# IDENTIFICACION DE ESPECIES DE ECHINOCHLOA SPP. EN ARROZALES DE EXTREMADURA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO

J . Salguero, Y. Romano, A. Alvarez-Barrientos, P. Torralbo, M.V. Alarcón, I. Amaro-Blanco y M.D.Osuna

*Universidad de Extremadura; CICYTEX*

XV Congreso Soc. Española de Malherbología
Sevilla, 19 al 23 de octubre de 2015

- **PROYECTO PLAN REGIONAL INVESTIGACIÓN GOBIERNO DE EXTREMADURA (2011-2013):**

AYUDAS PARA LA REALIZACIÓN DE PROYECTOS DE PROMOCIÓN GENERAL DEL CONOCIMIENTO Y DE I+D ORIENTADA Y APLICADA EN LAS ÁREAS CIENTÍFICO-TECNOLÓGICAS Y HUMANÍSTICAS

(Decreto 114/2010 , de 14 de mayo, Título III, Capítulo III )

EXPEDIENTE: IB10079

INVESTIGADOR RESPONSABLE : María Dolores Osuna Ruiz

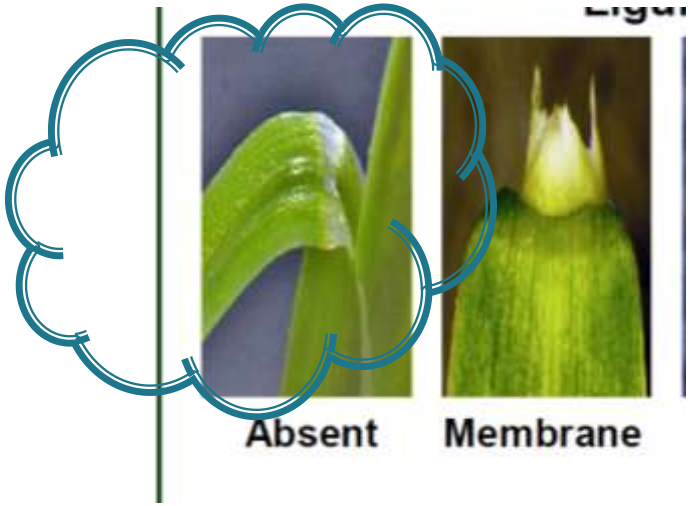
TITULO DEL PROYECTO : Control de leptochloa spp. y echinochloa spp. en arrozales en Extremadura

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- **Gramíneas anuales** que se reproducen principalmente por **semillas**
- **Enorme capacidad de propagación**
- **Germinación escalonada**
- Semillas **capacidad germinativa periodo 7 a 11 años,** la mayoría germinan en los 3 o 4 primeros años
- Al principio **capacidad de crecimiento** similar a la del arroz, al que **adelanta rápidamente a principios del ahijamiento**

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- Mejor manera de distinguirlas del arroz y de otras gramíneas: **AUSENCIA DE LIGULA**



# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- Cuando todavía no existe la posibilidad de comprobar si las hojas son liguladas o no, la mejor opción para identificar correctamente cada especie **consiste en arrancar la planta y observar la semilla**

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- En la actualidad **no existe un acuerdo completo** sobre las especies que constituyen el género *Echinochloa.* Puede incluir alrededor de **50 especies**

- La **taxonomía** de este género ha sido siempre un punto de **controversia y contradicción:**
  - **Alto nivel de autogamia, pero existe cruzamiento suficiente para asegurar el intercambio de genes entre poblaciones**

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- Debido a la alta variabilidad en los caracteres morfológicos presentados se han propuesto diferentes clasificaciones taxonómicas por varios autores.

