

AVALIAÇÃO FILOGENÉTICA DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa* spp.) DETERMINADA ATRAVÉS DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES

Everton Danilo Bortoly¹; Catarine Markus¹; Carlos H. P. Mariot²; Rogério Rubin²; Valmir Gaedke Menezes³; Augusto Kalsing³; Aldo Merotto Jr.⁴

Palavras-chave: *Echinochloa colonum*, *Echinochloa crus-galli*, *Primers Universal*

INTRODUÇÃO

A correta identificação das espécies de capim-arroz é dificultada pela existência de semelhanças morfológicas entre espécies, da possível ocorrência de híbridos que apresentam características intermediárias entre as espécies, e também pela existência das plantas *mimics* pertencentes a uma espécie que apresenta características semelhantes de outra espécie. Este problema é exemplificado em estudo na Itália onde apenas 44% das plantas de capim-arroz encontradas em lavouras de arroz irrigado apresentaram identificação possível através de chaves taxonômicas (Sparacino *et al.*, 1994). Isto pode ser devido a interferências ambientais específicas de cada região ou até mesmo hibridização entre espécies ou populações diferentes, dificultando a identificação correta dessas espécies.

Devido à elevada complexidade da identificação das espécies de capim-arroz com o uso de chaves taxonômicas, há necessidade de empregar outras técnicas para auxiliar a identificação das espécies como, por exemplo, o uso de tecnologia molecular. Recentemente, a biologia molecular tem desempenhado uma função cada vez mais importante nos estudos ecológicos. As técnicas moleculares têm resultado em novas possibilidades para estudos taxonômicos em muitas espécies que não são facilmente caracterizadas morfológicamente, como por exemplo, o capim-arroz (Taberlet *et al.* 1991). Uma dessas técnicas adotadas é o uso de marcadores moleculares (*primers universais*) que possibilitam analisar as possíveis variações ocorridas no DNA que podem ser usadas para identificação de espécies. Esses marcadores apresentam baixas taxas de evolução e tem alta conservação do genoma entre as diferentes espécies de plantas, e devido a essas características são utilizados em estudos de filogenia e classificação de espécies (Tabacchi *et al.*, 2006). Isso só é possível porque, diferente do DNA nuclear que é herdada de forma biparental, o cpDNA é de herança maternal, podendo assim identificar a qual espécie a planta pertence e também se o mesmo é resultado de hibridização entre espécies. (Embrapa, 2005). Deste modo, o objetivo deste estudo foi de realizar determinações filogenéticas através de marcadores moleculares em populações de capim-arroz coletadas no estado do RS de forma a identificar precisamente as espécies ocorrentes nesta região e a variabilidade de espécies inter e intrapopulacional.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal consistiu de 125 acessos coletados em áreas de cultivo de arroz irrigado no estado do RS. A análise filogenética foi realizada em 25 acessos com características distintas, e populações originadas da Venezuela, Itália e EUA como representantes de populações de foram da área de estudo. Foram analisadas 10 plantas por população, semeadas em vasos com capacidade de 500ml. Após a emergência foi

¹ Aluno de Pós-graduação. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, UFRGS. Porto Alegre, RS. Email: edbortoly@yahoo.com.br

² Pesquisador. Dow AgroSciences Ind. Ltda., São Paulo, SP.

³ Pesquisadores do Instituto Rio-Grandense do Arroz – IRGA, Cachoeirinha, RS.

⁴ Professor. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Porto Alegre, RS.

realizado desbaste deixando-se uma planta por vaso. A adubação e os demais tratos culturais seguirão as recomendações técnicas da pesquisa para a cultura do arroz na região Sul do Brasil (SOSBAI, 2007).

As análises morfológicas foram realizadas com base nas principais características morfológicas das chaves taxonômicas de Carretero (1981), Kissmann (1991), Pignati (1982) e Pfitscher & Barreto (1976). As duas últimas chaves são específicas para as espécies de capim-arroz ocorrentes no estado do RS. As características morfológicas avaliadas foram comprimento total da planta, presença ou não de aristas, quantidade de eixos secundários, comprimento e largura da panícula, do 3º eixo secundário, espiguetas, das glumas superior e inferior, lemas e pálea, e comprimento do antécio. As análise genéticas foram realizadas com o uso de marcadores moleculares (*Primers Universais*), *trn-a* e *trn-b* para amplificação da região *trnT – trnL* e os primers *trn-c* e *trn-f* amplificam a região *trnL – trnF*. Esses dois pares de primers amplificam regiões de aproximadamente 900 pares de bases e ambos são relacionados ao DNA do cloroplasto (Taberlet *et al.* 1991).

