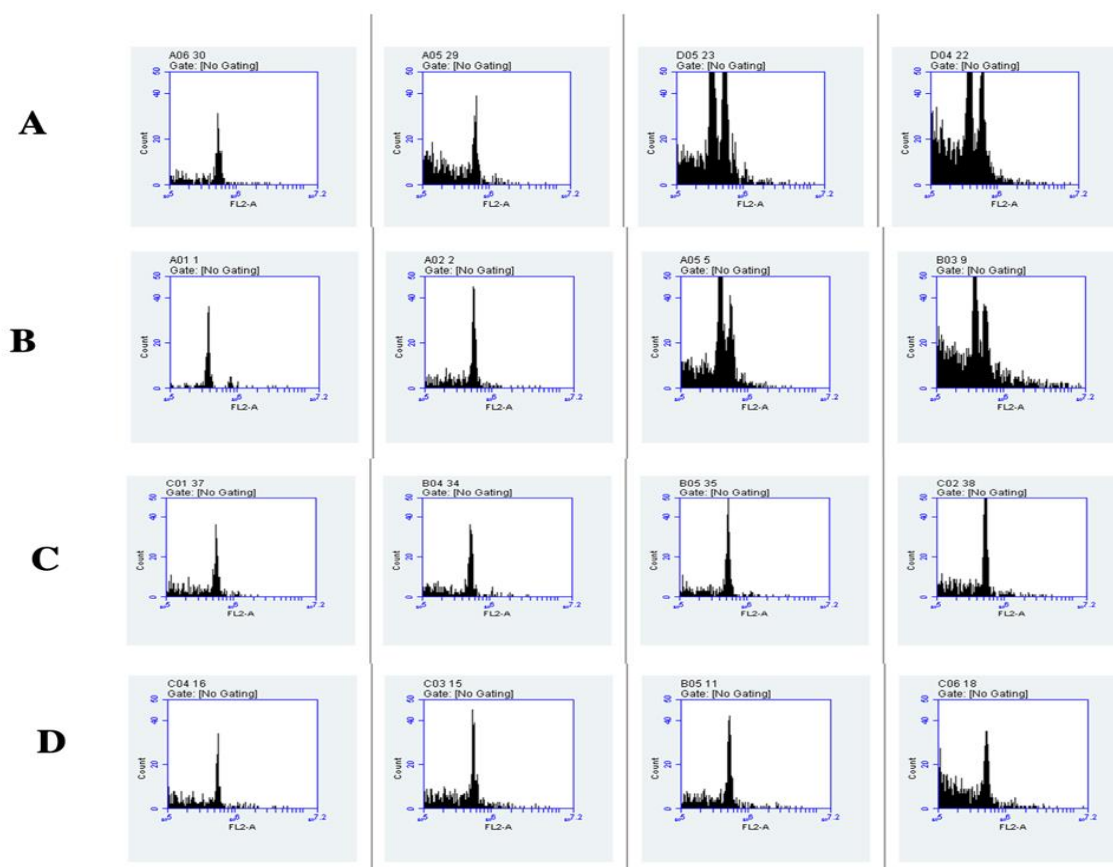


Figura 17- Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo de plantas de *Paspalum virgatum* L. (A) Acesso PAVME, (B) Acesso PAVML, (C) Acesso PAVRE e (D) Acesso PAVRL.

A visualização da linha na direção diagonal formada no gráfico permite perceber que as similaridades observadas estão nos quadrantes correspondentes a cada DNA satélite identificado, ou seja, o quadrante do PAV_sat 1 com PAV_sat 1 formaram uma linha demonstrando que são iguais, mas a formação da linha não foi observada para os quadrantes PAV_sat 1 com PAV_sat 4, por exemplo, demonstrando que são diferentes (Figura 19). Assim, os DNA satélites identificados nas amostras são diferentes entre si; apenas nos quadrantes PAV_sat 3 e PAV_sat 5 apresentaram similaridades entre si, mas a semelhança nas bases nitrogenadas que compõem as sequências é relativamente pequena (Figura 19).

DNA satélite	Constituição
PAV_sat1	GCGAAAAAAGAAGAAATGGTTCCGGTGGCACAAACTCATGCCTTGATACACCCCGATGCCGTTTTCCAAATGGGTACGTGCGGCAACG AAATGGCGCGAAACCACCCCAACATGAGTTTTGGACCTAAAGTAGTGGATTGGGCATGTTCTGT
PAV_sat2	AACACAAGCTTGCCGAACCTCGGGGCCGAGAACTCGGCTTTCCCGGCCGATTTTCGCAAAAGTAGATTCGCCGCACCCGGCAAAGCGGG GGAGAACCGGATGCGAAATTTCTGCCGATTTCCGGAATGTATTTATGTGCCCAATTCCGAGTCCGGATGCACGCTTTGGAGCCCCGGTAC CGTCGTCCAAAGCCTCAGCCCGAAATGTGGCCAAGTTTCGTAATTTACAATCCGCCACATCCCTCAGGCCATAAGGAGCTACCTATGAT CTCACCCTCCCGGGCTGGGAGGTGAGGGAAGACTGAGTGACCAGCACGTTGCCCGAGGAGCAAAACGGTGACCGCACGCACGTCTA
PAV_sat3	GAAGAACTCATGAAAGTCAAGTTCGCTCGGTAAACCGGCCATAACTTCTTCAAGGCCCTACTGTCTGAGTGCCAACGTCTCAAAAGTGAATATT TCCCCACGCCGCCAAGTTCCTAGCACTCATAAGGAGCATACCGATGATCTAGCATCATGTGACGCTGAGAAATGGACGGATGACCCCC
PAV_sat4	AAAAATAAAACAAAAAATTGACGACACCCGAAGTAGTCTTCCGGCTCGTGCCCTCACATATACCCACCGTCGGGAACCGGTGTCGCGTCTGGC GTTTCGTACCCTGTGAGGAACCGTCCCGCTAACCCTCCACCGTGCCTCTAATGACCGTATGTCCCTCCTAAGACGCGCCGCCAATTTGGG GGTTAGCGGAGTGGCACGGGTTCCATTGCCAAGACGCAAGGTGCCCGTATATTGGCCATAACTATCGCTATAAGACTCAGAATTGCGC GGGCTCGGTCTTGTGGAAAGATAACTGCAAATCCCACACCACAGGAACGAAAAACGGAAGTTTTGGTCATACTAAGTATTTCTAA
PAV_sat5	CTAACGAGCAGGAGCACCCCATGGGAACGCGAAATCAAGTTTTGACCGCTAGAGAGATTTTGTGCCAATCTATAAGGCCAACACCTCGCA CACAAGGTGAGGCGTTTTCTAACATTGGCACGGACCGAAACGTGGGTACCATGGCTTACTGTCCGAGATCTTGTCTCCAAATGATTATTT TTCTCTCTGTAACTTCTATCCCTCGCAAGGAGCATACCTATGATCCCAACTGAAGAGACATGAATCCGACCGCAAACGCCCTGAAAA CTCATGAAAGTGAGGTCTGCTTAGTATAACGGCCATAACTTCTGCCAGGGGACTCAGAATCTTGGGCTGTGCGGCTCGATGGAAG
PAV_sat6	TTTTTGAACGGCCCTTTCTCTAAATTCGCCTTGCATGGTGTGCTCCACGTGATTATGCAACCGGAAAAAACTAGACCCAAAAACGGGATA CGGATGAGGAAGTTATGGCCCTTTCGATGGGTTCCGGTGCCTTAACGGCATCGTACTGTGCTCCGGGGCCTATCAGCACCGTAGTCGA CCAGAACACGGCATAAGAGAGGTCTATCCTGAAGAAGGCCTTGTCTCGTAGAATTCTAGGTGGTTGGAGGTCTGAATCGTGCAACGACGG TGCCGATGCGGCCAGCAGGATTAACGTGCGAGGGAGGGCGTTGAAATGGCCCTGACCTGTTATTATGTCTATTTATTTTATT
PAV_sat7	CGGAGTGACTTCTGACGGAAAAATCCATGGTAAATACTTCCAATGCTCAATTTTCCGGTGCCCGTGTGTTTTTCGGATGCGTACACGGGTCTC TGTGAAGCCCGTGTTCACGGCTCAAGATTTCTTGAGGAAGGTGCAATAACACAAAAGATTCCCTTGAATTATGCTCC

Figura 18- Representação da sequência de bases nitrogenadas identificadas que compõem o DNA satélites dos acessos de *Paspalum virgatum* L.

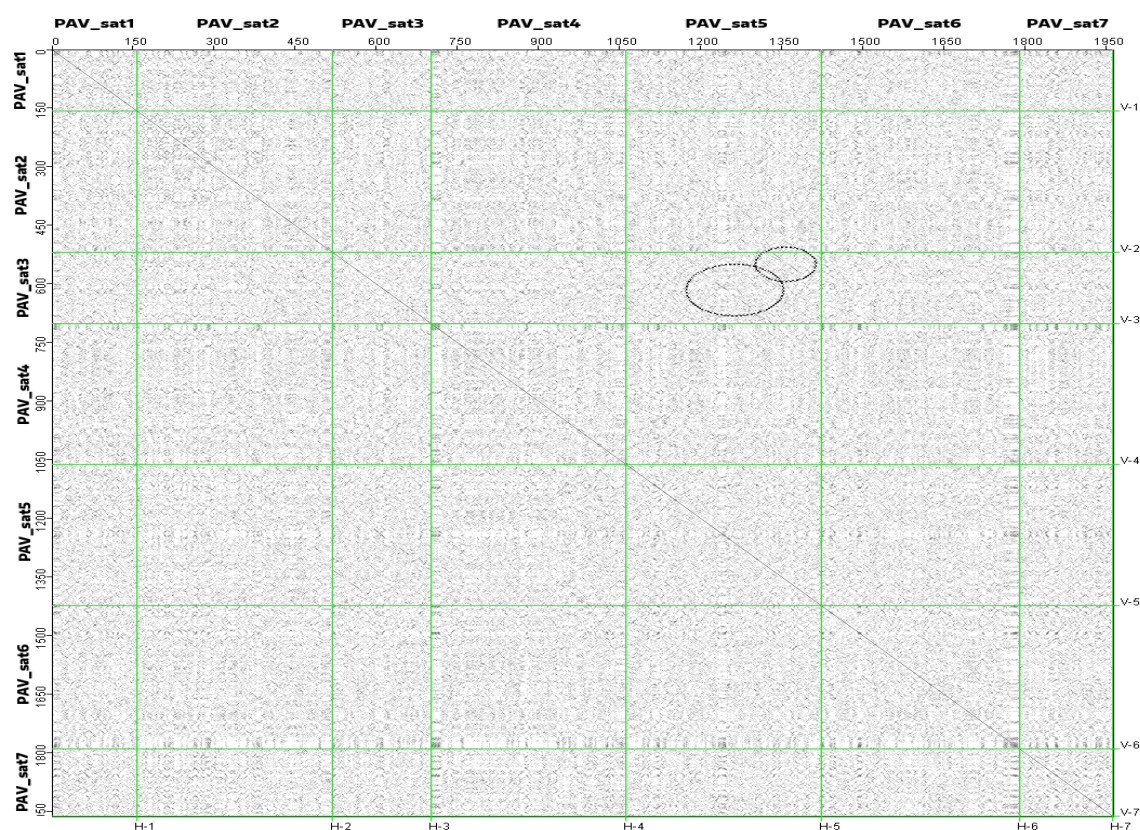


Figura 19- Gráfico da análise DotPlot entre as sequências de bases nitrogenadas identificadas que compõem o DNA satélites dos acessos de *Paspalum virgatum* L.

A proporção de DNA satélite identificada foi diferente entre os acessos PAVRL, PAVML, PAVRE e PAVME, resultando na formação de grupos; PAVML e PAVRL apresentaram maior proporção de PAV_sat1 em comparação com os acessos PAVRE e PAVME (Tabela 9) e vice-versa para os demais DNA satélites, havendo diferenças de o dobro do valor para cada família de DNA satélite observado. Mesmo a família PAV_sat 7 ter sido identificada, os estudos de comparação não foram realizados para a proporcionalidade entre os acessos por apresentar valores próximos de zero em todos os acessos.

Tabela 9- Porcentagem de cada DNA satélite identificado para cada acesso de *Paspalum virgatum* L.

Acesso	PAV_sat1	PAV_sat2	PAV_sat3	PAV_sat4	PAV_sat5	PAV_sat6
PAVRL	3,46%	0,06%	0,30%	0,17%	0,03%	0,02%
PAVML	3,90%	0,07%	0,19%	0,42%	0,04%	0,03%
PAVME	2,03%	0,59%	0,00%	0,03%	0,09%	0,07%
PAVRE	2,21%	0,62%	0,00%	0,03%	0,09%	0,07%

Devido a dois indivíduos dentro do acesso PAVME apresentarem resultados do tamanho do genoma com valores acima do encontrado para os demais, realizou-se a observação específica desse acesso (Tabela 10). Entre as repetições do acesso foi possível observar a variação na proporção dentro das repetições somente nas famílias de DNA satélite PAV_sat 1 e PAV_sat 2, sendo que dentro do PAV_sat 1 o acesso PAVME_3 apresentou maior porcentagem em comparação com as demais repetições, e a PAVME_2 apresentou um valor intermediário, para o PAV_sat 2 as repetições 1 e 2 foram semelhantes, mas novamente a repetição 3 apresentou maior proporção. A família PAV_sat 3 e 4 não foram utilizadas para efeito da comparação, pois apresentaram valores muito pequenos, próximo de zero.