**GOULD *ET AL.* EN 1972**

**CLAYTON EN 1980**

**CARRETERO EN 1981**

**PIGNATTI EN1982**

**MICHAEL EN 1983**

**DEVESA EN 1987**

**COSTEA Y TARDIF EN 2002**

- En el área mediterránea la clasificación de *Echinochloa* spp. se ha hecho principalmente siguiendo las taxonomías de:

**CARRETERO EN 1981**

*-E. cruss-galli*
*-E. colonum*
*-E. hispidula*
*-E. oryzoides*
*-E. oryzicola*

**PIGNATTI EN1982**

*-E. cruss-galli*
*-E. phyllopogon*
*-E. cruss-pavonis*
*-E. hostii*
*-E. erecta*

- Por ello, en muchos casos existe un alto grado de incertidumbre al usar una única clave taxonómica para distinguir especies del género *Echinochloa*. Ejemplos:

  - Morphological analysis of the main *Echinochloa* species in Italian rice fields *(Proceeding Weed Research Society 1994)*
    - *En este estudio se concluye que solo el 44% de las plantas de Echinochloa encontradas en arrozales en Italia pueden clasificarse con la clave de Pignatti.*

  - Morphological and physiological variation among species of the genus Echinochloa in Northen Greece *(Weeed Science 2008, 56: 416-423)*
    - *En este estudio se encuentra que poblaciones de Echinchloa de arrozales de Italia se clasifican en 3 especies según Pignatti (E. cruss-galli, E. erecta, E. phyllopogon) y en 4 según Carretero (E. cruss-galli, E. hispidula, E. oryzicola, E. oryzoides)*

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- Las diferentes especies de *Echinochloa* presentan diferente susceptibilidad a los herbicidas empleados en arroz. Ejemplos:

  - Molecular markers indicate intraspecific variation in the control of *Echinochloa* spp. with quinclorac *(Weed Science 1999, 47:310-315)*
    - *E. colonum*, *E. oryzoides* y *E. oryzicola* mas susceptibles a quinclorac que E. crus-galli y E. hispidula

  - Morphological and physiological variation among species of the genus *Echinochloa* in Northen Greece *(Weed Science 2008, 56: 416-423)*
    - *En este estudio basados en la taxonomía de Pignatti distinguen 3 especies: E. crus-galli, E. oryzoides y E. phyllopogon*
    - *E. oryzoides y E. phyllopogon menos susceptibles a propanil, cihalofop, clefoxidim y bispiribac comparado con E. cruss-galli*

  - Herbicide sensitivity of Echinochloa spp. accesions in Italian rice fields *(Crop Protection 2007, 26: 285-293)*
    - *En este estudio basados en la taxonomía de Pignatti distinguen 3 especies: E. crus-galli, E. erecta y E. phyllopogon*
    - *E. cruss-galli más susceptible a los herbicidas utilizados en el estudio: azimsulfuron, bensulfuron, cihalofop, molinato, propanil y quinclorac)*

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- En estado de plántula es imposible diferenciar las diferentes especies en campo

*E. hispidula* *E. oryzoides* *E. oryzicola*

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

Se ha observado que existe **una diferente susceptibilidad** entre las diferentes especies del género *Echinochloa* a los distintos **herbicidas.**

En las diferentes regiones se encuentran **poblaciones** de *Echinochloa* que **escapan del control de los herbicidas** en los cultivos de arroz.

No se conoce el motivo de este hecho, si es por la existencia de **poblaciones resistentes o por una mala identificación de la especies** de *Echinochloa*.

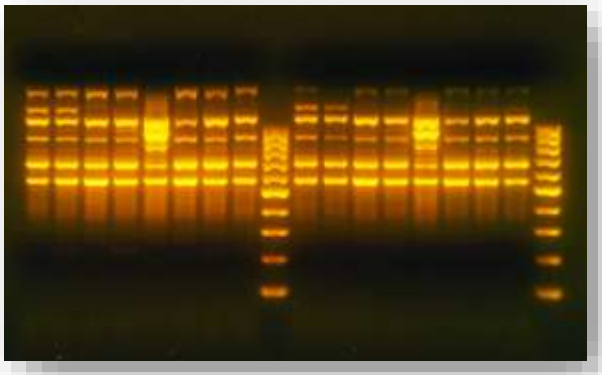
Esto establece la **necesidad** de alcanzar métodos eficaces para caracterizar este género y encontrar unas **claves taxonómicas adecuadas.**

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

El **objetivo** es poder diferenciar los distintos **grupos de *Echinochloa* spp.** que se encuentran los campos de arroz de Extremadura.