O DNA foi extraído de folhas jovens usando método CTAB (Doyle and Doyle, 1987). A reação de PCR foi adaptada de Shaw *et al.* (2005) e seguiu o seguinte protocolo: 50ng de DNA, 0,2 mM deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) (Invitrogen), 1X tampão PCR buffer (Invitrogen), 0,35 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen), 0,15 µM de cada Primer, 1,3 µL de DMSO 100% e 3 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen), em um volume total de 40 µL por reação. A reação de PCR foi adaptada de Shaw *et al.* (2005) e sujeita a 3 minutos de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C, 1 minuto a 73°C e por fim 5 minutos a 72°C. Para a separação dos produtos de PCR foi usado 12 µL do produto de reação, acrescentado 30% de corante e corridos em gel de agarose a (2%), após 120 minutos a 110V em tampão TBE. Após, foi fotografado com auxílio do programa L-PIX IMAGE Release 2.6 (Loccus Biotecnologia). O sequenciamento do DNA foi realizado através do equipamento Applied Biosystems 3730XL (MACROGEN Inc., Seul, Coréia do Sul).

As sequências obtidas foram editadas pelo programa BIOEDIT Versão 7.1.3, e alinhadas através do programa CLUSTAL W. Os resultados das avaliações morfológicas foram submetidos às chaves taxonômicas e as sequências foram feitos blast no GeneBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após, foi composto o dendograma através do programa ClustalW2, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (EBI, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas grande variações das características morfológicas entre os acessos avaliados. A altura de planta apesentou-se como uma característica com grande variabilidade, onde a maioria das plantas apresentava mais de um metro de altura e algumas ultrapassavam os dois metros de altura. Por outro lado esta característica permite certa facilidade na identificação de espécies como, por exemplo, *Echinochloa colonum* a qual, apresenta porte baixo com panículas estreitas, pois, apresentam os eixos secundários curtos com menos de 2cm. Porém, para outras espécies esta análise é dificultada, como no caso de *E. crus-galli* que apresentou plantas com altura que variou de uma a dois metros de altura (dados não apresentados).

As avaliações morfológicas realizadas em laboratório relacionadas à quantidade de eixos secundários, comprimento e largura da panícula, do 3º eixo secundário, espiguetas, das glumas superior e inferior, lemas e pálea, e comprimento do antécio são usadas para classificar as espécies de acordo com as chaves taxonômicas usadas. O comprimento do eixo secundário da panícula foi bastante discriminatória, sendo quando esta característica é inferior a 2 cm tem-se a indicação de ocorrência da espécie *E. colonum* (Figura 1). Esta característica não é discriminadora das outras espécies de *Echinochloa*, e neste caso necessita-se analisar outras características como, por exemplo, o formato da gluma inferior

que no caso de apresentar grandes cerdas e com três a cinco nervuras com pelos indica a ocorrência de *E. crus-galli*, ou glumas glabras com poucos pelos na região central indica a ocorrência de *E. crus-pavonis* (Pignati, 1982) (Figura 2).

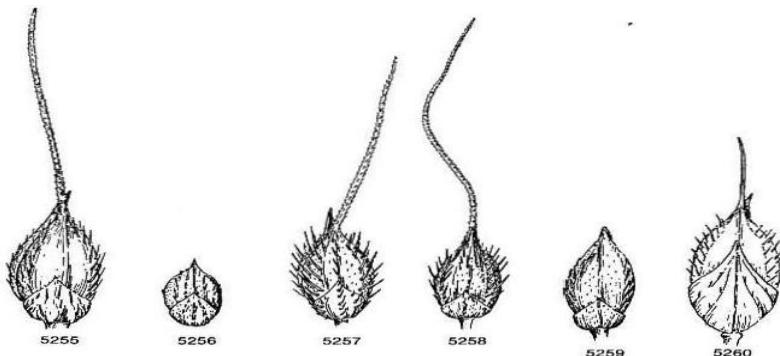


Figura 1. Características das espiguetas das espécies de capim-arroz de acordo com Pignati (1982), (5255) *E. phylloponer*, (5256) *E. colonum*, (5257) *E. crus-galli*, (5258) *E. crus-pavonis*, (5259) *E. erecta* e (5260) *E. hostii*.

A distribuição da ocorrência das principais espécies do gênero *Echinochloa* do estado do RS de acordo com as classificações de Pignati (1982), Carretero (1981) e Pfischer & Barreto (1976) é apresentada na Figura 2. Algumas plantas apresentaram características de duas ou mais espécies e essas não foram identificadas e ficaram indefinidas, porém quando essas características eram irrelevantes a planta foi classificada como sendo da espécie com maior similaridade. Há chaves taxonômicas que não descrevem alguma espécie de capim-arroz, principalmente devido à peculiaridade da região que foi formulada a chave taxonômica, consequentemente essas espécies não apresentam nenhuma planta identificada como, por exemplo, a chave taxonômica de Carretero que não descreve a espécie *E. crus-pavonis*.

