

Teosinte introducido en España y maíz *Bt*: tasa de hibridación, fenología y cuantificación de toxina Cry1ab en los híbridos

Teosinte introduced into Spain and *Bt* maize: hybridisation rate, phenology and Cry1Ab toxin quantification in the hybrids

María Arias-Martín*, María Concepción Escorial Bonet & Iñigo Loureiro Beldarraín

Dpto. Protección Vegetal, Centro Nacional Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, CSIC), Madrid, España
(*E-mail: arias.maria@inia.csic.es)
<https://doi.org/10.19084/rca.35040>

Recibido/received: 2024.01.15
Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

Las áreas donde se ha identificado la presencia de teosinte en España son aquellas con la mayor superficie cultivada con maíz modificado genéticamente, maíz *Bt* que expresa la toxina Cry1Ab para el control de las plagas *Sesamia nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*, denominadas taladros. El parentesco entre maíz y teosinte permite su cruzamiento y la expresión de toxina en los híbridos. Una producción de toxina a niveles subletales para los taladros podría dar lugar a una aceleración en el desarrollo de resistencia. En este trabajo se ha determinado el potencial de hibridación entre el teosinte localizado en España como parental femenino y el maíz *Bt* como parental masculino. Además, se ha realizado un seguimiento fenológico de las etapas vegetativas (altura, área del tallo, número de hojas y tallos secundarios) y reproductiva (días hasta la floración) de los híbridos y de sus parentales y, se han cuantificado los niveles de toxina Cry1Ab en las plantas mediante ELISA. Los ensayos se han realizado durante tres años en condiciones ambientales no controladas. Sólo en uno de los años se consiguió obtener híbridos en porcentajes que variaron de 0% al 72%. Los híbridos presentaron un fenotipo intermedio al de los parentales para los parámetros evaluados. Las condiciones ambientales influyeron en la concentración de toxina Cry1Ab producida por los los híbridos F_1 que varió entre 36,4-48,8 ng Cry1Ab/mg de hoja fresca en función del año, siendo estos valores de 46,8-51,4 para el maíz.

Palabras clave: *Zea mays*, cruzabilidad, cultivos genéticamente modificados, riesgo agrícola, riesgo ambiental

ABSTRACT

The areas in which the teosinte has been found in Spain are those with the largest acreage planted with genetically modified maize, the *Bt* maize expressing Cry1Ab toxin used to control the pests *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis*, known as borers. The close relation between maize and teosinte allows their crossing and the expression of the toxin in the hybrids. The production of the toxin at sub-lethal levels for the borers could lead to an earlier development of resistance. In this work, the potential hybridisation between teosinte found in Spain as the female parent and *Bt* maize as the male parent was determined. Furthermore, a phenological monitoring of the vegetative (plant height, stem area and number of leaves) and reproductive stages (days to flowering) of the hybrids and their parents has been carried out, while the Cry1Ab toxin produced have been quantified by ELISA. The experiments were carried out during three years under non-controlled environmental conditions. Hybrids were only obtained in one of the years, at percentages ranging from 0% to 72%. The hybrids showed a phenotype intermediate to that of the parents for the parameters evaluated. Environmental conditions influenced the production of Cry1Ab toxin in the F_1 hybrids, which ranged from 36.4-48.8 ng Cry1Ab/mg fresh leaf, depending on the year. These values were of 46.8-51.4 for maize.

Keywords: *Zea mays*, crossability, genetically modified crops, agricultural risk, environmental risk

