

Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.

Yolanda Romano¹, Fátima Mendoza¹, José Antonio Palmerín², José María Quiles³, Ignacio Amaro¹, María Dolores Osuna¹✉

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz)

²Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura), Don Benito (Badajoz)

³Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura), Mérida (Badajoz)

✉ mariadolores.osuna@juntaex.es

Resumen: Los géneros *Echinochloa* y *Leptochloa* son las malas hierbas más problemáticas actualmente para el cultivo del arroz en Extremadura. Para controlarlas adecuadamente es imprescindible una identificación temprana, ya que las diferentes especies de ambos géneros muestran diferentes respuestas frente a un mismo herbicida. Una herramienta útil para discriminar las especies de dichas malas hierbas en estadios tempranos son los marcadores moleculares, que ayuda a planificar antes las estrategias de control adecuadas para el agricultor. En este trabajo se muestran las técnicas moleculares empleadas para diferenciar las especies del género *Echinochloa* más habituales en Extremadura: *E. oryzicola*, *E. oryzoides*, *E. crus-galli*, *E. hispidula* y *E. colona* utilizando la técnica molecular PCR-RFLP. Por otro lado, para diferenciar las especies del género *Leptochloa* (*L. fascicularis* y *L. uninervia*) se han utilizado marcadores tipo AFLP.

Palabras clave: *Echinochloa*, *Leptochloa*, marcador molecular, PCR-RFLP, AFLP.

1. INTRODUCCIÓN

De las malas hierbas presentes en el cultivo del arroz encontramos los géneros *Echinochloa* y *Leptochloa*, ambos pertenecientes a la familia Poaceae, y considerados como las malas hierbas más importantes que reducen el rendimiento del cultivo causando así grandes pérdidas económicas. Respecto al género *Echinochloa* a día de hoy no existe un acuerdo completo sobre las especies que lo constituyen. Debido a la alta variabilidad morfológica existente, para el género *Echinochloa* han sido propuestas diferentes clasificaciones taxonómicas. En el área mediterránea, la clasificación de este género se lleva a cabo principalmente según las claves taxonómicas de Pignatti (1982) y Carretero (1981). En Extremadura, el género *Echinochloa* incluye principalmente 4 especies: *E. crus-galli*, *E. hispidula*, *E. oryzoides* y *E. oryzicola*. Por otro lado, el género *Leptochloa*, comprende aproximadamente 40 especies de origen tropical y subtropical (Snow et al., 2008). En España, las primeras referencias como mala hierba aparecieron en 1985 en Lérida, en cultivos como maíz y pradera (Mayoral, 1991, 1993; Recasens and Conesa, 1995), y su presencia como mala hierba en el cultivo del arroz, ha pasado de ser algo puntual a estar ampliamente extendida en un espacio de tiempo relativamente corto. Diferenciar las especies en campo es muy complicada y la bibliografía existente las caracterizaba una vez emergida la panícula. En Extremadura, el género *Leptochloa* incluye dos especies: *L. fascicularis* y *L. uninervia*.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las especies de ambos géneros son difíciles de identificar morfológicamente, y además, para ello, se requiere que se encuentren en un estadio avanzado de su desarrollo, con lo cual sería tarde para llevar a cabo la aplicación del herbicida. Para poder hacer tal diferenciación de manera temprana se recurre al empleo de técnicas molecu-

lares. En este trabajo se han puesto a punto técnicas moleculares basadas en la PCR para poder diferenciar las especies de ambos géneros de campos de arroz de Extremadura en un estadio temprano.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal. Semillas de *Echinochloa* spp. recolectadas en los campos de arroz de Extremadura, se hicieron germinar en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada y selladas con parafilm. Una vez germinadas, se procedió a su extracción. En ocasiones, la semilla no germinó, con lo que la extracción se hizo de la propia semilla hidratada. Para el caso de las semillas de *Leptochloa* spp., se germinaron en macetas de 7x7x9 cm. utilizándose un sustrato de turba-vermiculita en una proporción 3:1 en invernadero con condiciones controladas.

2.2. Extracción del ADN y reacciones de PCR. Para la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción de ADN para plantas de BIOTOOLS siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, se cuantificó utilizando el NANODROP 1000 (Thermo Scientific) para asegurarnos que estaba en las condiciones adecuadas de concentración y pureza. A continuación, se hicieron diluciones a 10 ng/ μ l para el caso de las muestras de *Echinochloa* spp., y a 20 ng/ μ l para el caso de las muestras de *Leptochloa* spp., que son las concentraciones utilizadas en las posteriores PCR. El ADN se conservó a -21 °C hasta su utilización en los análisis.

