

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *ECHINOCHLOA* SPP. EN ARROZALES DE EXTREMADURA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Salguero J.¹, Romano Y.², Álvarez-Barrientos A.³, Torralbo P.³,
Alarcón M.V.², Amaro-Blanco I.², Osuna M.D.^{2*}

¹*Departamento de Fisiología Vegetal, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avda. de Adolfo Suárez s/n, 06007 Badajoz, España.*

²*Departamento de Hortofruticultura, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Ctra. AV km 372, 06187 Guadajira, España.*

³*Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias, Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas s/n, 06071 Badajoz, España.*

**mariadolores.osuna@gobex.es*

Resumen: El género *Echinochloa* incluye las especies de malas hierbas del arroz más importantes a nivel mundial. La complejidad taxonómica de este género, que comprende 40-50 especies, ha sido tema principal en diferentes trabajos de investigación. La confusión taxonómica es muy frecuente en el género, por lo que se han utilizado diferentes claves taxonómicas y varios enfoques moleculares para identificar las diferentes especies. Por otra parte, se ha demostrado que diversas especies de *Echinochloa* muestran desigual sensibilidad a diferentes herbicidas. Por lo tanto, la identificación temprana del género *Echinochloa* proporciona una herramienta útil a la hora de aplicar los herbicidas más eficaces a las dosis más adecuadas. En este trabajo se muestra que los géneros de *Echinochloa* tienen diferente contenido en ADN y que la citometría de flujo es capaz de discriminar entre las especies más comunes de *Echinochloa* en Extremadura.

Palabras clave: Taxonómica, técnicas moleculares, ADN.

Summary: Identification of species of *Echinochloa* spp. in Extremadura rice paddies by flow cytometry. The genus *Echinochloa* includes the most important weeds in rice worldwide. Taxonomic complexity of this genus, comprising 40-50 species, has been a major topic in several research projects. The taxonomic confusion is common in the genus, so different taxonomic keys and several molecular approaches have been used to identify different species. Moreover, it has been shown

that various species of *Echinochloa* show unequal sensitivity to different herbicides. Therefore, early identification of *Echinochloa* species provides a useful tool in implementing the most effective herbicide and the most appropriate dose. This paper shows that *Echinochloa* species have different DNA content and that flow cytometry is able to discriminate among the most common species of *Echinochloa* in Extremadura.

Keywords: Taxonomy, molecular techniques, DNA.

INTRODUCCIÓN

El arroz es el cereal grano más ampliamente consumido por una gran parte de la población humana. El método tradicional para el cultivo es la inundación durante, o después, del asentamiento de la plántula, práctica agronómica que requiere un alto esfuerzo en el control de malas hierbas y plagas. El cultivo de arroz se ha incrementado en Extremadura durante los últimos 10 años y actualmente cerca de 30.000 ha son ocupadas por arroz.

En el género de *Echinochloa* se incluyen las especies de malas hierbas más importantes en arroz en todo el mundo (Danquah et al., 2002). Además, la rápida germinación y crecimiento unido a la abundante producción de semillas aseguran su éxito (Barrett, 1983). Estudios morfológicos y genéticos revelan la complejidad taxonómica de este género (López-Martínez et al., 1999, Ruiz-Santaella et al., 2006). Hay algunas discrepancias en cuanto al número de especies que constituyen *Echinochloa*. El género comprende entre 20 y 60 especies, tanto las especies nativas como las cultivadas, y están ampliamente extendidas en las regiones tropicales y templadas. Las especies de *Echinochloa* muestran diferente sensibilidad a varios herbicidas utilizados para su control (Vidotto et al., 2007), incluso dentro de la misma especie (Osuna et al., 2011). Además, se ha descrito el desarrollo de resistencias a herbicidas comúnmente aplicados para el control de *Echinochloa* en arroz (Fisher et al., 2000). La alta variabilidad de los caracteres morfológicos y la respuesta a los herbicidas han sido analizadas en diferentes estudios incluyendo morfológicos, enzimáticos y, recientemente, moleculares, con el fin de conseguir una clasificación taxonómica precisa. En las especies de *Echinochloa*, aunque muestran alto grado de autogamia, la tasa de polinización cruzada es suficiente para asegurar el intercambio de genes. En la Península Ibérica la clasificación taxonómica fue establecida por Carretero (1981), que propuso 5 taxones: *E. crus-galli* (L) Beauv.; *E. colonum* (L) Link.; *E. hispidula* (Retz) Nees ex Royle; *E. oryzoides* (Ard) Fritsch.; y *E. oryzicola* (Vasing.) Vasing.