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos que debe tener en cuenta el proceso de evaluación del posible impacto ambiental asociado a la comercialización de cultivos genéticamente modificados (GM) en la Unión Europea (UE) es el riesgo de cruce de estos cultivos con sus especies silvestres, lo que puede dar lugar al flujo de los transgenes a especies emparentadas. Casi la totalidad de la superficie de maíz transgénico que se cultiva en Europa está localizada en España, que alberga el 96% del único evento aprobado para su cultivo en la UE (Areal & Riesgo, 2022), el maíz *Bt* MON810 resistente a insectos. Este maíz expresa la toxina Cry1Ab para el control de las plagas *Sesamia nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*, denominadas taladros del maíz. La aparición de teosinte, ancestro silvestre del maíz, en campos de cultivo de maíz localizados en el valle del Ebro (Pardo *et al.*, 2014) donde se concentra la mayor superficie de maíz *Bt* en España (MAGRAMA, 2023), además de ser un riesgo agrícola al competir con el cultivo causando pérdidas económicas, podría suponer un riesgo ambiental puesto que el maíz puede hibridar espontáneamente con la mayoría de sus parientes silvestres de teosinte (Andersson & de Vicente, 2010). Esta hibridación podría dar lugar a una introgresión de los transgenes en la especie silvestre, y conferir a ésta características que le favoreciese en su proliferación y persistencia. En el caso del cruzamiento entre teosinte y maíz *Bt*, los híbridos generados expresan la toxina Cry1Ab (Arias-Martín *et al.*, 2022).

En este trabajo se plantean tres objetivos: a) determinar el potencial de hibridación entre teosinte localizado en España y maíz *Bt* y, en híbridos obtenidos, b) realizar un seguimiento fenológico de las etapas vegetativa y reproductiva y, c) cuantificar la producción de toxina Cry1Ab, puesto que una producción de toxina en concentraciones subletales para las plagas diana, podría contribuir a una aceleración en el desarrollo de resistencia a los cultivos *Bt*, principal riesgo para el éxito de esta herramienta de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron las variedades de maíz (*Zea mays* ssp. *mays* L.) DKC6451YG que expresa toxina Cry1Ab de

Bacillus thuringiensis (maíz *Bt*, evento MON810). Las semillas de teosinte (Tz) que infestaba campos de maíz de Zaragoza (Aragón) fueron proporcionadas por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

Cruzamientos teosinte ♀ x maíz Bt ♂ e identificación de los híbridos F₁

Durante 2019, 2020 y 2021 se realizaron cruzamientos por polinización libre en condiciones de competencia de polen para obtener híbridos F₁ entre teosinte y maíz *Bt*. Las siembras se realizaron el 29 de abril 2019, 5 de mayo 2020 y 13 de mayo 2021 en macetas de 30 cm de diámetro, ubicadas en el exterior de las instalaciones del INIA (40° 27' N; 3° 45' O). El crecimiento de las plantas y el protocolo para la realización de los cruzamientos se describe en Arias-Martín *et al.* (2019). Las semillas recogidas en las plantas de teosinte se desinfectaron con Domestos® (7%) durante 10 minutos, se aclararon con agua tres veces y se sembraron en cámara en condiciones controladas (25:20 °C y 16:8 h día/noche). Cuando las plántulas se encontraban en 2-3 hojas, se identificaron los híbridos por la detección de la toxina Cry1Ab mediante ELISA (AgraStrip® Cry1Ab Seed and Leaf). El número de híbridos obtenidos se multiplicó por dos debido a que el parental maíz era heterocigótico para la producción de toxina. Se calculó la hibridación como la razón entre el nº de híbridos y el nº de semillas germinadas, en porcentaje. Se calculó la hibridación mínima estimada, puesto que puede haber híbridos que no germinen, como la razón entre el nº de híbridos y el total de semillas analizadas, en porcentaje.

Fenología de híbridos y parentales

El 13 y el 10 de mayo de 2022 y 2023, respectivamente, se realizaron las siembras de los parentales. Los híbridos F₁ se trasplantaron entre 10 y 15 días después cada año tras su identificación. El cultivo de las plantas se realizó en las condiciones descritas en el apartado anterior. El crecimiento vegetativo (VE) se midió una vez por semana durante 6 semanas después de la emergencia. Se analizó la altura, área del tallo entre las hojas 3 y 4, número de hojas y número de tallos secundarios. Durante la fase reproductiva se contabilizó el nº de

días hasta la aparición del penacho (VT) y de es-
tigmas (R1). La duración de VE, VT y R1 se ex-
presó en unidades de tiempo térmico, calculando los
grados-día de crecimiento (GDD) con límites de
temperatura máxima (T_{máx}) y mínima (T_{mín}) de
30°C y 10°C respectivamente, siguiendo la ecua-
ción $GDD_{30,10} = [(T_{mín} + T_{máx})/2] \cdot T_b$, donde la tem-
peratura base (T_b) fue de 10°C, acumulándose en-
tre cada estado.