En el caso de *Echinochloa* spp., para la realización de la PCR se utilizaron dos parejas de cebadores. Por un lado, la pareja formada por trn-a (5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3') / trn-b1 (5'-AACGATCGAATGAAAATGCC-3'), y por otro lado la pareja formada por trn-c (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') y trn-d (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') (Yamaguchi et al., 2005). La mezcla de los reactivos utilizada para llevar a cabo la reacción de PCR en ambas parejas de cebadores fue de 0.75 μ l de cada uno (10pmol/ μ l), 1.6 μ l de la mezcla de dNTP (2.5mM), 2 μ l de buffer 10X, 0.2 μ l de Taq polimerasa (5U/ μ l) y se completó con agua de PCR hasta un volumen final de 20 μ l. El ciclo de PCR en ambos casos fue: 94°C 3min (x1); 94°C 30seg, 57°C 30seg, 72°C 1min (x30); 72°C 7min (x1) manteniéndose a 4°C final del ciclo. A continuación, se llevaban a cabo las respectivas digestiones utilizando las enzimas de restricción Ecor I (5'-G*AATTC-3'), Alu I (5'-AG*CT-3') y Dra I (5'-TTT*AAA-3'), de manera que la PCR realizada con la pareja trna/b1 era digerida con la enzima Ecor I, y la PCR realizada con la pareja trnc/d era digerida con las enzimas Alu I y Dra I por separado. De este modo, los 30 μ l de volumen final de la reacción contenían 2 μ l del Buffer 10X, 1 μ l de la enzima (Fast Digest Thermo Fisher), 10 μ l del producto de PCR y 17 μ l de agua. La mezcla se incubaba durante 15 minutos a 37°C. Los productos digeridos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.3% en TBE1X, teñidos con Red Safe 20000X (INTRON), y visualizados mediante luz UV utilizando el transiluminador GEL DOC XR SYSTEM (BIO RAD).

En el caso de *Leptochloa* spp. se utilizaron marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphism) los cuales presentan un alto nivel de polimorfismo ya que dan lugar a gran cantidad de bandas, además son muy reproducibles y no requieren información previa del genoma a analizar. Se utilizó para ello el Kit de LICOR «IRDye Fluorescent AFLP» que necesita cuatro etapas. En la primera etapa el ADN genómico se digirió con dos enzimas de restricción, Ecor I (de corte raro) y Mse I (de corte frecuente). Se emplearon 5 μ l de ADN genómico (20ng/ μ l) total para 12,5 μ l de reacción (2,5 μ l de 5x PCR buffer, 1 μ l de EcoRI/MseI enzyme mix y 4 μ l de agua).

El ciclo de PCR utilizado fue: 37°C 2h; 70°C 15min. En la segunda etapa, unos fragmentos de ADN doble denominados adaptadores se ligaron específicamente a los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión anterior, lo cual permitió generar moldes de ADN para la amplificación posterior. Para ello se empleó 12µl del adaptador mix y 0,5µl de T4 DNA ligasa. El ciclo utilizado fue: 20°C 2h. La tercera etapa consistió en una pre-amplificación de los moldes generados mediante PCR utilizando cebadores específicos complementarios a los adaptadores. Para ello emplearon 2,5µl de la dilución 1:10 de la mezcla de ligación para 25,5µl de volumen final. Se utilizó 20µl de AFLP Pre-amp primer mix, 2,5µl de Buffer de PCR reacción (10X) y 0,5µl de taq polimerasa (5 units/µl). El ciclo fue: 20 ciclos de 94°C 30s, 56°C 1min, 72°C 1min. La cuarta y última etapa consistió en la amplificación selectiva utilizando 6 parejas de cebadores: E36-M48, E36-M60, E37-M49, E38-M59, E40-M61 y E35-M49. Se emplearon en cada reacción 2µl de la dilución 1:20 de pre-amplificación para 10,5 µl de volumen final: 6µl de taq polimerasa working mix (1,2µl buffer10X, 0,06µl taq (5U /µl) y 4,74µl de agua), 2µl de MseI primer que contenía los dNTPs, 0,5µl de IRDye 700 Labeled EcoRI primer A o 0,5µl de IRDye 800 Labeled EcoRI primer A). El ciclo utilizado en este caso fue: 1 ciclo de 94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 1min; 12 ciclos de 94°C 30s, 65°C -0.7°C por ciclo, 72°C 1min; 23 ciclos de 94°C 30s, 56°C 30s y 72°C 1min. Los productos obtenidos tras todo el proceso fueron separados mediante electroforesis en geles de acrilamida al 6% utilizando el secuenciador de ADN automático LICOR 4300.