En resumen, los diferentes géneros de *Echinochloa* muestran diferente sensibilidad a varios herbicidas pero la correcta identificación del género en los estadios tempranos del desarrollo de la planta es muy difícil o imposible. Sin embargo, los mejores resultados se han obtenido cuando el herbicida se aplica en los estadios tempranos de desarrollo. En consecuencia, la identificación temprana permitiría una aplicación más eficaz del herbicida. La citometría de flujo es un método comúnmente utilizado para estimar el tamaño del genoma, en unidades relativas o absolutas, que se han aplicado con éxito a los estudios taxonómicos de un gran número de especies de plantas (Dolezel & Bartos, 2005). Desde la introducción de esta técnica para estudios en plantas, la estimación de niveles de ploidía y la determinación del tamaño del genoma nuclear que han sido dos de las aplicaciones más frecuentes (Bennett & Leitch, 2005). El método ha sido una buena alternativa a los métodos tradicionales, debido principalmente a su rapidez y viabilidad. (Dolezel & Bartos, 2005) El objetivo de este trabajo fue clasificar las poblaciones más importantes de *Echinochloa* en Extremadura de acuerdo con la taxonomía de Carretero (1981) y determinar el tamaño de su genoma para optimizar un método de identificación rápida del género a partir del tamaño de su genoma en las fases precoces del desarrollo de la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización de las poblaciones de *Echinochloa*

Semillas de 48 accesiones pertenecientes al género *Echinochloa* fueron recolectadas en campos de arroz de Extremadura. Las coordenadas de cada punto de muestreo se tomaron con un dispositivo GPS.

Clasificación morfológica de las accesiones

La identificación de los taxones se llevó a cabo principalmente de acuerdo a la taxonomía de Carretero (1981), pero también se han incluido nuevas características que no se habían usado antes. Se evaluaron similitudes morfológicas entre accesiones usando el programa NTSYS-pc 2.02 (Exeter Software, 47 Route 25A, Suite 2, Setauket, NY 11733-2870 USA).

Tamaño del genoma

Para la determinación del tamaño del genoma se seleccionaron aproximadamente 2 cm cuadrados de hoja fresca de plántulas con un tamaño de 3-4 hojas. La estimación de la citometría de flujo del contenido de ADN nuclear se realizó de la siguiente manera: El tejido de *Pisum sativum* y *Echinochloa* se prepararon de manera conjunta. *Pisum sativum* se eligió como estándar interno debido a su similitud en contenido de

ADN nuclear (Doležel et al., 2005) respecto de *Echinochloa*. La hoja fue troceada con un bisturí durante 30-60 s en un vidrio de reloj con aproximadamente 20 ml de tampón de extracción (Tris-HCL 0,2M, MgCl₂-6H₂O 4mM, EDTA-Na₂-2H₂O 2mM, NaCl 86mM, Metabissulfite 10mM, 1% PVP 10, 1% (v/v) Tritón X-100 pH 7,5). El extracto resultante se filtró (filtro de 30 µm de poro) y centrifugó a 1500 rpm durante 5 s. A continuación, se le añadió 1 ml de tampón de tinción (50 µL de RNAsa 20mg/mL, 50 µL de Propidium Iodine 0,05% y 900 µL de PBS). Las muestras se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 30 minutos. El análisis de la citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FC500 (BeckmanCoulter, Hialeah, FL, EE.UU.) sobre, al menos, 10000 núcleos por muestra. El contenido de ADN nuclear de *Echinochloa* se estimó utilizando como referencia el contenido de *Pisum sativum* (Doležel et al., 2005).