Cuantificación de la toxina Cry1Ab

Cuando las plantas de maíz descritas en el apartado
anterior se encontraban en el estadio V8-V11, se to-
mó una muestra (8-13 mg) de la parte central de las
hojas 6, 7 y 8, analizando un mínimo de 5 plantas
por año y generación. La cuantificación se hizo por
duplicado mediante DAS ELISA, con el kit de Ag-
dia Bt-Cry1Ab/Cry1Ac (Elkhart, EEUU). La mues-
tra se homogeneizó con 500 µl tampón fosfato-sa-
lino-Tween 20 durante 3 ciclos 30' a 4.000 rpm
de (BeadBlaster 24R) y se centrifugó 5' a 12.000 rpm.
Las concentraciones de la curva de calibración fue-
ron: 0,125; 0,5; 1; 3; 6; 9; 12; 15; 18 y 21 ng de pro-
teína Cry1Ab purificada/ml. Se tomaron medidas
espectrofotométricas en lector SpectroStar Nano
(BMG Labtech, Alemania) a 650 nm.

Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias en los parámetros fe-
nológicos de la fase vegetativa entre los parentales
y los híbridos F₁ (Tz x Bt) con un Modelo Lineal Mul-
tivariable (MLM). El factor fijo fue la generación y
como covariable se utilizó los GDD acumulados.
La detección de diferencias significativas en la con-
centración de toxina Cry1Ab entre el maíz Bt y los
híbridos F₁ (Tz x Bt) se realizó mediante una Mo-
delo Lineal Mixto analizando los factores genotipo

(fijo), año (aleatorio) y su interacción. Se utilizó el
software SPSS (IBM®SPSS® Estadística, V29, 2022).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hibridación

Los resultados de los experimentos realizados du-
rante tres años se muestran en la Tabla 1. Sólo se
identificaron híbridos en los cruzamientos del año
2022. De 5 plantas analizadas se obtuvieron híbri-
dos en 4. Del total de 450 semillas puestas a germi-
nar en 2022 germinaron el 63,8 %. El porcentaje de
hibridación entre teosinte y maíz calculado en base
al número de semillas germinadas varió entre el
28,6 % y el 72,2 % entre plantas, con un valor medio
del $37,9 \pm 26,5\%$. Cuando el porcentaje de hibrida-
ción se calculó en relación al número total de se-
millas analizadas, la hibridación mínima estimada
fue del $21,3 \pm 13,4 \%$ (20 - 35,6 %). Para los tres años,
de 15 plantas analizadas se obtuvo una tasa me-
dia de hibridación del 12,6 % entre teosinte y maíz.

Otros estudios en condiciones controladas han
descrito la dificultad para la obtención de híbridos
entre el teosinte introducido en España y el maíz
(Tritkova *et al.*, 2017; Lohn *et al.*, 2021). En condicio-
nes de no-competencia de polen Lohn *et al.* (2021)
obtuvieron para el mismo sentido del cruzamiento
porcentajes de hibridación del 2,7 % (0 -11 % entre
plantas) entre el teosinte español y otra variedad
de maíz Bt. En nuestro caso, a pesar de no obte-
ner híbridos en 2 de los 3 años de experimentos, en
el año en el que este tuvo éxito los porcentajes de
hibridación fueron superiores a los reportados en
ausencia de competencia. Las condiciones de rea-
lización de los cruzamientos pueden influir en el
éxito de los mismos. Además, análisis genómicos
han determinado que el genotipo del teosinte en-
contrado en España es de origen mixto, con *Z. m.*

Tabla 1 - Hibridación entre maíz y teosinte introducido en España. La hibridación (media ± DE) se calcula en relación a semillas germinadas. La hibridación mínima estimada, en relación a semillas analizadas

