

# IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Echinochloa* ATRAVÉS DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

Everton D. Bortoly<sup>1</sup>, Rogério Rubin<sup>2</sup>, Carlos H. P. Mariot<sup>2</sup>, Augusto Kalsing<sup>2</sup>, Valmir G. Menezes<sup>3</sup>,  
Catarine Markus<sup>1</sup>, Aldo Merotto Jr.<sup>1</sup>

Palavras-chave: Capim-arroz, filogenia, marcadores moleculares, panícula

## INTRODUÇÃO

Várias espécies do gênero *Echinochloa* estão entre as principais plantas daninhas de arroz que ocorrem em todo o mundo. As principais espécies deste gênero apresentam grande variabilidade morfológica e plantas com características intermediárias que dificultam a identificação taxômica de espécie. Esse problema resultou na denominação do complexo *Echinochloa* em alguns estudos. No entanto, esta generalização tem causado grandes problemas em relação ao registro de herbicidas, a necessidades específicas de indicações de práticas de manejo que favorecem o estabelecimento de uma determinada espécie e às determinações de ocorrência de biótipos resistentes que ocorrem em relação a uma determinada espécie em detrimento de duas ou mais espécies do gênero *Echinochloa*.

As principais chaves taxonômicas de identificação das espécies do gênero *Echinochloa* são de Pirola (1965), Pignatti (1982), Pfitscher & Barreto (1976), Carretero (1981), Kissmann (1991) e Tabacchi et al. (2006). A identificação das espécies de capim-arroz através destas chaves taxonômicas é dificultada devido elevada semelhança morfológica existente entre as espécies (Aoki & Yamaguchi, 2008). As técnicas de biologia molecular têm apresentado novas possibilidades para estudos taxonômicos em muitas espécies que são semelhantes morfológicamente, como por exemplo, capim-arroz. Uma dessas técnicas é o uso de marcadores moleculares universais que possibilitam analisar as variações ocorridas no DNA e, através disto, estabelecer associações entre indivíduos. Os principais marcadores de cpDNA são as regiões entre trnT(UGU) – trnL(UAA), trnL(UAA), trnL(UAA) – trnF(GAA) e o intron trnL (Pirie et al., 2007) e de regiões do DNA ribossomal nuclear como os espaçadores de transcrito interno (ITS) (Aoki & Yamaguchi, 2008). Estes marcadores geram informações empregadas em análises filogenéticas capazes de apresentar as relações de distinção entre populações e espécies com maiores propriedades do que baseadas em marcadores morfológicos.

O objetivo deste estudo foi identificar descritores morfológicos e moleculares e estabelecer as relações filogenéticas em populações de capim-arroz de forma a proporcionar a correta identificação das espécies do gênero *Echinochloa* ocorrentes em áreas de arroz irrigado no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal inicial consistiu de 187 acessos de capim-arroz, sendo avaliadas 10 plantas por acesso. O crescimento das plantas foi realizado em vasos, mantidos com lâmina de água de aproximadamente cinco centímetros acima do nível do solo. Após atingirem o estágio reprodutivo, as plantas foram avaliadas em relação as características morfológicas discriminantes segundo as chaves taxonômicas de Carretero (1981), Pirola (1965), Pfitscher & Barreto (1976) e Kissmann (1991).

---

<sup>1</sup>UFRRGS, Porto Alegre/RS, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS. CEP 91501-970. Email: edbortoly@yahoo.com.br); <sup>2</sup>Dow AgroSciences Ind. Ltda, São Paulo, SP; <sup>3</sup>Oryza & Soy Pesquisa e Consultoria Agronomica LTDA, Porto Alegre, RS.

A análise molecular foi realizada em 29 acessos avaliados na análise morfológica que apresentaram maiores variações em relação às características morfológicas, e na espécie *E. phyllopogon*. Os *primers* universais usados foram baseados em regiões não codificadas do intron *trn* em relação as regiões *trnT*(UGU) - *trnL*(UAA) (*primers* A e B) e *trnL*(UAA) - *trnF* (GAA) (*primers* C e F) descritos por Taberlet *et al.* (1991). Ainda, foram utilizados *primers* ITS que amplificam regiões do DNA nuclear ribossomal (nrDNA) denominados de ITS-Y4 e ITS-Y5 descritos em Aoki & Yamaguchi (2008). As reações da polimerase em cadeia foram adaptadas de Yamaguchi (2005). Os sequenciamentos de DNA foram realizados através do equipamento 3730XL.