Análisis estadístico del tamaño del genoma

La determinación del tamaño del genoma se realizó en plantas que previamente habían sido identificadas como pertenecientes al género de *Echinochloa*, provenientes de distintas accesiones. Los datos representan la desviación media estándar de al menos 10 plantas por especie de *Echinochloa*. La comparación entre medias se realizó mediante ANOVA seguida de un test de Tukey P<0,05, usando SPSS v15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización morfológica de *Echinochloa* spp. en Extremadura y los principales caracteres utilizados en ella se muestran en la Tabla 1. Los caracteres de la tabla son de estadios tardíos, no pudiéndose establecer caracteres diferenciadores en estadios tempranos.

En cuanto a los estudios de citometría de flujo, los resultados presentados en la Tabla 2 muestran claramente diferencias significativas en los contenidos de ADN entre las varias especies. Se observa que dos especies, *E. oryzicola* y *E. oryzoides*, tienen aproximadamente dos tercios de la cantidad de las otras, *E. crus-galli* y *E. hispidula*. Los resultados encontrados en la bibliografía sugieren que las especies de *Echinochloa* se pueden separar en dos grupos que incluyen las especies hexaploides y tetraploides. Por lo tanto, basándonos en nuestra estimación del contenido de ADN, *E. hispidula* y *E. crus-galli* serían especies hexaploides mientras que *E. oryzicola* y *E. oryzoides* serían tetraploides. Aunque *E. oryzicola* y *E. oryzoides* pueden ser consideradas tetraploides, se han observado pequeñas diferencias en el tamaño de su genoma. El contenido de ADN de *E. oryzoides* (2,67 pg) fue mayor que el de *E. oryzicola* (2,46 pg). De la misma forma, *E. hispidula* (3,74 pg) tuvo un contenido en ADN ligeramente superior al de *E. crus-galli* (3,49).

Tabla 1. Caracteres morfológicos utilizados en la caracterización taxonómica de las especies de *Echinochloa* en Extremadura.

Características	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. hispidula</i>	<i>E. oryzicola</i>	<i>E. oryzoides</i>
Longitud espiga	2,8-3,3 mm	3,3-3,7 mm	4-4,5 mm	4,3-4,7 mm
Aristas	Hasta 6 mm	Hasta 3 mm	Hasta 6 mm	Hasta 10 mm
Color basal del tallo	Rojo	Rojo	Verde o verde con tonalidad rojiza	Verde o rojo
Color collar	Rojo	Rojo o verde	Verde	Verde
Máxima altura	≥ 200 cm	150-180 cm	100-150 cm	120-150 cm
Situación tallo/hojas	Postrado	Vertical o semivertical	Vertical o semivertical	Semivertical o semipostrado
Pubescencia vaina	Ausencia	Ausencia	Ausencia o presencia	Ausencia
Panícula	Vertical o semivertical	Semivertical o semipendular	Semivertical o semipendular	Semipendular o pendular
Ramas panícula	Abiertas o semiabiertas	Abiertas o semiabiertas	Semiabiertas	Semicerradas
Limbo hoja	Abierto	Curvado	Semicurvado	Curvado
Floración	La más temprana (55-65 días*)	Temprana (75-95 días*)	La más tardía (85-105 días*)	Tardía (>140*)
Adquisición tono rojo tallo	20 días*	30-45 días*	70-80 días*	70-75 días*

*Desde la germinación de la semilla.