Tabela 10- Porcentagem de DNA satélite identificado para as repetições do acesso PAVME da espécie *Paspalum virgatum* L.

Acesso	PAV_sat1	PAV_sat2	PAV_sat5	PAV_sat6	PAV_sat7
--------	----------	----------	----------	----------	----------

PAVME_1	1,82%	0,44%	0,08%	0,07%	0,06%
PAVME_2	2,12%	0,48%	0,09%	0,07%	0,06%
PAVME_3	2,24%	0,72%	0,08%	0,07%	0,05%

4 Discussão

De modo geral, os acessos de *Paspalum virgatum* L. apresentaram diferenças entre si em diversas características importantes, como, por exemplo, comprimento e largura da lâmina foliar, apesar de serem identificadas como sendo plantas da mesma espécie. Esses fatores são de extrema relevância para entender a plasticidade da espécie e também para elaboração de estratégias eficientes de manejo. Funk (2008) conclui que as espécies consideradas plantas daninhas apresentam alta plasticidade de importantes estruturas, como, por exemplo, a lâmina foliar, independente se a espécie está situada em uma área com alto ou baixo disponibilidade de recursos, e assim, a alta plasticidade da planta influenciará na aptidão da planta em uma determinada área. Portanto, as características observadas da espécie de *Paspalum virgatum* L possibilitam o melhor entendimento sobre a evolução da adaptabilidade da espécie.

Na caracterização de uma espécie é importante observar as diferenças nas sementes, pois as medidas biométricas são importantes para o entendimento da variabilidade existente, especialmente em espécies nativas que não sofreram o processo de melhoramento genético (Vieira e Gusmão, 2008). Assim, os acessos estudados neste trabalho apresentaram diferenças estatísticas e visuais, como no tamanho e na coloração das sementes, que possivelmente interferirá na emergência das plântulas, uma vez que, sementes pequenas apresentam menor porcentagem de reserva nutricional (Figura 1).

O acesso PAVRL apresentou um comprimento de semente de aproximadamente 59% maior que o acesso PAVRE, assim como para a largura (60%) e peso de mil sementes (39%). Assim, o acesso PAVRL apresenta maior reserva de nutrientes no endosperma e isso poderia permitir que as plantas desse acesso possam sobreviver por mais tempo em condições desfavoráveis. Isto está, obviamente, relacionado com o estabelecimento da planta em uma determinada área, ou seja, com a viabilidade e vigor (Pádua et al., 2010).

Portanto, no aspecto germinativo é perceptível a resposta de cada acesso aos tratamentos pré germinativos utilizados neste estudo. Os acessos PAVRL e PAVML apresentaram maior porcentagem de germinação, plântulas normais e índice de velocidade de germinação, variáveis importantes para o estabelecimento das plantas em campo. Dessa forma, esses acessos, por apresentarem maior reserva de nutrientes no endosperma, resultarão em maior quantidade de plântulas em campo, ou seja, em uma área esses acessos rapidamente se estabelecerão e terão maior dominância relativa em comparação aos acessos PAVRE e PAVME. No entanto, o PAVML apresentou menor porcentagem de germinação e IVG que o PAVRL podendo indicar uma dormência das sementes.

Diferente do observado nesse trabalho, Silva et al. (2017) observaram que o uso de métodos de superação de dormência das sementes de *Paspalum virgatum* L. foram eficientes em aumentar a porcentagem de germinação, com taxas próximas de 70%, enquanto neste estudo a porcentagem máxima foi de 23%. Os autores relatam que em áreas de pastagem ocorre naturalmente a escarificação química, uma vez que os animais se alimentam das folhas junto com as sementes. Sendo assim, por passarem pelo trato digestivo dos animais em contato com o ácido estomacal, e posteriormente defecam e disseminam as plantas pela área, sofrerão um tratamento de superação de dormência das sementes (Silva et al., 2017). Porém, devido as estruturas pontiagudas na borda da lâmina foliar, a gramínea torna-se intragáveis para o animal, principalmente na fase reprodutiva da planta (Gonzalez-Ibáñez, 1984); nesse caso, o animal somente se alimentará da espécie quando houver escassez de alimento disponível.

Em relação ao comprimento da parte área e da raiz das plântulas, o acesso PAVME apresentou resposta diferente aos tratamentos utilizados, na qual o nitrato de potássio resultou em maior comprimento de raiz e da parte área. Essa substância é comumente utilizada nos ensaios germinativos de sementes de gramíneas, como por exemplo, *Urochloa ruziziensis* R.Germ.& Evrard e *Panicum maximum* Jacq. (Toledo, Novembre e Chamma, 1994; Nóia et al., 2014), por estimular o processo germinativo das sementes. Devido a esse fato, utilizou-se esse tratamento pré-germinativo, mas o seu uso não aumentou a taxa de germinação da semente. Marques et al. (2019) relataram que a maior porcentagem, uniformidade e velocidade de emergência das plântulas de *Paspalum virgatum* L. foram observadas em sementes próximas da superfície do solo. Com o revolvimento do solo, que ocorre no processo de renovação

do pasto, as sementes que estavam em profundidades maiores são levadas para a superfície, causando o aumento da frequência da planta na área.

Além das diferenças entre os acessos na germinação e biometria das sementes, os acessos também apresentaram diferenças no teor relativo de clorofila total. O teor de clorofila é utilizado para prever a condição nutricional das plantas, podendo ser determinado por dois processos distintos: destrutivo e não destrutivo. Neste trabalho optou-se pelo uso do método não destrutivo e existem diversos trabalhos que afirmam a precisão da mensuração com o uso do clorofilômetro (Godoy et al., 2007; Hurtado et al., 2011; Coelho et al., 2018; Caudle et al., 2014). Argenta et al. (2001), relataram que a leitura realizada estimou com boa precisão, rapidez e menor custo o teor relativo. Em relação ao teor de clorofila, o acesso PAVRE apresentou maior teor e se diferenciou do acesso PAVRL, evidenciando que existem diferenças entre os acessos, uma vez que, todas as plantas utilizadas na mensuração estavam nas mesmas condições de luz, radiação, água e nutrientes; logo, essa diferença refere-se ao acesso.

No que se refere a topográfica da lâmina foliar dos acessos não se observou diferenças, pois ambas as superfícies, adaxial e abaxial, apresentavam estômatos, células da epiderme dispostas perpendiculares a nervura e pelos curtos. Esse fato pode influenciar nos depósitos dos herbicidas e conseqüentemente no controle da espécie; assim, a presença de poucos pelos não interferirá na deposição e no espalhamento da gota (Santos et al., 2016). Hess e Falk (1990) relatam que as características topográficas de uma superfície, como por exemplo, a presença e distribuição de pelos influenciam na distribuição do herbicida pulverizado nas folhas, e em algumas condições são responsáveis pelo o controle não satisfatório das plantas. Apesar de não observar diferenças topográficas entre os acessos, houve diferenças quando realizado o corte histológico transversal. Visualmente os acessos PAVME e PAVRE apresentam folhas com maior curvatura, o que permite presumir que esses acessos apresentam maior tolerância a pulverização de herbicidas, pois as gotas escorrem pela lâmina foliar antes de ocorrer o processo de penetração e absorção do produto aplicado (Procópio et al., 2003; Smith et al., 2000; Hatterman-Valenti, Pitty e Owen, 2011).

Apesar de as médias das leituras de quantificação de cera epicuticular não apresentarem diferenças estatísticas, na Figura 15 observa-se o comportamento da curva padrão para cada acesso, demonstrando que existem diferenças do acesso

PAVRE para os demais acessos. A quantificação é importante, pois está diretamente relacionada com os fatores que afetam o controle químico de uma planta, ou seja, a eficácia do herbicida pulverizado. Para Neinhuis e Barthlott (1997), a molhabilidade das superfícies é reduzida pelas ceras epicuticulares, e quanto maior a quantidade de cera depositada menor será a molhabilidade da superfície, acrescentando a classificação de hidrofóbicas.

Apesar das diferenças existentes entre os acessos observadas anteriormente, geneticamente não houve diferenças no nível de ploidia e no tamanho do genoma dos acessos. Desta maneira, os acessos PAVML, PAVRL, PAVRE e PAVME são tetraploides, com valor 2C de 2,8514 pg, corroborando o relatado por Burson e Quarín (1982) para espécie, com $2n=4x=40$ cromossomos. Os autores também relataram que é uma espécie que se reproduzem sexualmente e é meioticamente estável.

Galdeano et al. (2016) e Hojsgaard et al. (2009) também relataram que a espécie é tetraploide, em acessos obtidos na Bolívia e no Brasil, no estado de Mato Grosso, sendo este estado o mesmo na qual foi obtidas exemplares dos acessos PAVML e PAVME. Normalmente, 75% das espécies conhecidas do gênero *Paspalum* são poliploides, com genoma considerado básico e tetraploides apomíticos (Galdeano et al., 2016), como exemplo, a espécie *Paspalum plicatulum* Michx., que é tetraploide e apomítica (Sartor, Quarín e Espinoza, 2009), diferente da espécie *Paspalum virgatum* L. Ademais, os dois indivíduos do acesso PAVME que apresentaram 17% a mais no tamanho de genoma assim, necessita de uma análise detalhada do genoma, a nível molecular.

Contudo, a combinação de todas as características estudadas, biométricas, morfológicas, anatômicas e genéticas induz ao entendimento da formação de dois grupos distintos com características fenotípicas ímpares. O primeiro grupo formado pelos acessos PAVML e PAVRL e o outro grupo formado pelos acessos PAVME e PAVRE, demonstrando a capacidade da espécie em se adaptar, ou seja, a plasticidade, podendo ser essas características utilizadas para identificar o processo de seleção, seja natural ou antrópica que a espécie sofreu, uma vez que as sementes foram coletadas em áreas de pastagem que apresentaram contínuo manejo com método químico de plantas daninhas.

De modo geral, as características morfoanatômica e genética permitiram constatar as diferenças existentes entre os acessos, apesar de os resultados da citometria de fluxo não apresentarem diferenças entre o tamanho do genoma dos

acessos. Contudo, o sequenciamento do DNA possibilitou a observação das diferenças na proporcionalidade de cada DNA satélite encontrado, ou seja, existe diferenças morfoanatômica e genética entre os acessos. As sequências de DNA são importantes por poderem representar até 50% do genoma de uma planta, Ingle, Pearson e Sinclair (1973) relataram que a maior quantidade de DNA satélite foi observada na família cucurbitaceae com 44% do DNA nuclear. Cada família de DNA repetitivo ou DNA satélite apresenta diferenças no grau de homologia, organização genômica e física (Rubis et al., 1998; Čížková et al., 2013). Assim, as diferenças na constituição encontradas em cada DNA satélite identificado nos acessos ratificam que são pertencentes a diferentes famílias, portanto, no estudo exploratório dos dados obteve sete famílias, sendo a família 1 a de maior repetitividade.

A distintas proporcionalidades das famílias do DNA repetitivo no acesso PAVME demonstra que esse acesso possui indivíduos com características específicas, pois apresentam valores de tamanho de genoma e de proporcionalidade diferentes dentro do acesso, evidenciando a necessidade de mais estudos sobre os acessos de *Paspalum virgatum* L., especificamente sobre essas diferenças encontradas nesses indivíduos desse acesso.

As sequências de DNA repetitivo haviam sido, por décadas, uma parte oculta do genoma, sendo consideradas em muitos momentos DNA lixo. Porém, nos últimos anos, tem sido estudada para entender a sua função. Segundo Garrido-Ramos (2015), o DNA repetitivo é necessário para emparelhamento e segregação, além da organização dos cromossomos e modulação da expressão gênica, sendo também sequências de evolução rápida que podem causar barreiras reprodutivas e promover a especiação. Logo, os resultados obtidos sobre o DNA satélite e a proporcionalidade em cada acesso nos induz a crer que as diferenças relatadas anteriormente nesse estudo podem estar relacionadas com a proporcionalidade de cada família de DNA satélite em cada acesso. Mehrotra e Goyal (2014) enfatizam que essa análise é importante para estudos taxonômicos e filogenéticos, uma vez que são considerados chave de regulação do processo evolutivo.

5 Conclusões

Os acessos apresentam diferenças morfológicas e anatômicas. As sementes dos acessos PAVRL e PAVML possuem coloração marrom escura e são sementes com maior comprimento e peso de mil sementes. A lâmina foliar é menor para os

acessos PAVRE e PAVME, sendo esta característica a mais evidente para diferenciação visual dos acessos. Os exemplares dos acessos foram identificados botanicamente como sendo da mesma espécie e apresentaram o mesmo tamanho do genoma, 2,85 pg, sendo plantas tetraploides, mas apresentam diferentes proporcionalidade em DNA satélite.