As seqüências obtidas foram editadas e alinhadas pelo programa Mega versão 5.1, URL (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). As seqüências dos *primers* A e B foram alinhadas com as seqüências AB223072 de *E. crus-galli*, AB223083 de *E. colona* e AB223059 de *E. oryzicola*. Para os *primers* C e F utilizaram-se as seqüências AB223104 e AB223134 de *E. crus-galli*, AB223115 e AB223145 de *E. colona* e AB223091 e AB223121 de *E. oryzicola*. Do mesmo modo, as seqüências dos *primers* ITS foram alinhadas com as seqüências AB353389 de *E. crus-pavonis* e AB353391 de *E. colona*. A análise de agrupamento foi realizada usando o método UPGMA através do programa Mega 5.1.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estrutura da ramificações da panícula foi consistente para diferenciação de *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* (Tabela 1). A presença de múltiplos antécios na ramificação da panícula é característica de *E. crus-pavonis*. A presença de cerdas longas (maior que 4 mm) na ramificação da panícula é característica identicadora de *E. crus-galli* (Tabela 1). A largura do antécio (conjunto lema, pálea e cariopse/semante) pode ser utilizada na diferenciação de *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis*, onde a espécie *E. crus-galli* apresenta largura do antécio de 1,2 a 2 mm e a espécie *E. crus-pavonis* apresenta largura inferior a 1,2 mm (Tabela 1). A característica usualmente mais empregada na diferenciação das espécies de capim-arroz pelos produtores e técnicos é a arista. A espécie *E. colona* foi a mais uniforme em relação a esta variável, sendo que todos os acessos classificados como pertencendo a essa espécie eram desprovidos de aristas. Porém, a espécie *E. crus-galli* apresentou acessos desprovidos de aristas bem como presença com vários comprimentos (Tabela 1).

A seqüência amplificada pelo primer *trnA/trnB* e *trnC/trnF* em relação a deleção de A ou G é característico de *E. colona*, e a inserção de A ou G em *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* (Tabela 1). Esta mesma seqüência também proporcionou a separação destas espécies em função da ocorrência de polimorfismo T e T em *E. colona* e T e T em *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* (Tabela 1). Estes resultados indicaram a fácil diferenciação entre *E. colona* e as outras espécies e dificuldade de diferenciar *E. crus-galli* de *E. crus-pavonis* (Tabela 1). As espécies *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* apresentaram apenas duas mutações diferenciais. Nas seqüências analisadas, para todas as demais espécies o nucleotídeo encontrado é uma timina, para a espécie *E. crus-galli* este alterou para guanina e em outra região ocorreram duas alterações de adenina para timina (Tabela 1).

A Análise filogenética com base nas seqüências de cpDNA e ITS diferenciou os acessos analisados em relações as espécies coletas *E. colona*, *E. crus-pavonis*, *E. crus-pavonis* e *E. helodes*, e destes em relação as demais espécies *E. phyllopogon*, *E. oryzoides* e *E. esculenta* (dados não apresentados).

Tabela 1 - Resumo dos principais descritores morfológicos e moleculares diferenciais entre as espécies de *E. colona*, *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis*.