Identificar las **principales características morfológicas** que permitan distinguir las *Echinochloa* spp. recolectadas en Extremadura.

Empleo de **técnicas moleculares** para la identificación y caracterización de poblaciones de *Echinochloa* en Extremadura en estadios tempranos



# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA (MORFOLÓGICA)

*Fichas técnicas de sanidad vegetal. Ficha nº 08....?*

## Serreig
*Echinochloa*

Foto 1. *E.crus-galli*

Foto 2. *E. hispidula*

Foto 3. Espiguillas de las distintas especies de *Echinochloa*

Foto 4. *E. oryzicola*

Foto 5. *E. oryzoides*

arroz

Dirección General de Agricultura y Ganadería

GOBIERNO DE EXTREMADURA
Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía

ADVENTICIAS CEREALES DE PRIMAVERA 07?

## *Echinochloa* spp.

**Nombres comunes.** serreig, serré, cola, mijo.

**Introducción.** La clasificación del género *Echinochloa* presenta una alta problemática. Por esta razón, en Extremadura se han realizado estudios de caracterización a nivel molecular y morfológico por parte de un grupo del Centro de Investigaciones Agrarias del CICYTEX y el Servicio de Sanidad Vegetal (Gobierno de Extremadura). Se han estudiado 240 poblaciones de *Echinochloa* recolectadas en toda la zona arrocera extremeña, obteniéndose las características más determinantes de las distintas especies encontradas en Extremadura.

**Descripción.** Son plantas anuales pertenecientes a la familia de las gramíneas. En Extremadura encontramos cuatro especies de este género, *E. crus-galli*, *E. hispidula*, *E. oryzicola* y *E. oryzoides*. Son plantas sin lígulas, con inflorescencias en forma de panícula, sus espiguillas son elípticas con glumas herbáceas desiguales, la inferior mucho menor que la superior. Poseen una lema herbácea, similar a la gluma superior, aristada o mocha. Las vainas son glabras o peludas.

**Biología.** Las especies del género *Echinochloa* pueden producir hasta 40.000 semillas por planta. Su desarrollo es escalonado y con gran potencial de ahijamiento. Se ha observado que entre las distintas especies de este género existe un alto grado de autogamia, y una tasa de polinización cruzada suficiente para que exista intercambio de genes entre las distintas poblaciones.

**Daños y medidas de control.** Por sus características biológicas, este género está considerado uno de los más perjudiciales que afectan a los cultivos a nivel mundial. Como método de control podemos utilizar la técnica de "falsa siembra" y rotaciones de cultivos, para intervenciones químicas consultar www.mapama.gob.es

| Características | *E. crus-galli* | *E. hispidula* | *E. oryzicola* | *E. oryzoides* |
|---|---|---|---|---|
| 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 | 30 días* | 30-45 días* | 70-80 días* | 70-75 días* |

*Desde la germinación de la semilla.