6 Referências

Andrade, CMS., Fontes, J., Oliveira, TK., Farinatti, L. Reforma de pastagens com alta infestação de capim-navalha (*Paspalum virgatum*). Embrapa Acre-**Circular Técnica 64** (INFOTECA-E), p.14.2012. ISSN 0100-9915.

Argenta, G., Silva, PRFD., Bortolini, CG., Forsthofer, EL., Strieder, ML. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 158-167, 2001.

Barbosa, J. C.; Maldonado Junior, W. **AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Jaboticabal, FCAV/UNESP. 396p, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**, Brasília: Mapa/ACS, 395p., 2009.

Brodie, R., Roper, RL., Dotter, J. A Java interface to multiple dotplots generated by dotter. **Bioinformatics**, v.20, n.2, p.279-281, 2004.

Burson, BL.; Quarin, CL. Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 24, n. 2, p. 219-226, 1982.

Caudle, KL., Johnson, LC., Baer, SG., Maricle, BR. A comparison of seasonal foliar chlorophyll changes among ecotypes and cultivars of *Andropogon gerardii* (Poaceae) by using nondestructive and destructive methods. **Photosynthetica**, v. 52, n. 4, p. 511-518, 2014.

Cidade, FW., Vigna, BB., Souza, FH., Valls, JFM., Dall'Agnol, M., Zucchi, MI., Souza, AP. Genetic variation in polyploid forage grass: Assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 50, 2013.

Čížková, J., Hřibová, E., Humplíková, L., Christelová, P., Suchánková, P., Doležel, J. Molecular analysis and genomic organization of major DNA satellites in banana (*Musa* spp.). **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54808, 2013.

Coelho, AP., Faria, RT., Dalri, AB., Palaretti, LF., Zanini, JR. Clorofilômetro portátil como forma de manejo da irrigação e adubação nitrogenada em aveia-branca. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 12, n. 2, p. 2542, 2018.

Ebercon, A. Blum, A. Jordan, WR. A rapid colorimetric method for epicuticular wax content of sorghum leaves 1. **Crop Science**, v. 17, n. 1, p. 179-180, 1977.

Funk, JL. Differences in plasticity between invasive and native plants from a low resource environment. **Journal of Ecology**, v. 96, n. 6, p. 1162-1173, 2008.

Galdeano, F., Urbani, MH., Sartor, ME., Honfi, Al., Espinoza, F., Quarín, CL. Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. **Journal of Plant Research**, v. 129, n. 4, p. 697-710, 2016.

Galvão, AKDL., Silva, JFD., Albertino, SMF., Monteiro, GFP., Cavalcante, DP. Levantamento fitossociológico em pastagens de várzea no Estado do Amazonas. **Planta Daninha**, v. 29, n. 1, 2011.

Garrido-Ramos, M.A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.

Godoy, LJGD., Souto, LS., Fernandes, DM., Villas Bôas, RL. Uso do clorofilômetro no manejo da adubação nitrogenada para milho em sucessão a pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 38-44, 2007.

González-Ibáñez, J. Glyphosate for weed control in Puerto Rican pastures. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 68, n. 3, p. 289-296, 1984.

González, ML., Chiapella, JO., Urdampilleta, JD. Characterization of some satellite DNA families in *Deschampsia antarctica* (Poaceae). **Polar Biology**, v. 41, n. 3, p. 457-468, 2018.

Hani, M., Lebazda, R., Fenni, M. Variations of Weeds Seeds of Species Belonging to Poaceae on the Basis of Germination, Production and Morphological Characteristics. **Advances in Research**, p. 1-8, 2017.

Hatterman-Valenti, H., Pitty, A., Owen, M. Environmental effects on velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) epicuticular wax deposition and herbicide absorption. **Weed Science**, v. 59, n. 1, p. 14-21, 2011.

Hawkins DM., Weisberg S. Combining the box-cox power and generalised log transformations to accommodate nonpositive responses in linear and mixed-effects linear models. **South African Statistical Journal**, v. 51, n.2, p.317-328. 2017.

Hess, FD., Falk, RH. Herbicide deposition on leaf surfaces. **Weed Science**, p. 280-288, 1990.

Hoagland, DR. Arnon, DI. The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347. **California Agricultural Experiment Station.**, 2nd edit. 1950.

Hojsgaard, D., Honfi, AI., Rua, G., Davina, J. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 4, p. 533-545, 2009.

Hurtado, SMC., Resende, ÁVD., Silva, CA., Corazza, EJ., Shiratsuchi, LS. Clorofilômetro no ajuste da adubação nitrogenada em cobertura para o milho de alta produtividade. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1011-1017, 2011.

Ingle, J.; Pearson, GG.; Sinclair, J. Species distribution and properties of nuclear satellite DNA in higher plants. **Nature New Biology**, v. 242, n. 120, p. 193-197, 1973.

Johansen, DA. **Plant Microtechnique**. London, McGraw-Hill Book Compan. 1940.

Kubis, S., Schmidt, T., Heslop-Harrison, JS. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. **Annals of Botany**, v. 82, p. 45-55, 1998.

Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 112 p. ISBN: 8586714276.

Maguire, JD. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1. **Crop science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

Marques, AS., Marchi, SR., Pinheiro, GHR., Marques, RF., Martins, CC. Emergence of Razor Grass on the Basis of Origin and Seed Depth in the Soil Profile. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

Marques, RP., Rodella, RA., Martins, D. Characteristics of the leaf anatomy of Surinam grass and Alexandergrass related to sensitivity to herbicides. **Planta Daninha**, v. 30, n. 4, p. 809-816, 2012.

Mehrotra, S., Goyal, V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 164-171, 2014.

Neinhuis, C., Barthlott, W. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. **Annals of botany**, v. 79, n. 6, p. 667-677, 1997.

Nóia, NRC., Davalo, MJ., Brustolin, G., Corrêa, M.. Avaliação da quebra de dormência com uso de nitrato de potássio em sementes *Brachiaria ruziziensis*. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 4, p. 61-66.

Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J. RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads. **Bioinformatics**, v.29, n.6, p.792-793, 2013.

Otto, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA in **Methods in Cell Biology** (eds. Darzynkiewicz, Z. & Crissman, H. A.) 105–110 (Academic Press, 1990).

Pádua, GPD., Zito, RK., Arantes, NE., França Neto, JDB. Influência do tamanho da semente na qualidade fisiológica e na produtividade da cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 9-16, 2010.

Praça-Fontes, MM., Carvalho, CR., Clarindo, WR. C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. **Plant Cell Rep.** 30, 2303–2312 (2011).

Procópio, SO. et al. Estudos anatômicos de folhas de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. III. *Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2003.

Sakai, WS. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology** 48(5): 247-249, 1973.

Santos, JI., Amaral, CL., Alves, PLC., Gasparino, EC. Can light intensity influence the tolerance of *Synedrellopsis grisebachii* to glyphosate? **Weed Biology and Management**, v. 16, n. 1, p. 3-15, 2016.

Sartor, ME., Quarin, CL., Espinoza, F. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. **Crop Science**, v. 49, n. 4, p. 1270-1276, 2009.

Silva, PCL., Yamashita, OM., Silva, IV., Rocha, AM., Brito, BZ., Andrade Royo, V., Andrea, AABR. Qualitative characterization of secondary metabolites of *Paspalum virgatum* weed under different water conditions. **Australian Journal of Crop Science**. 14(10):1563-1567 (2020).

Silva, WJ., Yamashita, OM., Silva, PCL., Felito, RA., Rocha, AM., Ferreira, ACT., Caioni, S. Quebra de dormência de sementes de capim-navalhão. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 15, n. 2, p. 830-842, 2018.

Smith, DB., Askew, SD., Morris, WH., Shaw, DR., Boyette, M. Droplet size and leaf morphology effects on pesticide spray deposition. **Transactions of the ASAE**, v. 43, n. 2, p. 255, 2000.

Toledo, FF., Novembre, ADLC., Chamma, HMCP. Quantidades de solução de nitrato de potássio ea germinação de sementes de *Panicum maximum* Jacq. **Scientia Agricola**, v. 3, p. 441-445, 1994.

Vieira, FA., Gusmão, E. Biometria, armazenamento de sementes e emergência de plântulas de *Talisia esculenta* Radlk.(Sapindaceae). **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1073-1079, 2008.

Capítulo 4- Aplicação sequencial de herbicidas em acessos de *Paspalum virgatum* L

Resumo: O capim-navalha (*Paspalum virgatum* L.) é uma gramínea perene encontrada em quase todos os países, sendo comum em áreas destinadas a pecuária e, devido a similaridade botânica com as espécies forrageiras, seu controle é dificultado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da aplicação sequencial de herbicidas com mecanismo de ação ALS, ACCase e EPSPS em quatro acessos de *Paspalum virgatum* L. O experimento foi realizado em condições semi-controladas, utilizando plantas em pleno estágio vegetativo e reprodutivo dos quatro acessos (PAVME, PAVRE, PAVML e PAVRL). Os tratamentos utilizados foram o herbicida imazetapir nas doses de 424, 636, 848, 1060, 1272 e 1696 g ha⁻¹ de ingrediente ativo, e também os herbicidas cletodim (240 g ha⁻¹ de ingrediente ativo) e glifosato (540 g ha⁻¹ de equivalente ácido); aos 30 dias após a aplicação realizou a segunda aplicação dos tratamentos. Foram realizadas avaliações visuais de intoxicação e análises de característica das caldas fitossanitárias aplicadas (tensão superficial e ângulo de contato). O herbicida imazetapir resultou em porcentagem de controle de aproximadamente 95% dos acessos PAVML e PAVRL, e de aproximadamente 75% para os acessos PAVRE e PAVME. O uso dos herbicidas glifosato e cletodim não resultaram em controle excelente para os acessos PAVRE e PAVME. O ângulo de contato da gota de água é maior para os acessos PAVME e PAVRE. No entanto, a aplicação sequencial do herbicida imazetapir foi eficiente para o controle das plantas dos acessos de *Paspalum virgatum* L. a partir da dose de 8 Lha⁻¹ p.c.

Palavras-chaves: Capim-navalha, controle químico, clethodim, glyphosate, imazethapyr, ângulo de contato,

Abstract: Talquezal (*Paspalum virgatum* L.) is a perennial grass found in almost all countries, being common in areas destined for livestock and, due to its botanical similarity with forage species, its control is difficult. The objective of this work was to evaluate the effectiveness of the sequential application of herbicides with the mechanism of action ALS, ACCase, and EPSPS in four accessions of *Paspalum virgatum* L. The experiment was carried out in semi-controlled conditions, using plants in vegetative stage and reproductive system of the four accessions (PAVME, PAVRE, PAVML and PAVRL). The treatments used were the herbicide imazethapyr in doses

of 424, 636, 848, 1060, 1272 and 1696 g ha⁻¹ of the active ingredient, and also the herbicides clethodim (240 g ha⁻¹ of the active ingredient) and glyphosate (540 g ha⁻¹ acid equivalent); at 30 days after application, the second application of treatments were performed. Visual intoxication assessments and characteristic analysis of the applied phytosanitary solutions (surface tension and contact angle) were carried out. The herbicide imazethapyr resulted in a control percentage of approximately 95% of the PAVML and PAVRL accessions, and of approximately 75% for the PAVRE and PAVME accessions. The use of the herbicides glyphosate and clethodim did not result in excellent control for the PAVRE and PAVME accessions. The contact angle of the water drop is greater for the PAVME and PAVRE accesses. Therefore, the sequential application of the herbicide imazethapyr was efficient for the control of the plants of the accessions of *Paspalum virgatum* L. from the dose of 8Lha⁻¹ c.p.

Keywords: Talquezal, chemical control, clethodim, glyphosate, imazethapyr, contact angle

1. Introdução

O gênero *Paspalum* possui aproximadamente 400 espécies distribuídas em todas as regiões tropical e subtropical do mundo. No Brasil, esse gênero é definido como grupo de plantas perenes, cespitosas e com colmos delgados (Oliveira e Valls, 2002; Maciel, Oliveira e Alves, 2009), com espécies que possuem valor econômico para o setor agropecuário, como por exemplo, formação de pasto para os animais e gramados esportivos (Marcón et al., 2019; Reyes-Cabrera et al., 2019; Maciel, Hama e Souza, 2010). Porém, apresenta também espécies consideradas importantes plantas daninhas, que causam enormes prejuízos econômicos, dentre elas, o capim-navalha (*Paspalum virgatum* L.) (Takeshita et al., 2018).

O capim-navalha é uma gramínea perene em encontrada em toda a América Sul; no Brasil, é encontrada em vários estados, Pará, Roraima, Mato Grosso, Maranhão, Pernambuco, São Paulo, entre outros. A presença dessa espécie é comum em áreas destinadas a pecuária onde, além de competir com as plantas forrageiras, causa enormes danos aos animais, devido a presença de estruturas cortantes na borda das folhas. É uma planta daninha extremamente agressiva no agroecossistema e de difícil controle (Silva et al., 2020).