Espécie/Descritor	<i>E. colona</i>	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-pavonis</i>
Ilustração da ramificação da panícula			
Comprimento da ramificação da panícula	Menor que 1,5cm	Entre 1,5cm e 1,9cm	Maior que 2cm e Menor que 3cm
Presença de antécios (pálea, lema e semente) na ramificação da panícula		Um	Múltiplos
Comprimento do Antécio	2,0cm	Maior que 2,5 e Menor que 3cm	
Cerdas na ramificação da panícula		Múltiplas com comprimento de 4 a 7 mm	Ausentes ou com comprimento de até 3mm
Largura do Antécio	1,3cm	Maior que 1,2cm e Menor que 2cm	Menor que 1,2cm
Presença de Aristas	Ausente	Ausente ou presente variando de 0,5 a 3cm	Presente variando de 0,3 a 0,5cm
Coloração de estruturas da planta	Predominantemente Verde	Verde, Verde Escuro e Verde-arroxado	Roxo intenso
Primer trnA/trnB e trnC/trnF	Deleção de duas sequencias repetidas de TCTTAATTATTAA em <i>E. colona</i> , <i>E. crus-galli</i> ou <i>E. crus-pavonis</i> em relação a <i>E. phylopogon</i>		
Primer trnA/trnB e trnC/trnF	Deleção de A ou G	Inserção de um nucleotídeos A ou G	
Primer trnA/trnB e trnC/trnF	Nucleotídeos T e G	Nucleotídeos T e T	
Primer trnA/trnB e trnC/trnF	Nucleotídeo T Nucleotídeo A	Nucleotídeo G Nucleotídeo T	Nucleotídeos T Nucleotídeos A

## CONCLUSÃO

A avaliação morfológica apresentou grande variabilidade tanto de características vegetativas como reprodutivas dificultando a utilização das chaves taxonômicas para vários acessos. A largura do antécio menor que 1,2 cm, ramificação da panícula com várias sementes e cerdas curtas e coloração roxa presente em todos os estágios da planta são característicos da espécie *E. crus-pavonis*, em relação a *E. crus-galli*. A sequência de nucleotídeos de cpDNA indicou a ocorrência de duas mutações difenciais entre as espécies *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* que podem ser utilizadas para discriminação destas espécies. O conjunto de descritores morfológicos relacionados ao comprimento da ramificação da panícula, número, comprimento e largura do antécio, cerdas na ramificação da panícula e presença de aristas, e moleculares relacionados a vários SNPs e indels resultantes da amplificação com os primers trnA/trnB e trnC/trnF possibilitam a identificação precisa das espécies de capim-arroz *E. colona*, *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* ocorrentes em lavouras de arroz irrigado no Sul do Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, D.; YAMAGUCHI, H. Genetic relationship between *Echinochloa crus-galli* and *Echinochloa oryzicola* accessions inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequences. **Weed Biol. Manag.**, Oxford, v. 8, n. 4, Dec., p. 233-242, 2008.
- CARRETERO, J. L. El genero *Echinochloa* en el Grande Suroeste de Europa. **An. Jard. Bot.**, Madrid, v. 38, n. 1, p. 91-108, 1981.
- KISSMANN, K. G. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira S.A, Indústria Química, 1991. p. 390-404.
- PFITSCHER, E. M.; BARRETO, I. L. As espécies do gênero *Echinochloa* (Graminae) ocorrentes no Rio Grande do Sul. **Anuário Técnico do IPZFO**, Porto Alegre – RS, v. 3, p. 245-289, Jul., 1976.
- PIGNATTI, S. **Flora d'Italia**. Bologna: Ed. Agricole, 1982. p. 2324. v. 3 p. 2324.
- PIROLA, A. Appunti per il riconoscimento delle Echinocloe italiane (Giavone). **Il Riso**, n. 14, p. 607-609. 1965.
- PIRIE, M. D. et al. Ancient paralogy in the CPDNa trnL-F region in Annonaceae: Implications for plant molecular systematics. **Am. J. Bot.**, St. Louis, v. 94, n. 6, Jun., p. 1003-1016, 2007.
- TABACCHI, M. et al. Morphological traits and molecular markers for classification of *Echinochloa* species from Italian rice fields. **Weed Sci.**, Lawrence, v. 54, n. 6, Nov.-Dec., p. 1086-1093, 2006.
- TABERLET P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Mol Biol.**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 1105-1109, 1991.
- YAMAGUCHI, H. et al. A molecular phylogeny of wild and cultivated *Echinochloa* in East Asia inferred from non-coding region sequences of trnT-L-F. **Weed Biol. Manag.**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 210-218, 2005.