Ficha técnica elaborada por:
María Encarnación Senero Pérez
José Antonio Palmerín Romero
José María Cuéllar Pecos
María Dolores Osuna Ruiz
Yolanda Romano García
Jorge González Blanco

Información actualizada al 18/10/2013

Más información en:
Servicio de Sanidad Vegetal
Tfno: 924 00 15 13
http://aym.juntaex.es/servicios/fichas_sanidad/
sanidad.vegetal@gobex.es

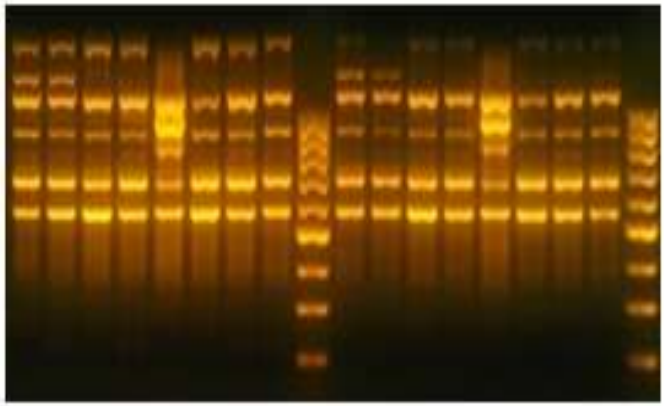
http://aym.juntaex.es/servicios/fichas_sanidad/

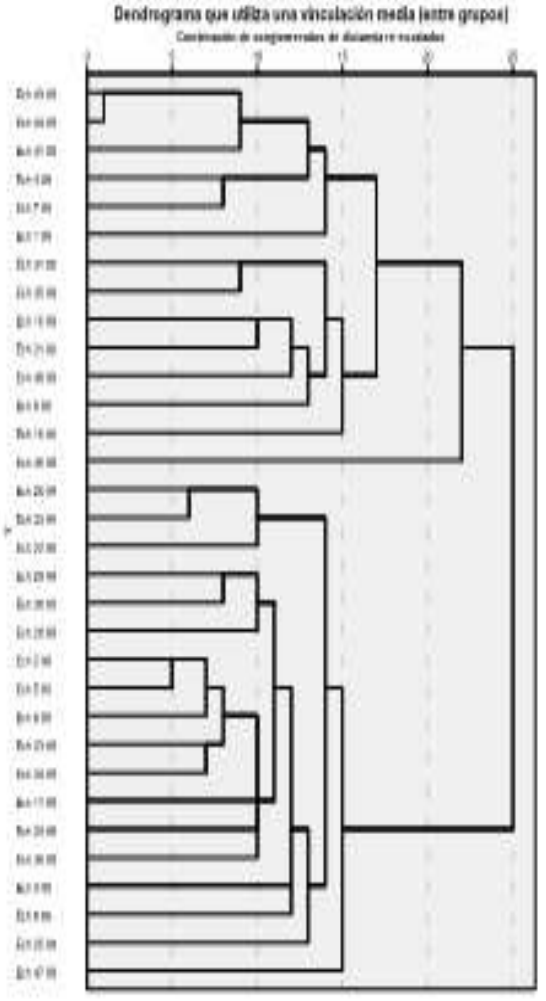
# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA (MORFOLÓGICA)

| Características | E. crus-galli | E. hispidula | E. oryzicola | E. oryzoides |
|---|---|---|---|---|
| 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* |

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA (MOLECULAR)

Hasta ahora hemos conseguido poner a punto **marcadores moleculares inespecíficos (ISSR y PCR-RFLP)** que nos permite distinguir en dos grupos las especies de Echinochloa de forma sencilla y rápida. El grupo 1 estaría formado por E. crus-galli y E. hispidula, y el grupo 2 por E. oryzoides y E. oryzicola. Por otra parte, en casos concretos, se complementan el uso de estos marcadores moleculares con otros marcadores más complejos (**AFLPs**). Con estos marcadores específicos podemos completar esta división y distinguir las cuatro especies por separado.