Os desafios para elaboração de estratégias de manejo dessa espécie são enormes, pois apresentam similariedade botânica com as espécies forrageiras, é uma

planta perene, não palatável aos animais, com alta produção de sementes, com plasticidade e alta adaptabilidade ao ambiente. Além disso, as áreas na qual são infestantes muitas vezes apresentam alto declive, sendo que as operações mecânicas se tornam inviáveis (Goulart et al., 2012; Silva et al., 2020). Diante dos desafios, a estratégia mais utilizada é o controle químico, mas existe pouco conhecimento sobre qual herbicida utilizar e qual a dose que resulte no controle satisfatório da planta daninha sem causar danos às plantas forrageiras (Passini e Kranz, 1997).

Em pesquisas desenvolvidas na área de planta daninha é comum ensaios que mensurem e comparem as repostas das plantas às moléculas de herbicidas. Uma dessas ferramentas, é o ensaio dose-resposta, no qual é possível determinar qual a dose requerida para o controle das espécies de plantas daninhas, a chamada dose efetiva (ED), sendo ela ED50 ou ED90, que informa que na dose x, 90% das plantas irão ter controle (Knezevic, Streibig e Ritz, 2007; Seefeldt, Jensen e Fuerst, 1995).

Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos relacionados ao controle químico da espécie, com algumas moléculas, como trifluralin, atrazine, glyphosate (Sistachs, Fernandez e León, 1982; Takeshita et al., 2018; Gonzalez- Ibáñez, 1984). Takeshita et al. (2018) mostraram em estudo de dose-resposta do herbicida atrazine, que a dose de 500g ha⁻¹ i.a. foi eficiente para o controle do capim-navalha, mas com o aumento da dose os danos as plantas forrageiras foram significativos. Para Gonzalez-Ibáñez (1984), a aplicação direcionada de glyphosate, ou seja, a aplicação com rolo, não resultou em danos para as forrageiras. Todavia, nesse caso é possível compreender que a tolerância do uso do glyphosate está relacionada a tecnologia de aplicação utilizada, uma vez que se as forrageiras esivessem no mesmo porte da planta daninha, a aplicação de rolo não seria seletiva, podendo causar danos à forrageira.

Apesar dos estudos citados anteriormente, ainda não existe estudos sobre o uso das moléculas imazetapir e cletodim para o controle desta espécie. O imazetapir é um herbicida que pertence ao grupo dos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), grupo químico das imidazolinonas, inibindo a síntese de aminoácidos, com residual no solo (Stougaard, Shea e Martin, 1990; Loux, Liebl e Slife, 1989; Pertile et al., 2020). O cletodim pertence aos inibidores da enzima acetil A carboxilase (ACCase), sendo comumente conhecidos como graminicidas sistêmicos (Yu et al., 2007; Jordan et al., 1996). Marchioretto e Dal Magro (2017) verificaram que a

aplicação de cletodim e imazethapyr controlou *Digitaria* spp., sendo essa da mesma família de *Paspalum virgatum* L.

Contudo, estudos sobre a técnica de aplicação sequencial de herbicidas, sejam isolados ou em mistura se fazem necessários. Correia, Durigan e Leite (2008), estudaram a aplicação sequencial de glyphosate para o controle de *Commelina benghalensis* Hort., e verificaram que a aplicação sequencial não foi eficaz para o controle da espécie. Porém, Correia et al. (2010) estudaram o controle de *Digitaria insularis* L. e verificaram que a aplicação sequencial foi eficaz no controle de populações mais tolerantes da espécie. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da aplicação sequencial de herbicidas com mecanismo de ação ALS, ACCase e EPSPS em quatro acessos de *Paspalum virgatum* L.

2. Material e métodos

As sementes de *Paspalum virgatum* L. (capim-navalha) foram coletadas nos estados de Mato Grosso e Pará, onde havia relato de infestação da espécie em área de pastagem. Foram coletados quatro acessos, dois de cada estado, sendo um caracterizado com o limbo foliar mais estreito e outro mais largo, Dessa forma, denominou-se os acessos como: PAVML (Plantas coletadas no estado de Mato Grosso com limbo foliar mais largo), PAVME (Plantas coletadas no estado de Mato Grosso com limbo foliar estreito), PAVRL (Plantas coletadas no estado do Pará com limbo foliar mais largo, 8° 6'9.56"S Latitude 50° 20'48.74"O Longitude) e PAVRE (Plantas coletadas no estado do Pará com limbo foliar estreito, 8° 8'15.97"S Latitude 50° 24'27.21"O Longitude).

As sementes de *Paspalum virgatum* L. coletadas foram armazenadas em sacos de papel e transportadas ao laboratório onde foi realizada a limpeza e separação. Após o ensaio de germinação, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial da marca Bioplant[®] (composto por turfa de *Sphagnum*, fibra de coco, casca de arroz, casca de Pinus, Vermiculita, gesso agrícola, carbonato de cálcio, magnésio, termofosfato magnésiano (Yoorin) e aditivos (fertilizantes)). Foram depositadas 10 sementes por célula, devido a baixa porcentagem de germinação. Após 45 dias ocorreu o transplântio, quando as mudas foram plantadas em vasos de cinco litros contendo uma mistura de terra e areia, na proporção de 2:1 v/v. Realizou-se a amostragem da mistura de terra e areia para análise química

(Tabela 1). As plantas foram irrigadas diariamente e foram adubados com base na recomendação para adubação de pastagens formada por *Urochloa brizantha*. Durante todo o experimento foram coletados mensalmente os dados de precipitação pluviométrica, temperatura máxima e mínima e umidade relativa do ar na estação pertencente à universidade (Latitude: 21°14' 05" S - Longitude: 48°17' 09" W - Altitude: 615,01 m).

Tabela 1. Análise química da amostra coletada do substrato (terra e areia) utilizada durante a condução dos experimentos.

pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	Na	K	Al	H+Al	S.B.	CTC	Sat.	Sat.
									SMP	S.B.		Bases	Al
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³							mmol _c dm ⁻³			V%	m%
5,5	12	12	6	18	9	NS	6,9	0	19	34,5	53,5	64	1

SMP: valor do pH equilíbrio obtido na suspensão do solo com a solução tampão. SB: Soma de Bases. NS: Não solicitado.

O experimento foi realizado em condições semi-controladas em uma área externa ao laboratório. Quando as plantas dos quatros acessos estavam em plena fase vegetativa e reprodutiva, os tratamentos foram aplicados (Tabela 2). Após trinta dias da aplicação, as plantas foram submetidas novamente a aplicação dos mesmos tratamentos. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Para a aplicação foi utilizado um pulverizador costal, com a pressão constante (mantida por CO₂ comprimido) de 2,8 bar, munido de barra com duas pontas de pulverização XR 11002, espaçadas de 0,5 m, com consumo de calda equivalente a 200 L ha⁻¹. A média da temperatura na sala de pulverização durante a aplicação dos tratamentos foi de 31,2°C e 33,2°C, umidade relativa do ar 48% e 61%, para primeira e segunda aplicação dos tratamentos, respectivamente.

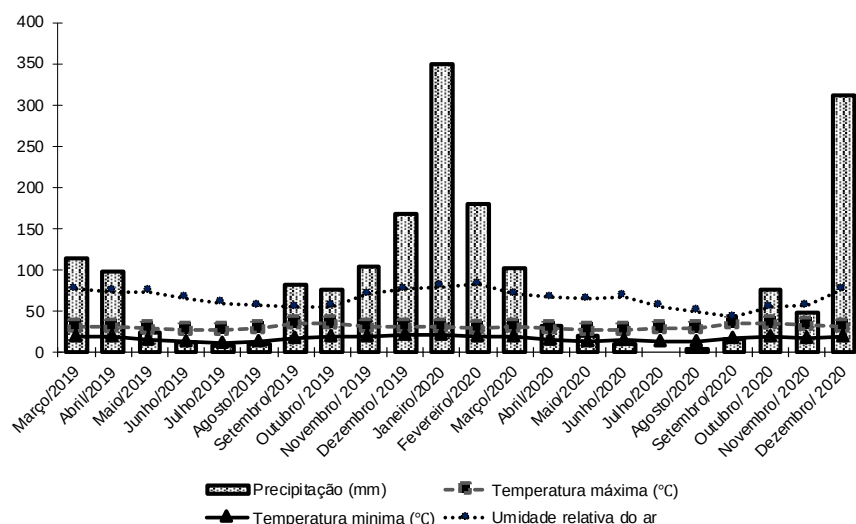


Figura 2- Condições meteorológicas correspondente ao período que as plantas estavam sendo cultivadas e realização dos experimentos. Jaboticabal, São Paulo.

Foram feitas avaliações visuais de intoxicação das plantas aos 7, 14, 28, 35, 42, 49 e 56 dias após a aplicação dos tratamentos para as plantas no estágio reprodutivo e 7, 14, 28, 35, 42 dias para as plantas o estágio vegetativo, conforme a escala de notas ALAM (1974), juntamente com registros fotográficos dos principais sintomas de intoxicação.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos e nome dos produtos comerciais utilizadas no experimento.

Tratamentos	Ingrediente ativo	Nome comercial	Tipo de formulação	Dose*(g ha ⁻¹)
1	Imazethapyr	Pistol®	CS	424
2	Imazethapyr	Pistol®	CS	636
3	Imazethapyr	Pistol®	CS	848
4	Imazethapyr	Pistol®	CS	1060
5	Imazethapyr	Pistol®	CS	1272
6	Imazethapyr	Pistol®	CE	1696
7	Cletodim	Select®	CS	240
8	Glyphosate	Crucial®	CS	540
9	Água	-	-	-

*Ingrediente ativo e equivalente ácido. CS= concentrado solúvel e CE= concentrado emulsionável. O adjuvante óleo mineral foi adicionado na proporção de 5% v/v nos tratamentos 1 a 8.

Além disso, determiniu-se o ângulo de contato e tensão superficial dos tratamentos herbicidas utilizados. Para a determinação da tensão superficial e ângulo de contato, foi utilizado o tensiômetro Contact Angle System OCA 15-Plus (Dataphysics®), munido de câmera digital de alta resolução temporal e definição com o software SCA20® para automatização e processamento das imagens obtidas. A tensão superficial foi determinada pelo método da gota pendente, no qual a imagem da gota formada na ponta de uma seringa é capturada por uma câmera CCD de alta resolução temporal (30 frames por segundo); o cálculo da tensão superficial é realizado com base na equação de Yang-Laplace, em função da deformação das gotas emitidas em cada amostragem (FERREIRA et al., 2013).

Para o ângulo de contato das gotas foram feitas as avaliações nos quatros acessos do *Paspalum virgatum* L., na superfície adaxial das folhas, sendo as folhas coletadas de plantas adultas em pleno estágio de desenvolvimento, sempre na terceira folha totalmente expandida, e como superfície padrão foi utilizado o Parafilm®. Tanto a tensão estática como o ângulo de contato foram mensurados durante 60 segundos e, para fins de comparação, utilizou-se a leitura aos 15 segundos. Para a tensão superficial e ângulo de contato da gota na superfície do Parafilm® utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, para o ângulo de contato da superfície dos acessos de *P. virgatum* foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x9, na qual o fator A correspondeu a superfície foliar dos quatros acessos e o fator B correspondeu os tratamentos, com quatro repetições.

Os dados de nota visual foram submetidos a análise da variância e, quando significativos, foram submetidas ao modelo log-logístico (Seefeldt, Jensen e Fuerst 1995), polinomial e linear com auxílio do programa OriginPro 8.0®. Os dados de tensão e ângulo de contato foram submetidos a análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade e ao teste de Bartlett a 5% de probabilidade no intuito de verificar a homogeneidade da variância. Em seguida, foram realizadas a análise de variância pelo teste F e, havendo significância, as médias foram comparadas ao teste de Tukey ($p>0,05$), utilizando o software R Core Team (2019).

3. Resultados

Em geral, a aplicação dos tratamentos proporcionou grau de controle classificado pela escala ALAM (1974) como muito bom e excelente para os quatros acessos de *P. virgatum* no estágio vegetativo. Porém, a utilização dos tratamentos no estágio reprodutivo não resultou no mesmo nível de controle, evidenciando as repostas diferentes que cada acesso apresentou aos herbicidas.

A porcentagem de controle com o herbicida cletodim apresentou comportamento linear nos dias de avaliação, em ambos os acessos e estágios de desenvolvimento (Tabela 3). O uso do cletodim no estágio vegetativo resultou em 91,25%, 85%, 85% e 92% para os acessos PAVRE, PAVME, PAVRL e PAVML, respectivamente, aos 42 dias após aplicação (Figura 2 A). Aos 30 dias após a primeira aplicação, o controle das plantas estava em grau regular (40 a 60% de controle), mas depois da segunda aplicação o grau de controle evoluiu para muito bom; em todos os acessos era perceptível os sintomas de intoxicação causados pelo herbicida.