Año	Plantas	Nº semillas (semillas/planta)	Nº Semillas analizadas	Germinación (%)	Nº híbridos detectados (estimados)	Plantas con híbridos (%)	Hibridación mínima estimada (%)	Hibridación (%)
2019	5	391 (78 ± 63)	391	36,1	0	0	0	0
2021	5	515 (103 ± 71)	411	17,0	0	0	0	0
2022	5	1287 (257 ± 136)	450	63,8	49 (98)	80	21,3 ± 13,4	37,9 ± 26,5
Total	15						7,1 ± 12,3	12,6 ± 21,8

ssp. mexicana, *Z. m. ssp. parviglumis* y una variedad cultivada de maíz no identificada (Díaz *et al.*, 2020), lo que podría explicar la heterogeneidad encontrada en los cruzamientos, ya que ambas subespecies presentan diferentes tasas de hibridación con maíz (Ellstrand *et al.*, 2007; Arias-Martin *et al.*, 2019).

Fenología

El factor año no fue significativo para los parámetros evaluados, pero se encontraron diferencias significativas entre genotipos. Los híbridos presentaron una mayor altura y las hojas emergieron antes que en ambos parentales, mientras que el área de su tallo era igual al del maíz. El número de tallos secundarios fue mayor en el teosinte (Tabla 2). Los parámetros evaluados indican que los híbridos, más altos, con tallos más gruesos y más frondosos que el parental teosinte, podrían verse favorecidos y tener un mayor nivel de competencia con el cultivo, si bien probablemente el menor número de tallos secundarios influiría en su producción de semilla en relación con el teosinte.

En relación a la etapa reproductiva, las plantas se comportaron de forma similar en los dos años

estudiados (Figura 1). La aparición de inflorescencias masculinas en el teosinte, tuvo lugar a principios y mediados de agosto y las femeninas a finales de ese mismo mes. Alguna planta floreció en septiembre. En el caso del maíz y los híbridos, la fase reproductiva se inició un mes antes (de mediados a finales de julio).

Cuantificación de toxina Cry1Ab

La concentración de toxina en las plantas de maíz *Bt* fue de $46,8 \pm 10,0$ y $51,4 \pm 2,7$ ng Cry1Ab/mg de hoja fresca en los años 2022 y 2023, respectivamente. En las plantas F_1 varió entre $48,8 \pm 11,3$ y $36,4 \pm 8,8$ ng Cry1Ab/mg de hoja fresca para esos mismos años. El análisis estadístico muestra que la interacción entre los factores año y genotipo es significativa ($F_{1,84} = 16,14$; $P = 0,001$), lo que indica que la relación entre la producción de toxina Cry1Ab en cada genotipo puede depender de las condiciones ambientales en las que se desarrollan la plantas, como ha sido descrito por Trtikova *et al.* (2015). Estas concentraciones de toxina parecen encontrarse dentro de los niveles necesarios para el control de las plagas (Lohn *et al.*, 2021), y en trabajos futuros se realizarán bioensayos para determinar su actividad.

Tabla 2 - Altura, área del tallo, número de hojas y tallos secundarios (media marginal \pm DE), de los parentales e híbridos analizadas una vez por semana durante 6 semanas desde la emergencia durante dos años. Letras diferentes indican diferencias significativas (MLM, Bonferroni, $p < 0,05$)

Generación	Altura (cm)	Área del tallo (cm ²)	Nº hojas	Nº Tallos secundarios
Maíz <i>Bt</i>	62,3 \pm 1,7 a	2,3 \pm 0,1 b	9,2 \pm 0,2 a	0,1 \pm 0,2 a
Teosinte <i>Tz</i>	60,5 \pm 1,6 a	1,7 \pm 0,1 a	9,3 \pm 0,2 a	2,6 \pm 0,2 c
F_1 (<i>Tz</i> x <i>Bt</i>)	79,3 \pm 1,7 b	2,3 \pm 0,1 b	10,4 \pm 0,2 b	1,4 \pm 0,3 b
F (P)	39,69 (<0,00)	12,81 (<0,00)	14,77 (<0,00)	34,49 (<0,00)