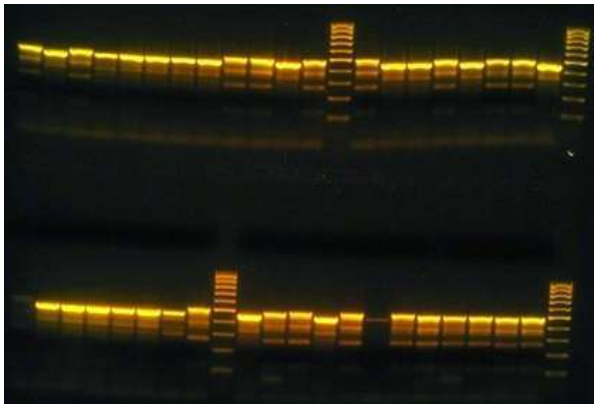


# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA (MOLECULAR)

Técnica molecular: **PCR-RFLP**

Esta técnica molecular se llama **PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los** fragmentos de restricción del producto amplificado mediante PCR), y se ha puesto a punto para su aplicación en las *Echinochloa spp. recolectadas en Extremadura.*

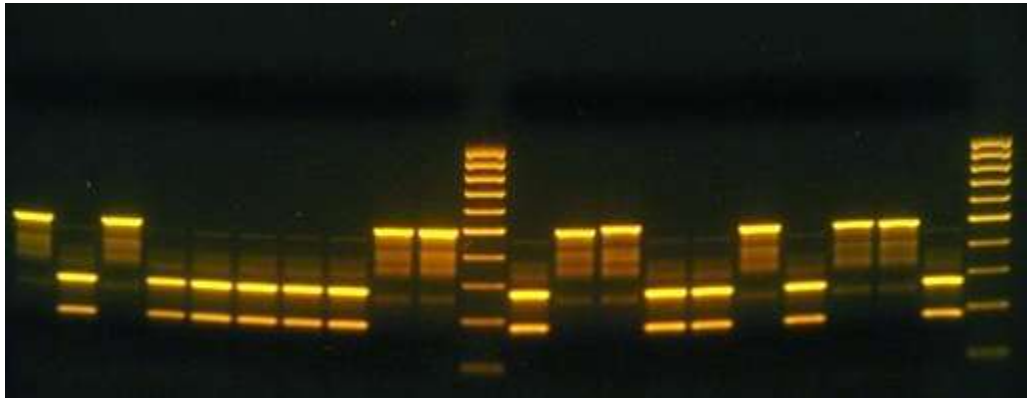
Permite la **identificación de forma precisa y rápida de las especies de *Echinochloa.*** Por ejemplo, se obtienen resultados de unas 20 muestras en unas 24 horas.



# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA (MOLECULAR)