No estágio reprodutivo, os acessos apresentaram diferenças na resposta ao herbicida, sendo que visualmente os sintomas de intoxicação foi maior para os acessos PAVML (83%) e PAVRL (91%), que foram classificados com muito bom, mas para os acessos PAVRE (67%) e PAVME (66%) a classificação foi de suficiente aos 56 dias após aplicação (Figura 2 B). Diante disso, a aplicação sequencial do herbicida cletodim foi essencial para aumentar o nível de controle dos acessos PAVRE e PAVME.

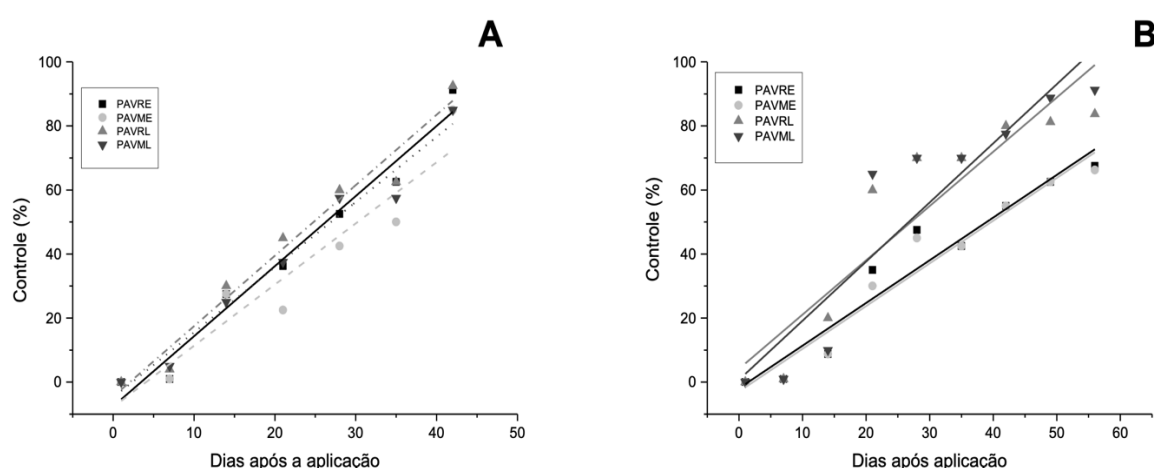


Figura 2- Porcentagem de controle dos acessos de *Paspalum virgatum* L. nos dois estágios de desenvolvimento (A- vegetativa e B- reprodutiva), após a aplicação do herbicida cletodim ($240 \text{ g ha}^{-1} \text{ i.a.}$).

A eficácia do herbicida glifosato apresentou comportamento linear durante os dias de avaliação (Tabela 3). No estágio vegetativo, o grau de controle dos acessos foi classificado como muito bom e excelente, de 85%, 90%, 82,5% e 95% para os acessos PAVRE, PAVME, PAVRL e PAVML, respectivamente (Figura 3 A).

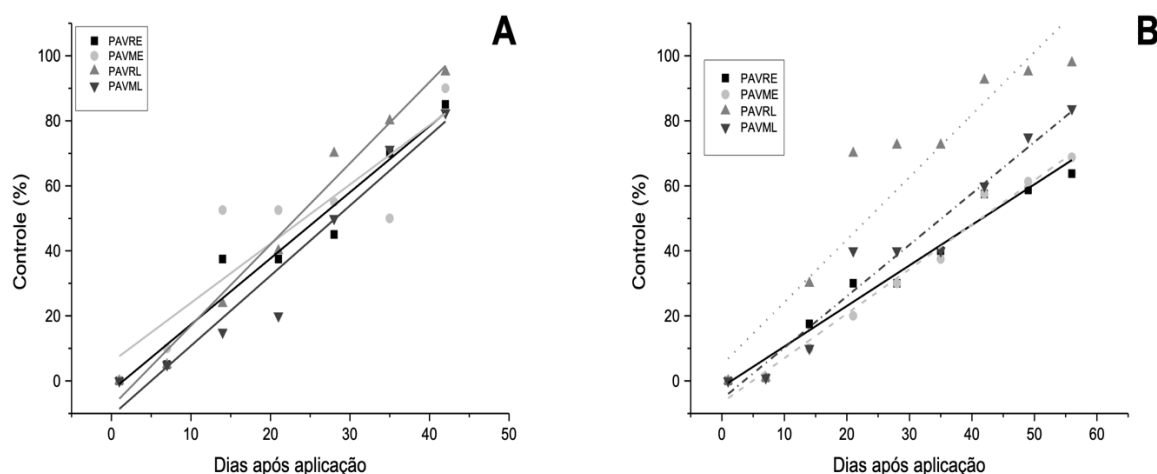


Figura 3- Porcentagem de controle dos acessos de *Paspalum virgatum* L. nos dois estágios de desenvolvimento (A- vegetativa e B- reprodutiva), após a aplicação do herbicida glifosato (540 g ha⁻¹ i.a.).

O nível de controle aos 30 dias após a primeira aplicação era entorno de 40%. Assim, a aplicação sequencial do herbicida glifosato interferiu positivamente no aumento do nível de controle em todos os acessos. No entanto, o mesmo comportamento relatado para o cletodim foi observado para o herbicida glifosato, sendo que a aplicação do herbicida no estágio reprodutivo resultou em diferentes respostas dos acessos.

No estágio reprodutivo, os acessos PAVRE e PAVME apresentaram controle de aproximadamente 63% e 68%, respectivamente, aos 56 dias após a aplicação. Mesmo com aplicação sequencial ocorrida aos 30 dias após a aplicação, a taxa de controle ao final do experimento foi classificada como suficiente (Figura 3 B), diferente do observado para os acessos PAVRL e PAVML, que apresentaram controle de 83% e 97%, respectivamente.

Tabela 3- Parâmetros do modelo de regressão linear ($y = a + b \cdot x$) para porcentagem de controle após a aplicação dos herbicidas cletodim (240 g ha⁻¹ i.a.) e glifosato (540

g ha⁻¹ i.a.). em acessos de *Paspalum virgatum* L. nos estágios vegetativo e reprodutivo.

Acessos	Vegetativo			Reprodutivo		
	a	b	R ²	a	b	R ²
Cletodim						
PAVRE	-7,57	2,18	0,96	-1,94	1,33	0,92
PAVME	-7,76	1,91	0,83	-2,93	1,33	0,94
PAVML	-4,82	2,03	0,96	0,72	1,84	0,83
PAVRL	-4,53	2,20	0,96	4,14	1,69	0,84
Glifosato						
PAVRE	-3,01	2,03	0,94	-1,85	1,24	0,96
PAVME	5,78	1,82	0,76	-6,67	1,36	0,97
PAVML	-10,77	2,15	0,93	-5,57	1,58	0,94
PAVRL	-7,98	2,49	0,97	4,99	1,92	0,86

Para o herbicida imazetapir, a porcentagem de controle apresentou comportamento polinomial, em todos os acessos e doses utilizadas (Tabela 4). No estágio vegetativo, as doses de 424 g ha⁻¹ e 636 g ha⁻¹ proporcionaram nível de controle, aos 42 dias após aplicação, de aproximadamente 72%, 70%, 90% e 82%, para os acessos PAVRE, PAVME, PAVRL e PAVML, respectivamente (Figura 4 A).

Na dose de 424 g ha⁻¹ aos 30 dias após a aplicação, o nível de controle foi próximo de 20%, ou seja, não havia controle da espécie, mas após a aplicação sequencial, houve o aumento no nível de controle. Para a dose de 636 g ha⁻¹, os acessos apresentaram diferenças aos 30 dias após aplicação, quando os acessos PAVRL e PAVML apresentavam porcentagem de controle próximo de 50% e os acessos PAVRE e PAVME apresentavam aproximadamente 30% (Figura 4 B). Assim, o uso das doses de 424 g ha⁻¹ e 636 g ha⁻¹ evidenciam as diferenças na resposta dos acessos ao herbicida.

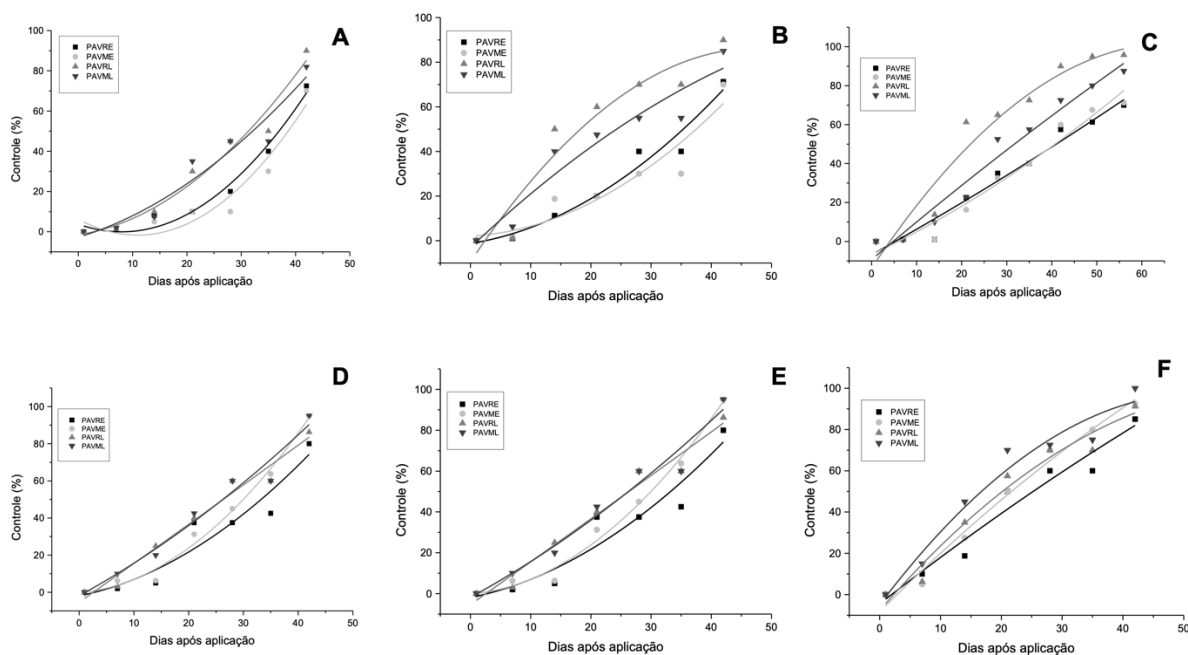


Figura 4- Porcentagem de controle dos acessos de *Paspalum virgatum* L. no estágio vegetativo após a aplicação do herbicida Imazetapir. A- 424 g ha⁻¹ i.a. B- 636 g ha⁻¹ i.a. C- 848 g ha⁻¹ i.a. D- 1060 g ha⁻¹ i.a. E- 1272 g ha⁻¹ i.a. F- 1696 g ha⁻¹ i.a.

As doses de 848, 1060, 1272 e 1696 g ha⁻¹ proporcionaram grau de controle classificado com excelente e muito bom para todos os acessos. A porcentagem de 100% de controle foi observada para os acessos PAVRL e PAVML com as doses de 848 e 1696 g ha⁻¹, respectivamente (Figura 4 C e F). Os acessos PAVRE e PAVME resultaram em porcentagem de controle de 80 e 90% na dose de 848 g ha⁻¹, mesmo grau de controle foi observado para as doses de 1060, 1272 e 1696 g ha⁻¹ (Figura 4 D, E e F). Portanto, o uso da dose de 848g ha⁻¹ é adequada para controle dos acessos no estágio vegetativo. Essa informação é importante para que possa ser utilizada quantidades menores de herbicidas e com o mesmo nível de controle, visando diminuir os custos financeiros e, principalmente, o impacto ambiental.

Para o estágio reprodutivo, os acessos apresentaram mesmo comportamento que foi observado para o estágio vegetativo, ou seja, aos 30 dias a porcentagem de controle foi inferior a 60% independentemente da dose (Figura 5 A, B, C, D, E e F). Após a segunda aplicação do herbicida imazetapir nas respectivas doses foi possível observar maior nível de intoxicação das plantas, logo, maior porcentagem de controle.