Tabla 2. Tamaño del genoma en las diferentes especies de *Echinochloa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas especies en el análisis por ANOVA y test de Tukey $P < 0,05$.

Especie	Tamaño del genoma (pg DNA)
<i>E. hispidula</i>	3,74±0,08 a
<i>E. crus-galli</i>	3,49±0,16 b
<i>E. oryzoides</i>	2,67±0,13 c
<i>E. oryzicola</i>	2,46±0,04 d

Enfoques citogenéticos y moleculares se han usado en estudios taxonómicos en el género *Echinochloa*. Los datos citogenéticos han proporcionado información sobre el número de cromosoma y la ploidía de las especies chinas de *Echinochloa* (Juihuan & Tingbi, 1993).

Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los encontrados en la bibliografía. Estudios citológicos de las especies chinas de *Echinochloa* han mostrado que *E. oryzoides* y *E. crus-galli* son hexaploides, presentando 54 cromosomas ($2n=6x=54$), mientras que *E. hispidula* es tetrahaploide con 36 cromosomas ($2n=4x=36$) (Juihuan & Tingbi, 1993) siendo en ambos casos $x=9$. Por el contrario, nuestros resultados sugieren que *E. hispidula* debería ser hexaploide y *E. oryzoides* tetraploide.

CONCLUSIONES

En este trabajo ha quedado demostrado la dificultad de usar caracteres morfológicos para distinguir las especies de *Echinochloa* spp. encontradas en Extremadura. Técnicas a nivel de ADN o, como en el trabajo presentado aquí, a nivel de citometría de flujo son claves para una correcta identificación temprana de las especies.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto AGL2011-27714 (MINECO) y el Grupo de Investigación GR10130 del Gobierno de Extremadura.

BIBLIOGRAFÍA

- BARRETT SCH (1983) Crop mimicry in weeds. *Economic Botany* 37, 255-282.
- BENNET MD & LEITCH IJ (2005) Plant genome size research: a field in focus. *Annual of Botany* 95, 1-6.
- CARRETERO JL (1981) El género *Echinochloa* Beauv, en el suroeste de Europa. *Anales Jardín Botánico Madrid* 38(1), 91-108.
- DANQUAH EY, JOHNSON DE, RICHES C, ARNOLD GM & KARP A (2002) Genetic diversity in *Echinochloa* spp. collected from different geographic origins and within rice fields in Côte d'Ivoire. *Weed Research* 42, 394-405.
- DOLEZEL J, SGOBATI S & LUCRETTI S (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85, 625-631
- DOLEZEL J & BARTOS J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annual of Botany* 95, 99-110.
- FISHER AJ, ATEH CM, BAYER DE & HILL JE (2000) Herbicide-resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phyllopogon* in California *Oryza sativa* fields. *Weed Science* 48, 225-230.
- JUIHUAN F & TINGBI Z (1993) Cytological study on Chinese species in the genus *Echinochloa*. *Journal of Wuhan Botanical Research* 11, 293-299.

- LOPEZ-MARTINEZ N, PUJADAS A, FINCH RP & DE PRADO R (1999) Molecular markers indicate intraspecific variation in the control of *Echinochloa* spp. with quinclorac. *Weed Science* 47, 310-315.
- OSUNA MD, OKADA M, AHMAD R, FISCHER AJ & JASIENIUK M (2011) Genetic diversity and spread of thiobencarb resistant early watergrass (*Echinochloa oryzoides*) in California. *Weed Science* 59(2), 195-201.
- RUIZ-SANTAELLA JP, BASTIDA F, FRANCO AR & DE PRADO R (2006) Morphological and molecular characterization of different *Echinochloa* spp. and *Oryza sativa* populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1166-1172.
- VIDOTTO F, TESIO F, TABACCHI M & FERRERO A (2007) Herbicide sensitivity of *Echinochloa* spp. accessions in Italian rice fields. *Crop Protection* 26(3), 285-293.