Técnica molecular: **PCR-RFLP**

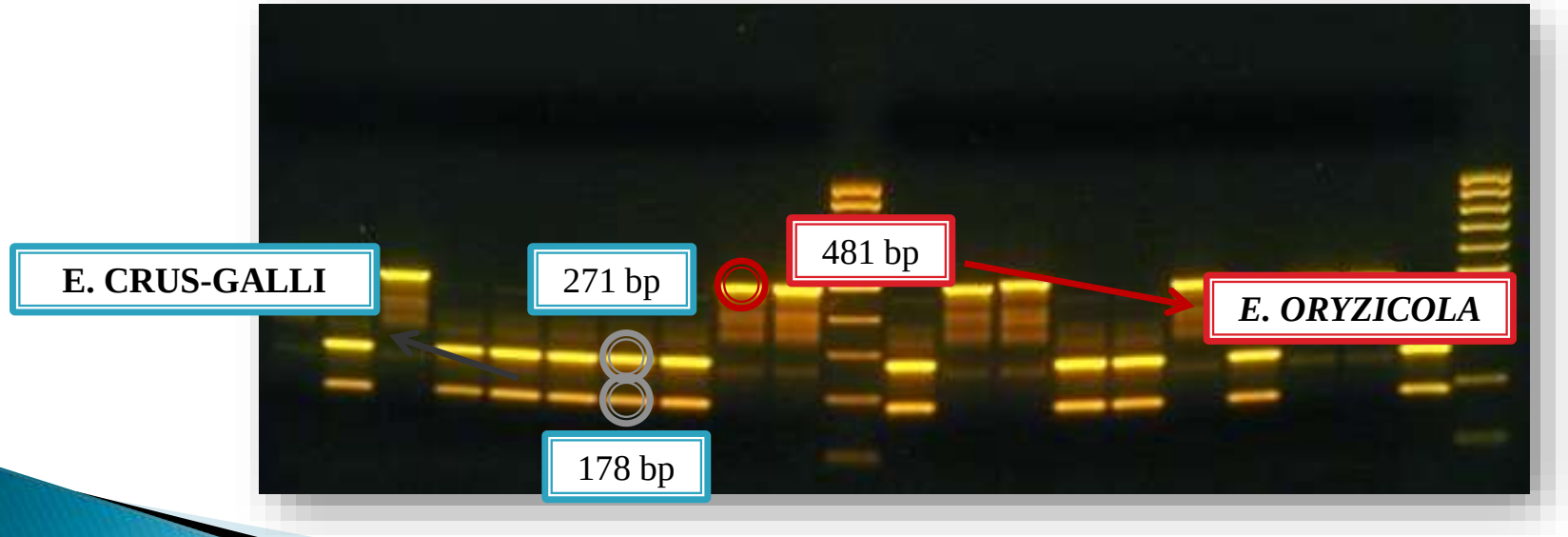
Con este método, los **fragmentos de ADN de las plantas amplificados mediante PCR** (Reacción en Cadena de la Polimerasa) son **cortados con enzimas de restricción específicas.**
Estos cortes generan fragmentos de ADN **con distinto tamaño según el grupo de** *Echinochloa que sea la planta.*



# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA (MOLECULAR)

Técnica molecular: **PCR-RFLP**

Por ejemplo, el grupo formado por **las *E. oryzicola***, después de cortar con la **enzima de restricción E1**, nos dará un tamaño de fragmento de **481 bp**, y el grupo formado por las ***E. crus-galli*** después de cortar con la **enzima de restricción E1**, nos darán dos fragmentos de tamaños **178 bp y 271 bp.**



## USO DE TÉCNICAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

- Método comúnmente utilizado para estimar el tamaño relativo del genoma, en unidades relativas o absolutas
- Desde la introducción de esta técnica para estudios de plantas, la estimación de niveles de poliploidia y la determinación del genoma nuclear han sido dos de las aplicaciones más frecuentes.
- El contenido de ADN nuclear de Echinochloa se estimó utilizando como referencia el contenido de *Pisum sativum*

# IDENTIFICACION ECHINOCHLOA (CITOMETRIA DE FLUJO)

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 (l 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.

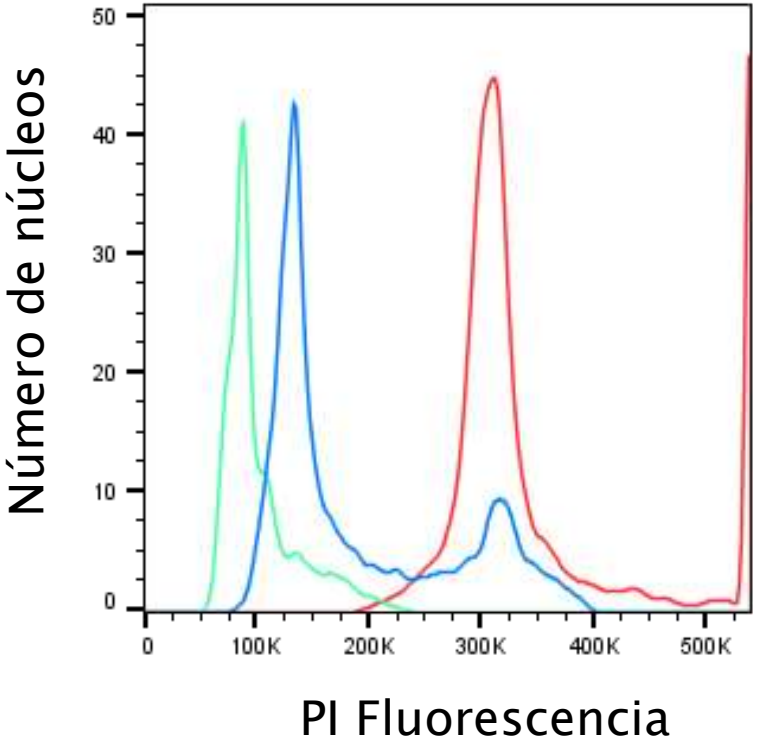
Las muestras se incubaron a 37 ºC en oscuridad durante 30 minutos. El análisis de la citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FC500 (BeckmanCoulter, Hialeah, FL, EE.UU.) sobre, al menos, 10000 núcleos por muestra.