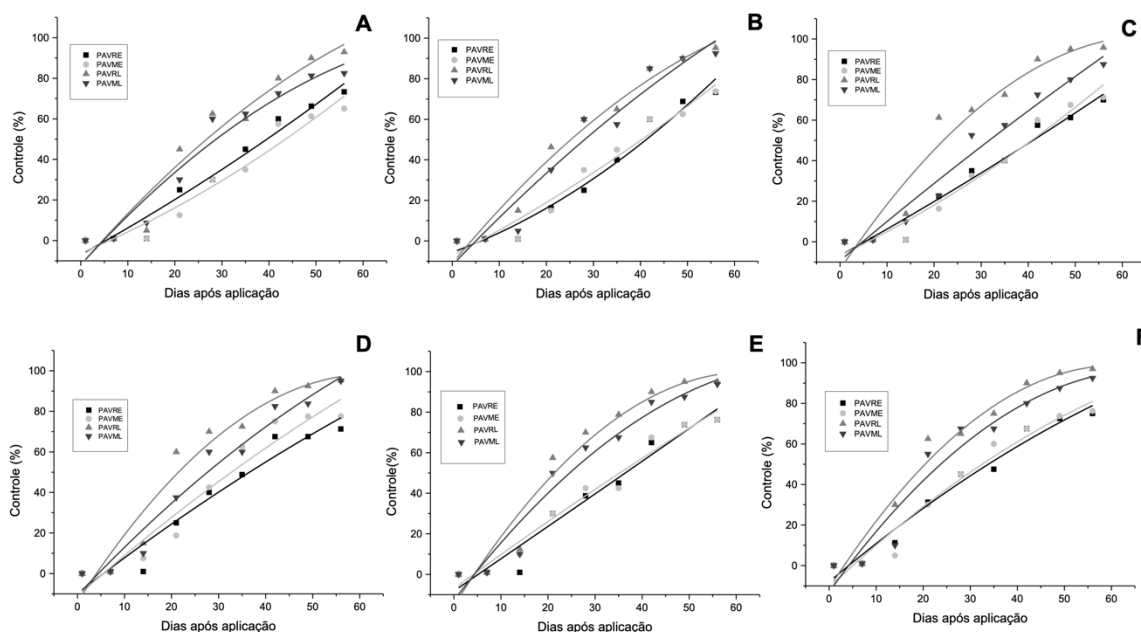


Figura 5- Porcentagem de controle dos acessos de *Paspalum virgatum* L. no estágio reprodutivo após a aplicação do herbicida Imazetapir. A- 424 g ha⁻¹ i.a. B- 636 g ha⁻¹ i.a. C- 848 g ha⁻¹ i.a. D- 1060 g ha⁻¹ i.a. E- 1272 g ha⁻¹ i.a. F- 1696 g ha⁻¹ i.a.

Aos 56 dias após a aplicação, os acessos PAVML e PAVRL apresentaram porcentagem de controle de aproximadamente 93% e 95%, respectivamente, enquanto os acessos PAVRE e PAVME obtiveram a porcentagem de controle de 76% e 70%, respectivamente (Figura 5 E e F). Assim, os acessos PAVRE e PAVME apresentaram maior tolerância ao herbicida mesmo em altas doses. Desse modo, o uso do herbicida imazetapir resultou em maior porcentagem de controle para as plantas no estágio reprodutivo comparado aos herbicidas glifosato e cletodim, mas é importante ressaltar que o nível de controle obtido neste trabalho deve-se a aplicação sequencial.

Tabela 4- Parâmetros do modelo de polinomial ($y = \text{intercept} + B1 \cdot x^1 + B2 \cdot x^2$) para porcentagem de controle após a aplicação do herbicida Imazetapir em acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	Parâmetros	424gha ⁻¹ *	636gha ⁻¹	848gha ⁻¹	1060gha ⁻¹	1272gha ⁻¹	1696gha ⁻¹
Vegetativo							
	Intercept	3,758	-1,227	-4,933	-1,938	0,361	-4,486
PAVRE	B1	0,95	0,422	1,614	0,607	2,606	2,309
	B2	0,059	0,029	0,007	0,028	-0,015	-0,005

PAVME	R ²	0,969	0,945	0,926	0,872	0,93	0,934
	<i>Intercept</i>	6,258	2,067	1,964	-0,193	-0,301	-8,301
	B1	-1,458	0,142	0,665	0,255	1,498	2,948
	B2	0,067	0,03	0,029	0,047	0,016	-0,011
PAVRL	R ²	0,898	0,834	0,918	0,982	0,941	0,978
	<i>Intercept</i>	-1,482	-9,465	-11,347	-5,341	-6,911	-7,731
	B1	0,411	4,029	4,507	2,082	2,096	3,395
	B2	0,039	-0,042	-0,046	7,55E-04	1,18E-04	-0,026
PAVML	R ²	0,951	0,891	0,903	0,957	0,934	0,953
	<i>Intercept</i>	-2,724	-3,073	-0,744	-1,85	2,308	-4,917
	B1	0,81	2,558	1,536	1,615	1,851	3,901
	B2	0,025	-0,015	0,017	0,013	0,005	-0,037
Reprodutivo							
PAVRE	<i>Intercept</i>	-6,909	-5,599	-6,81	-9,791	-8,192	-8,004
	B1	1,275	0,842	1,285	1,799	1,586	1,959
	B2	0,004	0,012	0,002	-0,004	3,00E-04	-0,007
	R ²	0,956	0,958	0,954	0,929	0,943	0,964
PAVME	<i>Intercept</i>	-6,197	-7,265	-6,714	-11,115	-7,018	-10,746
	B1	0,968	1,201	1,094	2,053	1,703	2,184
	B2	0,007	0,005	0,007	-0,005	-0,002	-0,009
	R ²	0,938	0,95	0,952	0,922	0,957	0,945
PAVRL	<i>Intercept</i>	-12,045	-11,087	-13,667	-14,038	-15,457	-11,126
	B1	2,659	2,807	3,471	3,6	3,700	3,598
	B2	-0,012	-0,015	-0,026	-0,028	-0,029	-0,029
	R ²	0,926	0,963	0,93	0,932	0,933	0,96
PAVML	<i>Intercept</i>	-11,95	-11,998	-9,341	-10,761	-12,782	-12,969
	B1	2,558	2,429	1,963	2,466	3,030	3,213
	B2	-0,014	-0,008	-0,002	-0,009	-0,019	-0,023
	R ²	0,936	0,931	0,956	0,952	0,940	0,921

* g ha⁻¹ ingrediente ativo.

Dose do herbicida imazetapir em reposta dos acessos evidencia as diferenças entre si, especialmente na fase reprodutiva das plantas. Na Figura 6A observa-se que para os acessos PAVRL e PAVML o grau de controle foi alto comparado aos acessos PAVRE e PAVME; o acesso PAVML apresentou estabilização na eficácia de controle com 424 g ha^{-1} do herbicida, diferentemente dos demais acessos, nos quais ocorreu a estabilização da dose a 1060 g ha^{-1} do herbicida.

A Figura 6B apresenta o comportamento das plantas na fase reprodutiva em relação as doses utilizadas, corroborando o relatado anteriormente, quando os acessos PAVRE e PAVME não responderam ao aumento da dose. Possivelmente, as plantas apresentaram maior tolerância ao herbicida mesmo utilizando a aplicação sequencial. Esse fato pode estar relacionado ao fato das folhas serem visualmente menores que as dos acessos PAVRL e PAVML. O acesso PAVRE e PAVME requerem maior dosagem para causar danos em 50% das plantas (E50), independente do estágio de desenvolvimento, em comparação aos acessos PAVML e PAVRL (Tabela 5).

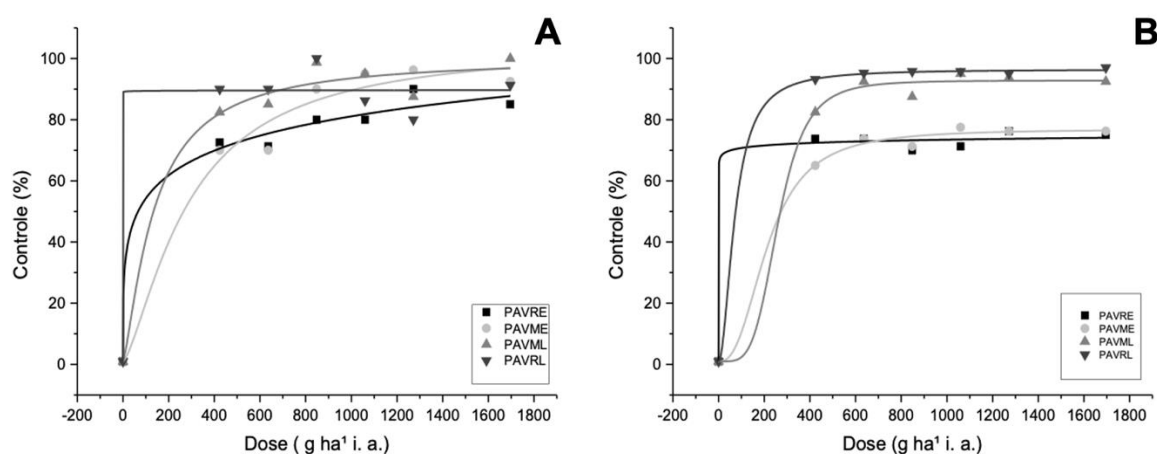


Figura 6- Porcentagem de controle dos acessos de *Paspalum virgatum* L. em resposta as dosagens utilizadas do herbicida Imazetapir nos dois estágios de desenvolvimento A- vegetativa e B- reprodutiva.

Para averiguar o quanto os tratamentos utilizados interferiram no controle químico dos acessos, realizou-se a análise de tensão superficial e ângulo de contato das superfícies. De modo geral, os tratamentos foram significativos ($p > 0,0001$) para tensão superficial e ângulo de contato da superfície artificial utilizada. Na tensão superficial, todos os tratamentos foram diferentes da testemunha ($59,57 \text{ mNm}^{-1}$), as

caldas fitossanitárias contendo os herbicidas glifosato e cletodim apresentaram valores altos de tensão superficial, apesar da adição do adjuvante, 37,07 mNm⁻¹ e 38,32 mNm⁻¹ (Tabela 6). Dentre as caldas contendo o herbicida imazetapir, observou-se que com o aumento da dose houve a diminuição da tensão superficial.

Tabela 5- Parâmetros do modelo de log-logística ($y = A2 + ([A1-A2] / [1 + (x/x_0)]^p)$) para porcentagem de controle após a aplicação do herbicida Imazetapir em acessos de *Paspalum virgatum* L.

Acessos	Parâmetros	Vegetativo	Reprodutivo
PAVRE	A1	1	1
	A2	183,13	134,51
	E50	238,49	806,0
	p	0,27	0,03
	R ²	0,97**	0,98**
PAVME	A1	1,06	0,99
	A2	104,82	76,88
	E50	215,8	287,4
	p	1,41	2,52
	R ²	0,95**	0,99**
PAVRL	A1	1	0,99
	A2	100,26	96,42
	E50	72,15	136,01
	p	1,31	1,91
	R ²	0,96**	0,99**
PAVML	A1	1	0,99
	A2	159,71	92,79
	E50	115,44	261,97
	p	0,002	4,32
	R ²	0,93**	0,99**

A1 é o maior limite da curva (média da resposta do controle das plantas), A2 é o menor limite da curva (média da resposta da alta dosagem do herbicida), p é a inclinação da curva ao redor E50. E50 é a dose requerida do herbicida imazetapir para causar 50% de danos nas plantas.

**Significativo a $p < 0,001$. Vegetativo aos 42 dias após a primeira aplicação e reprodutivo aos 56 dias após a primeira aplicação.

Para o ângulo de contato na superfície abaxial (Tabela 6), os herbicidas glifosato e cletodim resultaram em maiores valores entre os tratamentos com 70,98 ° e 67,53°, respectivamente. Entre as caldas fitossanitárias contendo o herbicida imazetapir, não foram observadas diferenças significativas entre si. Todos os tratamentos apresentaram menor ângulo de contato com a superfície em comparação com a testemunha, com exceção do herbicida cletodim.

Tabela 6- Valores da análise de variância da tensão superficial e ângulo de contato das caldas fitossanitárias nas superfícies abaxiais de *Paspalum virgatum* L.

Tratamentos	Tensão superficial (mNm ⁻¹)		Ângulo de contato Parafilme®(°)	
Imazethapyr (424 g ha ^{-1*})	33,92 ±0,004	cd	55,43±0,04	bc
Imazethapyr (636 g ha ^{-1*})	34,59 ±0,003	c	50,34±0,15	c
Imazethapyr (848 g ha ^{-1*})	33,22 ±0,008	d	55,15±0,09	bc
Imazethapyr (1060 g ha ^{-1*})	33,10 ±0,004	d	55,68±0,05	bc
Imazethapyr (1272 g ha ^{-1*})	32,84 ±0,002	de	68,43±0,32	b
Imazethapyr (1696 g ha ^{-1*})	31,84±0,003	e	42,48±0,18	c
Cletodim (240 g ha ^{-1*})	37,07±0,004	b	70,98±0,04	ab
Glyphosate (540 g ha ^{-1**})	38,32 ±0,004	b	67,53±0,07	b
Controle	59,57±0,004	a	89,06±0,17	a
Coeficiente de variação (%)	0,55		2,46	
Causas de variação	F	P valor	F	P valor
Tratamentos	305,98**	<0,0001	16,489**	<0,0001

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). * g ha⁻¹ ingrediente ativo. ** g ha⁻¹ equivalente ácido.

Para o ângulo de contato na superfície adaxial dos acessos, foram significativos os fatores superfície (p>0,01), tratamentos (p<0,0001) e para interação superfície e tratamentos (p<0,0001). Dentro de cada tratamento observou-se a diferença do comportamento da gota nas superfícies, os acessos PAVME, PAVRL e PAVML não foram diferentes estatisticamente entre si no tratamento 424 g ha⁻¹, mas o acesso PAVRE apresentou menor ângulo de contato (41,74°) (Tabela 7).