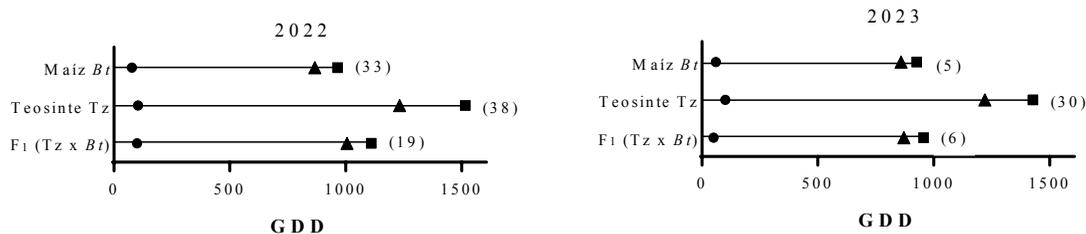


Figura 1 - Grados-día de crecimiento (GDD) hasta VE (●), VT (▲), y R1 en el 50% de las plantas (■) de los parentales e híbridos para cada año. Entre paréntesis se indica el número de plantas evaluadas.

CONCLUSIONES

El teosinte introducido en España hibrida de forma espontánea con el maíz *Bt*. Los híbridos forman semilla viable, que da lugar a plantas que pueden ser más vigorosas que sus parentales. En estos híbridos, se acorta el tiempo necesario hasta alcanzar la fase reproductiva, lo que facilitaría su

cruzamiento con el maíz al favorecerse la sincronía en la floración. Los híbridos producen toxina Cry1Ab en niveles similares al maíz *Bt*. La concentración de toxina varía en función de las condiciones ambientales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson, M.S. & de Vicente, M.C. (2010) - *Gene flow between crops and their wild relatives*. John Hopkins University Press, Baltimore, 585 pp.
- Areal, F.J. & Riesgo, L. (2022) - *Sustainability of Bt maize in Spain (1998-2021): an economic, social and environmental analysis*. Fundación Antama, Madrid, Spain.
- Arias-Martín, M.; Escorial, M.C.; Farinós, G.P.; Ortego, F.; Arranz, N.; García, M. & Loureiro, I. (2022) - Cuantificación de la toxina insecticida Cry1Ab en híbridos y generaciones derivadas del cruzamiento entre maíz *Bt* y los teosintes *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis*. In: *XII Congreso Nacional de Entomología Aplicada*. Málaga, España, p. 141.
- Arias-Martín, M.; Escorial, M.C. & Loureiro, I. (2019) - Cruzabilidad entre maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis*) y caracterización morfológica de los híbridos obtenidos. In: *XVII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*. Vigo, España, p. 396-401.
- Díaz, A.; Taberner, A. & Vilaplana, L. (2020) - The emergence of a new weed in maize plantations: characterization and genetic structure using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 67, p. 225-239. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00828-z>
- Ellstrand, N.C.; Gaener, L.C.; Hegde, S.; Guadagnuolo, R. & Blancas, L. (2007) - Spontaneous hybridization between maize and teosinte. *Journal of Heredity*, vol. 98, n. 2, p. 183-187. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm002>
- Lohn, A.F.; Trtikova, M.; Chapela, I.; Binimelis, R. & Hilbeck, A. (2021) - Transgene behavior in genetically modified teosinte hybrid plants: transcriptome expression, insecticidal protein production and bioactivity against a target insect pest. *Environmental Sciences Europe*, vol. 33, art. 67. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00506-x>
- MAGRAMA (2023) - *Estimación superficie cultivada de maíz MON 810 por provincias*. [cit. 2023.12.12] https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/omg/registro-publico-omg/superficie_cultivada.aspx
- Pardo, G.; Cirujeda, A. & Betrán, E. (2014) - El teosinte (*Zea mays*, spp.). *Informaciones técnicas gobierno de Aragón*. Centro de Sanidad y Certificación Vegetal.
- Trtikova, M.; Lohn, A.; Binimelis, R.; Chapela, I.; Oehen, B.; Zemp, N.; Widmer, A. & Hilbeck, A. (2017) - Teosinte in Europe - searching for the origin of a novel weed. *Scientific Reports*, vol. 7, art. 1560. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01478-w>
- Trtikova, M.; Wikmark, O.G.; Zemp, N.; Widmer, A. & Hilbeck, A. (2015) - Transgene expression and *Bt* protein content in transgenic *Bt* maize (MON 810) under optimal and stressful environmental conditions. *PLoS ONE*, vol. 10, n. 4, art. e0123011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123011>