Con los datos obtenidos tras los análisis con AFLP se realizó una matriz que fue analizada con el programa estadístico NTSYS 2.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Del género *Echinochloa*. Para la puesta a punto de la técnica PCR-RFLP para diferenciar las especies del género *Echinochloa*, en primer lugar, se compararon los datos obtenidos con aquellos obtenidos en una caracterización a nivel morfológico con poblaciones de este género representativas de la zona arrocera de Extremadura (datos no mostrados). Una vez correctamente identificadas, se empleó la técnica molecular y se comprobó que se separaban de igual manera las especies con ambas técnicas, de manera que nos permitió clasificar molecularmente las especies en 3 grupos:

- Grupo 1: *E. oryzicola*/*E. oryzoides*
- Grupo 2: *E. crus-galli*/*E. hispidula*
- Grupo 3: *E. colona*.

Como ya fue nombrado con anterioridad, en esta técnica se utilizan dos parejas de cebadores. Utilizando la pareja de cebadores trn-a/trn-b1 para los grupos 1 y 2 se obtiene un fragmento de 481bp, sin embargo, para el grupo 3 el tamaño del fragmento obtenido es de 449bp. Tras la digestión con Ecor I el grupo 1 sigue dando el tamaño de banda de 481bp (la enzima no corta), el grupo 2 da dos fragmentos, uno de 178bp y otro de 271bp (la enzima sí corta), y el grupo 3 sigue dando un fragmento de 449bp (la enzima no corta) Por otro lado, utilizando la pareja de cebadores trn-c/trn-d, para los 3 grupos se obtiene un fragmento de 620bp. Tras la digestión con Dra I, el grupo 1 sigue dando el tamaño de banda de 620bp (la enzima no corta), el grupo 2 y 3 dan dos fragmentos, uno de 120bp y otro de 500bp (la enzima sí corta) Por último, tras la digestión con Alu I, el grupo 1 da 2 fragmentos, uno de 178bp y otro de 447bp (la enzima sí corta), el grupo 2 da un tamaño de banda de 620bp (la enzima no corta), y el grupo 3 da 2 fragmentos, uno de 178bp y otro de 449bp (Fig. 1).

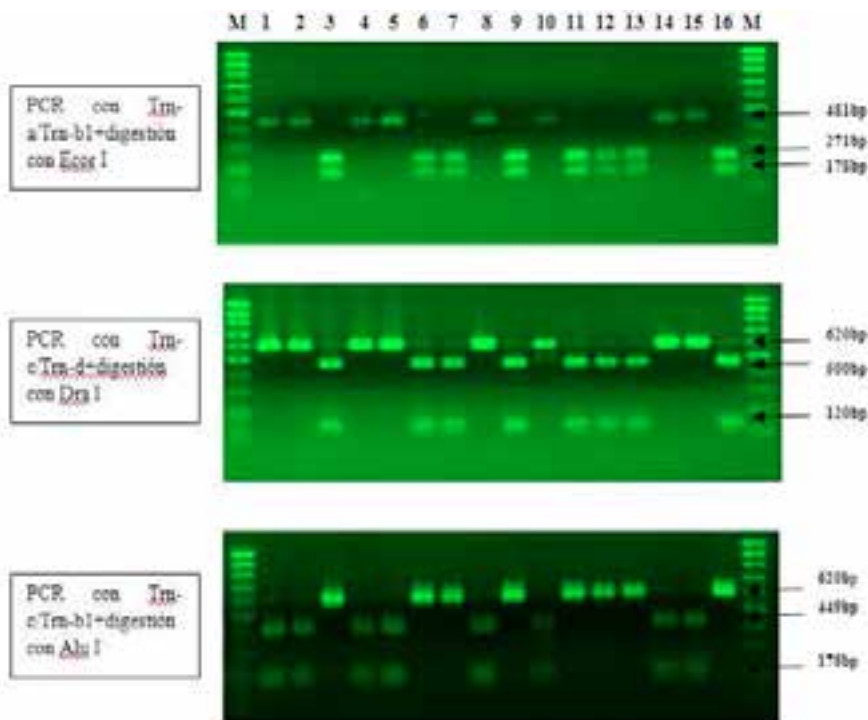


Figura 1. Productos obtenidos tras las digestiones con Ecor I, Dra I y Alu I una vez realizadas las PCR con las parejas de cebadores Trn-a/Trn-b1 y Trn-c/Trn-d. Se muestran poblaciones pertenecientes al GRUPO 1 (calles 1, 2, 4, 5, 8, 10, 14, 15) y al GRUPO 2 (calles 3, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 16).