Na dose 636 g ha⁻¹, os acessos PAVME e PAVRL não foram diferentes entre si, e o acesso PAVRE e PAVME também não foram estatisticamente diferentes entre si. Neste caso, possivelmente, se deve ao fato de a gota ter entrado em contato com alguma estrutura foliar, por exemplo os tricomas, que facilitou o seu espalhamento. Com a dose de 848 g ha⁻¹, observou-se o mesmo comportamento da dose de 424 g ha⁻¹, sendo que os acessos PAVME, PAVML e PAVRL não foram diferentes estatisticamente. Com as doses de 1060 e 1272 g ha⁻¹, o acesso PAVRL apresentou menor ângulo de contato, e com a dose de 1696 g ha⁻¹ não foram observadas diferenças entre as respostas das superfícies.

Para o herbicida cletodim, os acessos PAVME e PAVRE não resultaram em diferenças significativas entre si, com valores altos de ângulo de contato (105,14 ° e 113,53 °, respectivamente) em comparação aos acessos PAVML e PAVRL (59,22 ° e 67,48 °, respectivamente). O mesmo comportamento foi observado para o herbicida glifosato, sendo os menores valores observados para os acessos PAVML e PAVRL. Em relação ao comportamento da gota de água (testemunha) nas superfícies, os acessos PAVME e PAVRE apresentaram maior ângulo de contato (136,45 ° e 122,32 °, respectivamente), corroborando o observado para a porcentagem de controle das plantas, uma vez que esses valores indicam que a superfície foliar é extremamente hidrofóbica.

Dentro dos acessos PAVME e PAVRE, os herbicidas cletodim e glifosato resultaram em maior ângulo de contato em comparação com os tratamentos contendo o herbicida imazetapir, indicando que, possivelmente, o controle não eficiente desses herbicidas para os acessos está relacionado ao menor espalhamento da gota, que consequentemente interferiu na penetração e absorção do produto. Esse fato não foi observado para os acessos PAVRL e PAVML, pois não houve diferenças entre os tratamentos contendo o herbicida imazetapir.

Tabela 7- Valores da análise de variância do ângulo de contato (°) das caldas fitossanitárias nas superfícies adaxiais dos acessos de *Paspalum virgatum* L.

Tratamentos	PAVME	PAVML	PAVRL	PAVRE
Imazethapyr (424 g ha ^{-1*})	58,99 aC	53,81 abBC	56,50 aAB	41,74 bCD
Imazethapyr (636 g ha ^{-1*})	54,75 aCD	27,25 bE	60,87 aAB	22,03 bE
Imazethapyr (848 g ha ^{-1*})	32,91 bE	33,53 bDE	32,16 bC	48,40 aCD

Imazethapyr (1060 g ha ^{-1*})	44,99 abcCDE	39,81 bcCDE	33,50 cC	51,33 abCD
Imazethapyr (1272 ha ^{-1*})	39,55 bcCDE	47,60 bcBCD	38,68 cC	57,26abC
Imazethapyr (1696 g ha ^{-1*})	41,43 aDE	38,38 aCDE	33,38 aC	39,56 aD
Cletodim (240 g ha ^{-1*})	105,14 aB	59,22 bB	67,48 bA	113,33 aAB
Glyphosate (540 g ha ^{-1**})	104,64 aB	58,09 bcB	45,19 cBC	97,47 aB
Controle	136,45 aA	92,76 cA	74,18 dA	122,32 bA

Coeficiente de variação (%)

9,98

Causas de variação	F	P valor
Superfícies	3,2759*	0,0135
Tratamentos	149,81**	<0,0001
Superfícies vs. Tratamentos	13,391**	<0,0001

Letras minúsculas iguais nas linhas para superfície dentro de cada tratamento não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Letras maiúsculas iguais nas colunas dentro de cada superfície não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). * g ha⁻¹ ingrediente ativo.** g ha⁻¹ equivalente ácido.

4. Discussão

Neste estudo, a resposta dos acessos de *Paspalum virgatum* L. foi notadamente diferente, independente dos herbicidas utilizados. No estágio vegetativo da planta ocorreu maior porcentagem de controle, uma vez que as plantas estavam em pleno vigor e com metabolismo acelerado. Presumivelmente, as plantas jovens apresentam menor deposição da cera epicuticular e cutículas mais finas (King e Radosevich, 1979), podendo ter colaborado para maior absorção dos herbicidas cletodim e glifosato nesse estágio.

A utilização do herbicida cletodim, inibidor da acetil-coenzima A carboxilase (ACCase), não causou danos suficientes que resultassem em um controle eficiente dos acessos PAVME e PAVRE no estágio reprodutivo. Yu et al. (2007) relataram que na Austrália, devido o uso contínuo do herbicida, houve a seleção de populações resistentes ao herbicida em plantas de *Lolium rigidum* Gaud. Esse acontecimento corrobora a necessidade de maiores estudos sobre a espécie, especialmente esses dois acessos, pois, no futuro próximo, poderá ocorrer a seleção de plantas resistentes a vários mecanismos de ação.

Apesar do glifosato pertencer a outro mecanismo de ação, o inibidor da enzima enol-piruvilshiquimatofosfato sintase (EPSPS), ele resultou no mesmo padrão de comportamento de resposta da planta que o herbicida cletodim. O herbicida glifosato é absorvido de forma gradual pela cutícula das folhas e, por isso, necessita de 6 horas (dependendo da formulação do herbicida) sem a ocorrência de chuva para haver o controle adequado (Kruse, Trezzi e Vidal, 2000). As plantas de *Paspalum virgatum* L. somente foram expostas a chuva 24 horas após a aplicação, ou seja, não houve interferência de fatores externos na eficácia de controle; além disso, no momento da aplicação, as plantas estavam turgidas. Santos et al. (2016) estudaram a resposta das plantas de *Synedrellopsis grisebachii* Hieron. & Kuntze observaram que na fase reprodutiva as plantas foram mais tolerantes ao herbicida glifosato, devido a menor absorção do herbicida nos órgãos reprodutivos. Portanto, o mesmo pode ter ocorrido nas plantas de *Paspalum virgatum* L., em que na fase reprodutiva a porcentagem de controle foi inferior a 67% para os acessos PAVRE e PAVME.

Villarreal e Vargas (1989) avaliaram o uso do glifosato e fluazifop-butil para o controle de *Paspalum virgatum* L. em pastagens e relataram que a aplicação do herbicida glifosato em plantas jovens resultou em controle de aproximadamente 86% e plantas mais velhas (fase reprodutiva) o controle foi de 68%, semelhante ao observado neste trabalho para os acessos PAVRE e PAVME. Mello, Souza e Tironi (2016), estudaram o controle químico de *Paspalum maritimum* Trin. e observaram que o controle químico pelo uso do herbicida glifosato foi satisfatório após os 28 dias da aplicação, diferente do resultado obtido neste trabalho, uma vez que a dose utilizada neste trabalho foi menor. Mesmo os acessos PAVML e PAVRL que apresentam maior nível de controle, aos 28 dias a porcentagem de controle era inferior a 50%. Assim, o controle de *Paspalum virgatum* L. foi mais tolerante aos herbicidas nas doses utilizadas.

Vale ressaltar que os valores de porcentagem de controle obtidos neste trabalho se devem a aplicação sequencial dos tratamentos que ocorreu aos 30 dias. Resultado semelhante foi observado para *Urochloa brizantha* Hochst. ex A. Rich. por Santos et al. (2007), que estudaram o controle químico da espécie em pastagens formadas por Tifton 85 e observaram que a dosagem 365,63 g e.a. ha⁻¹ resultou em 90% de controle após a aplicação sequencial do herbicida. Em estudo realizado com *Digitaria insularis* L. os melhores resultados de controle foram obtidos com a aplicação sequencial dos herbicidas cletodim e glifosato em mistura (Mendes et al., 2020),

reforçando que o uso da técnica de aplicação sequencial é uma importante ferramenta na elaboração de estratégias de manejo.

No entanto, a adoção da aplicação sequencial deve ser bem avaliada, pois havendo escapes, ou seja, baixo nível de controle como foi para os acessos PAVME e PAVRE, pode contribuir para a seleção de biótipos resistentes. Ao redor do mundo e no Brasil foram relatados diversos casos da existência de biótipos resistentes ao herbicida glifosato, como por exemplo, plantas de azevém (*Lolium multiflorum* Lam. e *Lolium rigidum* (Gaud.)), cochia (*Kochia scoparia* L.) e buva (*Conyza canadenses* L. Cronq.) (Ruchel et al., 2015; Lorraine-Colwill et al., 2002; Kumar, Jha e Reichard, 2014; Muller et al., 2003; Zelaya, Owen e VanGessel, 2004; Duke 2010).

Os resultados obtidos após a aplicação do herbicida imazetapir enfatizam a necessidade de maiores estudos sobre a resposta fisiológica e metabólica das plantas ao herbicida. As doses utilizadas foram de 4x até 16x maiores que a recomendada pelo fabricante e apesar de haver o controle satisfatório para os acessos PAVML, PAVRL, PAVME e PAVRE na dose de 848 g ha⁻¹ em ambos os estágios de desenvolvimento, evidencia a preocupação desses acessos apresentarem alta tolerância ao herbicida. Em campo, a aplicação de altas doses pode dificultar o manejo do pasto, causar enorme impacto ambiental, uma vez que esse herbicida é fortemente adsorvido pelo solo, mesmo sendo pouco móvel, mas sendo mais fitotóxico para culturas subsequentes (Stougaard, Shea e Martin, 1990). Loux, Liebl e Slife (1989) relataram que o herbicida causou danos para as culturas subsequentes depois de cinco meses após a aplicação. Áreas de Latossolo vermelho distófico com textura argilosa tendem a apresentar maior retenção do herbicida (Oliveira et al., 2004), ainda que Pertile et al. (2020) relataram que o efeito do herbicida na biomassa microbiana do solo seja de curto prazo.

A dose resposta do herbicida imazetapir demonstra que mesmo em altas doses a porcentagem de controle foi estável, ou seja, a dose que pode ser utilizada e obtém para todos os acessos um bom nível de controle foi de 848 g ha⁻¹, que corresponde a 8x a dosagem recomendada pelo fabricante. A adoção de doses mais altas mantém o mesmo nível de controle, mas com maior custo financeiro. Villarreal e Vargas (1989) relataram que o custo foi maior para o controle das plantas na fase reprodutiva que para plantas jovens, podendo ter o dobro do custo. Assim como para os herbicidas cletodim e glifosato, as plantas apresentaram menor porcentagem de controle aos 30 dias após a aplicação do herbicida imazetapir, necessitando de aplicação sequencial

para elevar o nível de controle em ambos os acessos. Villarreal e Vargas (1989) também relataram que para o controle de *P. virgatum* recomenda-se a reaplicação dos herbicidas entre 45 e 60 dias depois da primeira aplicação. Esse fato, aumenta o custo operacional do controle químico, ressaltando que o uso adequado da dose do herbicida pode contribuir para diminuição do custo operacional.

A E50 dos acessos PAVRE e PAVME foram maiores que dos acessos PAVRL e PAVML, sendo que pode ser um indicativo para resistência desses acessos ao herbicida. Neve e Powles (2005) estudaram biótipos de *Lolium rigidum* (Gaud.) *in vitro* e observaram que os biótipos apresentaram inibição do ácido diclofop confirmando a resistência. Os estudos mostraram a resistência aos herbicidas fluazifop-P-butil, haloxifop-R-metil e o imazetapir, ratificando com relatado anteriormente. O estudo sobre o mecanismo de resistência ao imazetapir da espécie *Echinochloa crus-galli* L., observaram que as plantas possuem mecanismos que inibiram a degradação do herbicida (Dalazen et al., 2018). Dalazen et al. (2020) relacionaram também que os biótipos resistentes foram ainda mais insensíveis ao herbicida imazetapir (848 g ha⁻¹) com o aumento da concentração de CO₂. Considerando as mudanças climáticas e o aumento de CO₂, os acessos de *P. virgatum* podem adaptar-se as condições ambientais e tornar-se ainda mais árduo o controle dos acessos, principalmente pela espécie apresentar um metabolismo C4 (Fernando et al., 2016; Refatti et al., 2019).

Os acessos de *P. virgatum* apresentam grandes diferenças anatômicas e morfológicas, como folhas menores em comprimento e largura (PAVME e PAVRE). Além dessas características, a superfície foliar pode ter influenciado na porcentagem de controle, pois as plantas do PAVRE e PAVME obtiveram maior ângulo de contato que os acessos PAVML e PAVRL, ou seja, foram classificadas com hidrofóbicas (Tang, Dong e Li, 2008), a pouca afinidade das soluções com a superfície pode ter interferido na absorção e penetração do produto apesar do uso do adjuvante.

Em geral, a adição de produtos fitossanitários na água pode reduzir a tensão superficial e, conseqüentemente, o ângulo de contato, pois as formulações dos herbicidas também são compostas por inertes, e muitas vezes esses inertes podem conter adjuvantes (Cunha, Alves e Marques, 2017). A diferença na formulação dos inertes pode ter influenciado na tensão superficial ser maior nas caldas fitossanitárias que havia glifosato e cletodim, apesar da adição do adjuvante não iônico. Os resultados obtidos para ângulo de contato e tensão superficial ratificam os resultados obtidos no controle químico dos acessos após a aplicação dos três herbicidas.