## USO DE TÉCNICAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

| Echinochola specie | DNA (pg) |
|---|---|
| E. hispidula | 3.74±0.08 a |
| E. crus-galli | 3.49±0.16 b |
| E. oryzoides | 2.67±0.13 c |
| E. oryzicola | 2.46±0.04 d |

- Existen diferencias significativas en los contenidos de ADN entre las diferentes especies de Echinochloa.
- E. oryzoides y E. oryzicola tienen aproximadamente 2/3 de la cantidad de ADN que E. cruss-galli y E. hispidula.
- Basándonos en nuestra estimación de ADN, E. hispidula y E. Cruss-galli serian hexaploides, mientras que E. oryzoides y E. oryzicola serían tetraploides.

# USO DE TÉCNICAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

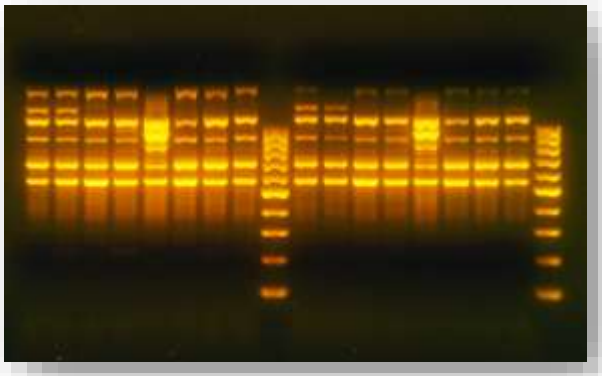


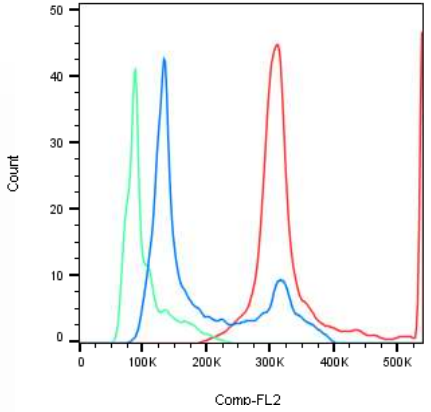

Tamaño del genoma de *Echinochloa hispadula* y de *Echinochloa oryzicola* (como standard se ha utilizado el genoma de *Pisum sativum)*

# CONCLUSIONES: IDENTIFICACION ECHINOCHLOA

- En este trabajo queda demostrada la dificultad de usar caracteres morfológicos para identificación de especies de Echinochloa en estadios tempranos de desarrollo

- *Técnicas utilizando marcadores moleculares, o como la presentada aquí (citometría de flujo) son claves para esa correcta identificación.*





# IDENTIFICACION DE ESPECIES DE ECHINOCHLOA SPP. EN ARROZALES DE EXTREMADURA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO

J . Salguero, Y. Romano, A. Alvarez-Barrientos, P. Torralbo, M.V. Alarcón, I. Amaro-Blanco y M.D.Osuna

*Universidad de Extremadura; CICYTEX*

Gracias por su atención!!!!