Del total de las muestras de *Echinochloa* spp. de Extremadura caracterizadas a nivel molecular mediante esta técnica, la mayoría de ellas (un 65%) pertenecen al Grupo 1, seguidas un 34% del Grupo 2. Del Grupo 3 tan solo se han encontrado dos poblaciones (menos de un 1%).

3.2. Del género *Leptochloa*. En primer lugar, tal y como se hizo con las muestras del género *Echinochloa*, los datos moleculares obtenidos se compararon con una caracterización morfológica previa en individuos del género *Leptochloa* y se separaron por especies (datos no mostrados), comprobando la viabilidad de dichos marcadores. Por otro lado, analizando rigurosamente los fragmentos obtenidos en las electroforesis, se localizaron algunos específicos de cada especie con un 90-100% de seguridad. En la tabla 1 se muestran algunos de los tamaños de banda específicos con algunas de las parejas de cebadores utilizadas.

Podemos decir también, que de todas las muestras caracterizadas molecularmente de este género, se ha encontrado que la mayoría de ellas pertenecen a *Leptochloa uninervia* (sobre un 70%), y en menor cantidad *Leptochloa fascicularis* (sobre un 30%).

Tabla 1. Algunos de los fragmentos diferenciadores de las dos especies del género *Leptochloa* spp. encontrados tras los análisis moleculares con marcadores AFLP

Primers	Fragmento	<i>L. fascicularis</i>	<i>L. uninervia</i>
E37_M49	409bp	Presente	Ausente
E37_M49	507bp	Presente	Ausente
E40_M61	236bp	Presente	Ausente
E35_M49	153bp	Presente	Ausente
E36_M48	256bp	Ausente	Presente

4. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto INIA RTA-2014-00033-C03-01, por la ayuda a Grupos de Investigación de la Junta de Extremadura GR15112 y por el proyecto AGROS (CCESAGROS), fondos FEDER.

5. REFERENCIAS

- Carretero, JL (1981). El género *Echinochloa* Beauv. en el suroeste de Europa. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 38: 91-108.
- Mayoral A (1991). Notes Floristiques de la Plana d'Urgell, III. *Ciències*, 49, 79-81.
- Mayoral A (1993). Notes Floristiques de la Plana d'Urgell, IV. *Ciències*, 50, 9-11.
- Pignatti S (1982). Flora d'Italia. Vol. III. Bologna, Italy: Ed Agricole, p. 2324.
- Recasens J y Conesa JA (1995). Nuevas malas hierbas alóctonas en los cultivos de regadío de Cataluña. *Actas Congreso Sociedad Española de Malherbología*, 59-65.
- Snow N, Peterson PM and Giraldo-Cañas D (2008). *Leptochloa* (Poaceae, Chloridoideae) in Colombia. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 2(2): 861-874.
- Yamaguchi HA, Utano K, Yasuda A, Yano and A Soejima (2005). A molecular phylogeny of wild and cultivated *Echinochloa* in East Asia inferred from non-coding region sequences of trn T-L-F. *Weed Biology and Management*, 5, 210-218.

Use of molecular markers for the characterization of rice crop weeds in Extremadura

Summary: The genus *Echinochloa* and *Leptochloa* are the two most problematic weeds in rice fields in Extremadura. In order to be able to control them adequately, an early identification is essential, since the different species of both genus show different responses to the same herbicide. A powerful tool for discriminating species of these weeds are molecular markers, which have advantages over morphological characterization and can help to plan beforehand what are the appropriate control strategies for the farmer. In this work, by using the molecular technique the molecular technique PCR-RFLP we could distinguish at an early stage the species of *Echinochloa* more common in Extremadura: *E. oryzicola*, *E. oryzoides*, *E. crusgalli*, *E. hispidula* and *E. colona*. On the other hand, AFLP markers have been used to differentiate the species of the genus *Leptochloa* (*L. fascicularis* and *L. uninervia*).

Keywords: *Echinochloa*, *Leptochloa*, molecular marker, PCR-RFLP, AFLP.