As diferenças de controle observada neste trabalho para os acessos evidenciam a necessidade de mais pesquisas sobre a planta, ou seja, de mais informações sobre a espécie, adotando todos os cuidados na estratégia de controle para não favorecer o surgimento de resistência. Especialmente, os acessos PAVME e PAVRE, que apresentam diferenças morfológicas, anatômica e maior tolerância aos herbicidas em comparação ao acesso PAVRL e PAVML.

5. Conclusões

O herbicida imazetapir resultou em porcentagem de controle de aproximadamente 95% dos acessos PAVML e PAVRL, e de aproximadamente 75% para os acessos PAVRE e PAVME. O uso dos herbicidas glifosato e cletodim não resultaram em controle excelente para os acessos PAVRE e PAVME. O ângulo de contato da gota de água foi maior para os acessos PAVME e PAVRE. Portanto, a aplicação sequencial do herbicida imazetapir foi eficiente para o controle das plantas dos acessos de *Paspalum virgatum* L. a partir da dose de 848 g ha⁻¹ i.a.

6. Referências

- Correia, NM., Durigan, JC., Leite, GJ. Seletividade da soja transgênica tolerante ao glyphosate e eficácia de controle de *Commelina benghalensis* com herbicidas aplicados isolados e em misturas. **Bragantia**, v. 67, n. 3, p. 663-671, 2008.
- Correia, NM., Leite, GJ., Garcia, LD. Resposta de diferentes populações de *Digitaria insularis* ao herbicida glyphosate. **Planta daninha**, v. 28, n. 4, p. 769-776, 2010.
- Cunha JPAR, Alves GS., Marques RS. Tensão superficial, potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica de caldas de produtos fitossanitários e adjuvantes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 2, p. 261-270, 2017.
- Dalazen, G., Pisoni, A., Bredemeier, C., Avila, LA., Merotto Jr, A. Climate Change Scenarios Increase the Growth and Resistance of Barnyardgrass to Imazethapyr. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 24, n. 6, p. 1469-1478, 2020.
- Dalazen, G., Pisoni, A., Rafaeli, RS., Merotto Jr, A. Degradation enhancement as the mechanism of resistance to imazethapyr in barnyardgrass. **Planta Daninha**, v. 36, 2018.
- Duke, S. O. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and-susceptible crops and weeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5835-5841, 2011.

Fernando, N., Manalil, S., Florentine, SK., Chauhan, BS., Seneweera, S. Glyphosate resistance of C3 and C4 weeds under rising atmospheric CO₂. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 910, 2016.

González-Ibáñez, J. Glyphosate for weed control in Puerto Rican pastures. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 68, n. 3, p. 289-296, 1984.

Goulart, ICGR., Nunes, AL., Kupas, V., Merotto Junior, A. Interações entre herbicidas e protetores para o controle de capim-annoni em pastagem natural. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, 2012.

Jordan, DL., Vidrine, PR., Griffin, JL., Reynolds, DB. Influence of adjuvants on efficacy of clethodim. **Weed Technology**, p. 738-743, 1996.

King, MG., Radosevich, SR. Tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) leaf surface characteristics and absorption of triclopyr. **Weed Science**, p. 599-604, 1979.

Knezevic, SZ.; Streibig, JC.; Ritz, C. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. **Weed Technology**, v. 21, n. 3, p. 840-848, 2007.

Kruse, ND.; Trezzi, MM.; Vidal, RA. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.

Kumar, V., Jha, P., Reichard, N. Occurrence and characterization of kochia (*Kochia scoparia*) accessions with resistance to glyphosate in Montana. **Weed Technology**, v. 28, n. 1, p. 122-130, 2014.

Lorraine-Colwill, DF., Powles, SB., Hawkes, TR., Hollinshead, P., Warner, SAJ., Preston, C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 74, n. 2, p. 62-72, 2002.

Loux, MM., Liebl, RA., Slife, FW. Availability and persistence of imazaquin, imazethapyr, and clomazone in soil. **Weed Science**, p. 259-267, 1989.

Maciel, CDG., Hama, JT., Souza, JI. Desenvolvimento inicial de gramado semeado com *Paspalum notatum* Flüggé. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 547-549, 2010.

Maciel, JR., Oliveira, RC., Alves, M. *Paspalum* L.(Poaceae: Panicoideae: Paniceae) in Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1145-1161, 2009.

Marchioretto, LDR., Dal Magro, T. Weed control land crops electivity of post-emergence herbicides in common beans. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, p.1-6, 2017.

Marcón, F., Martínez, EJ., Rodríguez, GR., Zilli, AL., Brugnoli, EA., Acuña, CA. Genetic distance and the relationship with heterosis and reproductive behavior in tetraploid bahiagrass hybrids. **Molecular Breeding**, v. 39, n. 6, p. 1-13, 2019.

Mello, JP., Souza, RC., Tironi, SP. Controle químico em pós-emergência de capim-gengibre (*Paspalum maritimum* Trin.). **Revista Ciência Agrícola**, v. 14, n. 1, p. 67-71, 2016.

Mendes, RR., Takano, HK., Biffe, DF., Constantin, J., Oliveira Junior, RSD. interval between sequential herbicide treatments for sourgrass management. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 579-590, 2020.

Mueller, TC., Massey, JH., Hayes, RM., Main, CL., Stewart, CN. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 680-684, 2003.

Neve, P., Powles, S. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 6, p. 1154-1166, 2005.

Oliveira, MFD., Colonna, I., Prates, HT., Mantovani, EC., Gomide, RL., Oliveira Júnior, RSD. Sorção do herbicida imazaquin em Latossolo sob plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 787-793, 2004.

Oliveira, RC., Valls, JFM. Taxonomia de *Paspalum* L., grupo Linearia (Gramineae-Paniceae) do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, n. 4, p. 371-389, 2002.

Passini, T.; Kranz, WM. Eficácia de herbicidas no controle de amarelinho (*Tecoma stans*) em pastagem. **Planta Daninha**, v. 15, n. 2, p. 190-197, 1997.

Pertile, M., Antunes, JEL., Araujo, FF., Mendes, LW., Van Den Brink, PJ., Araujo, ASF. Responses of soil microbial biomass and enzyme activity to herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

R Core Team (2019). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Refatti, JP., Avila, LA., Camargo, ER., Ziska, LH., Oliveira, C., Salas-Perez, R., Roma-Burgos, N. High [CO₂] and temperature increase resistance to cyhalofop-butyl in multiple-resistant *Echinochloa colona*. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 529, 2019.

Reyes-Cabrera, J., Erickson, JE., Leon, RG., Quadros, DG., Silveira, ML., Sollenberger, LE. Bahiagrass pasture and elephantgrass bioenergy cropping systems differ in root traits. **Agronomy Journal**, v. 112, n. 6, p. 4810-4821, 2020.

Ruchel, Q., Vargas, L., Agostinetto, D., Fernando, JA., Lüdtke, R., Bobrowski, V. L. Caracterização morfoanatômica, contagem cromossômica e viabilidade polínica de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 33, n. 3, p. 567-578, 2015.

Santos, JI., Amaral, CL., Alves, PLC., Gasparino, EC. Can light intensity influence the tolerance of *Synedrellopsis grisebachii* to glyphosate?. **Weed Biology and Management**, v. 16, n. 1, p. 3-15, 2016.

Santos, MV., Ferreira, FA., Freitas, FCL., Tuffi Santos, LD., Viana, JM., Rocha, DCC., Fialho, CMT.. Controle de *Brachiaria brizantha*, com uso do glyphosate, na formação de pastagem de Tifton 85 (*Cynodon* spp.). **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 149-155, 2007.

Seefeldt, SS., Jensen, JE., Fuerst, EP. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed technology**, p. 218-227, 1995.

Silva, PCL., Yamashita, OM., Silva, IV., Rocha, AM., Brito, BZ., Andrade Royo, V., Andrea, AABR. Qualitative characterization of secondary metabolites of *Paspalum virgatum* weed under different water conditions. **Australian Journal of Crop Science**. 14(10):1563-1567 (2020).

Sistachs, CM., Fernandez, L., León, JJ. Susceptibilidad de la semilla de caguazo (*Paspalum virgatum* L.) a diferentes herbicidas. **Revista Cubana de Ciências Agrícolas**, v.16, p.113-117, 1982.

Stougaard, RN.; Shea, PJ.; Martin, AR. Effect of soil type and pH on adsorption, mobility, and efficacy of imazaquin and imazethapyr. **Weed Science**, p. 67-73, 1990.

Takeshita, V., Mendes, KF., Inoue, MH., Guimarães, ACD. Eficácia de atrazine sobre populações de *Paspalum virgatum* L. e seletividade em duas variedades de pastagem. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 3, p. 594-1-12), 2018.

Tang X., Dong J., Li X. A comparison of spreading behaviors of Silwet L-77 on dry and wet lotus leaves. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 325, p. 223–227, 2008.

Villarreal, M., Vargas, W. Evaluacion de dos herbicidas y dos formas de aplicacion para el control de zacaton (*paspalum virgatum*) en Potrero. **Agronomía Costarricense** (Costa Rica).(Jul-Dic, v. 13, n. 2, p. 183-188, 1989.

Yu, Q., Collavo, A., Zheng, MQ., Owen, M., Sattin, M., Powles, SB. Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. **Plant physiology**, v. 145, n. 2, p. 547-558, 2007.

Zelaya, IA., Owen, MDK., Vangessel, MJ. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 1, p. 58-70, 2004.

Capítulo 5- Considerações finais

Correlacionando todas as variáveis estudadas, este estudo demonstra as diferenças entre os acessos, ou seja, mesmo sendo pertencente a espécie *Paspalum virgatum* L. são plantas com características ímpares. As características visuais observadas induzem a crer em diferentes processos adaptativos que ocasionaram diferenças fenotípicas.

Essas características fenotípicas interferem na resposta das plantas a aplicação dos herbicidas imazetapir, cletodim e glifosato. O manejo químico dessa espécie é diferenciado das demais plantas daninhas, uma vez que, é clara a necessidade da realização de aplicação sequencial para que se atinja um nível satisfatório de controle, principalmente para as populações PAVRE e PAVME, que são populações com menor tamanho de lâmina foliar e ângulo de inserção da folha.

O estudo genético permitiu entender melhor as plantas de cada acesso, mesmo que o nível de ploidia tenha sido o mesmo para os acessos, a proporção de cada família de DNA repetitivo para cada acesso pode fornecer mais informações sobre as diferenças fenotípicas, vale ressaltar a necessidade de mais estudos sobre a planta, especialmente a nível genético, metabolômico e proteômico. Infelizmente, nesse estudo não foi possível concluir se as diferenças observadas foram processos evolutivos derivados da distribuição geográfica por exemplo, visto que, a planta tem distribuição em quase todos os continentes, mostrando a capacidade adaptativa das espécies, pois as plantas apresentam uma plasticidade capaz de suportar uma grande variação ambiental.

Ademais, as informações obtidas sobre a planta são importantes para melhor compreensão sobre o comportamento e a resposta da planta a diferentes herbicidas, sendo essas informações ferramenta úteis para elaboração de estratégia de manejo eficientes da espécie, principalmente para as condições climáticas do Brasil.

Anexo

**SECRETARIA DE INFRAESTRUTURA E MEIO AMBIENTE
INSTITUTO DE BOTÂNICA**

Av. Miguel Stéfano, 3687 - Água Funda - 04301-012 - SP

C.N.P.J.: 56.089.790/0004-20 – www.lbot.sp.gov.br

Fone: (0xx11) 5073-6039 - PABX: (0xx11) 5073 6300

Identificação de amostra vegetal**Requerente:** Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, Dr.Total de amostras recebidas: 6 (seis) espécimes [2 espécimes em duplicata] da família POACEAE para identificação em nível específico.

Número total de espécies confirmadas após análise: 2 (duas) espécies, classificadas nos seguintes níveis taxonômicos:

SUBFAMÍLIA PANICOIDEAE A. BRAUN**TRIBO PASPALAEAE J. PRESL****(1) *Paspalum plicatulum* Michx.**

J.V.F. Martins s.n. (col. 27.01.2019)

J.V.F. Martins s.n. (col. 27.01.2019)

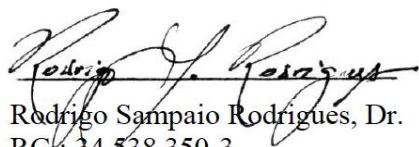
(2) *Paspalum virgatum* L.

A. Brufato s.n. (col. 27.01.2019)

A. Brufato s.n. (col. 19.07.2019)

A. Brufato s.n. (col. 19.07.2019)

A. Brufato s.n. (col. 09.08.2019)

Data de identificação: 14/10/2019.**Nome e assinatura do especialista responsável pela identificação:**
Rodrigo Sampaio Rodrigues, Dr.
RG.: 34.538.350-3

São Paulo, 14 outubro de 2019.