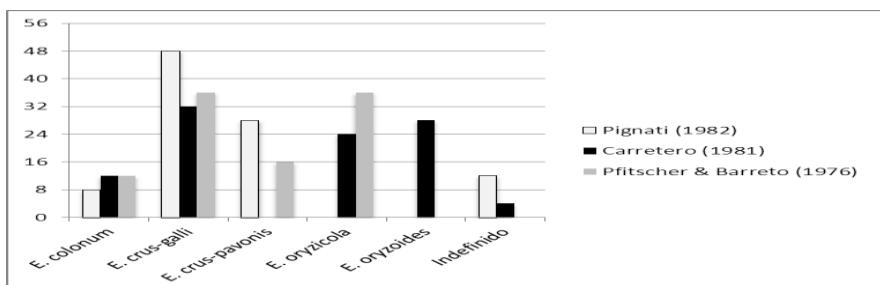


Figura 2. Percentual das plantas de capim-arroz identificadas utilizando chaves taxonômicas.

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas com sequências já conhecidas do GeneBank e a maioria das amostras obtiveram boa correlação principalmente com as espécies *E. colonum*, e *E. crus-galli*. Ambos os primers que amplificam regiões do cpDNA foram altamente informativos. Pode-se observar no dendograma que as espécies oriundas do Rio Grande do Sul - RS, denominadas com um BR após o nome científico, obtiveram alta similaridade com sequências oriundas do GeneBank, o que de forma geral confirma a identificação realizada através da análise morfológica.

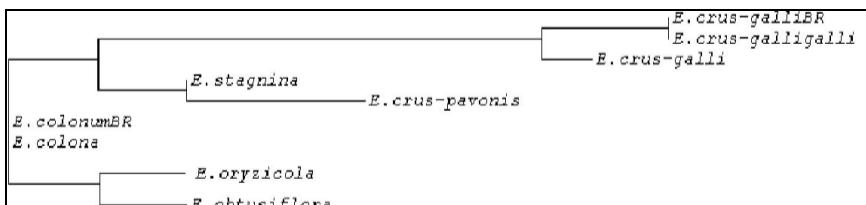


Figura 3. Dendograma realizado com acessos de *Echinochloa* originados de lavouras do RS (classificação original baseado na análise morfológica, e descritos com a denominação "BR" após o nome) baseado em sequências de DNA materno em comparação com sequências de diversas espécies do gênero *Echinochloa* disponíveis no GeneBank.

CONCLUSÕES

As características morfológicas de comprimento do eixo secundário da panícula e pilosidade da gluma inferior podem ser utilizadas para identificar as espécies *E. colonum*, *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* advindas de áreas de arroz irrigado do RS. No entanto, para diversas plantas que apresentam características morfológicas variáveis o uso dessas avaliações impossibilita a correta identificação. Os marcadores moleculares universais trn-a/trn-b e trn-c/trn-f resultam em amplificação de cpDNA nos acessos de capim-arroz do RS, e resultam em sequências análogas a de espécies do gênero *Echinochloa*. Estas informações serão utilizadas para identificar plantas cuja identificação não foi possível através da análise morfológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARRETERO, J. L. 1981. *El genero Echinochloa en el Grande Suroeste de Europa*. An. Jard. Bot. Madrid. 38:91-108.
- DOYLE, J. J. e J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/26737/1/doc137.pdf> Acesso em: 1 de jun. de 2013.
- Kissmann, K.G. 1991. *Plantas infestantes e nocivas*, vol 1. BASF Brasileiras S. A.
- PIGNATTI, S. 1982. *Flora d'Italia. Vol. III.*, Bologna, Italy: Ed Agricole. 2324 p.
- PFITSCHER, E. M. & BARRETO, I. L. 1976. *As espécies do gênero Echinochloa (Gramineae) ocorrentes no Rio Grande do Sul*. Anuário Téc. Inst. Pesq. Zootécn. Francisco Osorio 3: 245-289.
- SHAW, J. et al. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- SOSBAI. *Arroz irrigado*: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil / V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Pelotas: SOSBAI, 154 p. 2007.
- SPARACINO, A. C., A. FERRERO, R. FERRO, AND N. RIVA. Morphological analysis of the main *Echinochloa* species in Italian rice fields. Pages 285-292 in Proceedings 1994 5th European Weed Research Society. Mediterranean Symposium on Weed Control In Sustainable Agriculture in the Mediterranean Area, Perugia, Italy. 1994.
- 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, GIELLY L, PAUTOU G ET AL. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17:1105-1109. 1991.