

Cruzabilidad entre maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis*) y caracterización morfológica de los híbridos obtenidos

ARIAS-MARTIN M, ESCORIAL MC, CHUECA MC, LOUREIRO I

Dpto. Protección Vegetal. INIA. Ctra. La Coruña Km. 7,5 28040 Madrid, ESPAÑA.

arias.maria@inia.es, escorial@inia.es, chueca@inia.es, loureiro@inia.es

Resumen: Teosinte es un conjunto de especies y subespecies del género *Zea*, entre las que se encuentra el ancestro silvestre del maíz (*Zea mays* L.). En España se tuvo la primera constancia de su presencia en 2014, como mala hierba en campos de maíz de Aragón y Cataluña. El origen común entre maíz y teosinte hace posible su cruzamiento de forma espontánea. El objetivo del estudio fue determinar la capacidad de hibridación entre el maíz y dos teosintes, *Zea mays* ssp. *mexicana* L. (Schrad) Iltis y *Zea mays* ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley, y caracterizar morfológicamente los híbridos obtenidos. Para ello, se llevaron a cabo cruzamientos de floración libre entre teosinte como parental femenino y maíz como masculino en condiciones ambientales no controladas. En los cruces con dos muestras de *Z. m.* spp. *mexicana* se obtuvieron porcentajes de hibridación de 1,6% y 13,3%. Con *Z. m.* spp. *parviglumis* se observó una marcada asincronía temporal en la fase reproductiva con el maíz, lo que sólo permitió el cruce de una pareja de plantas, obteniéndose un porcentaje de hibridación del 6,7%. Los híbridos de *Z. m.* spp. *mexicana* y maíz fueron fértiles y tuvieron una morfología intermedia entre ambos parentales.

Palabras clave: hibridación, maíz, teosinte, *Bt*, F₁, riesgo medioambiental

1. Introducción

El teosinte es el nombre común con el que se conoce a un conjunto de especies y subespecies del género *Zea*, entre las que se encuentra el ancestro silvestre del maíz (*Zea mays* L.). Su centro de origen se encuentra en México y Mesoamérica, aunque también se ha localizado como planta exótica invasora en regiones de África, Asia oriental y tropical, Australia y sur de EE.UU. En la unión Europea (UE), se ha citado su presencia en Francia y España (EFSA, 2016). En España se tuvo la primera constancia en 2014, localizándose como mala hierba en campos de maíz de Aragón y, en menor medida, en Cataluña (Pardo *et al.*, 2014). Esta mala hierba llega a ocasionar una reducción del 28% de la cosecha de maíz, por lo que se han puesto en marcha diferentes medidas de control para contener su avance (Pardo *et al.*, 2016). El parentesco entre el maíz y el teosinte dificulta su identificación en los campos de maíz, así como su control con métodos

químicos, ya que no existen en la actualidad herbicidas selectivos. Esta semejanza hace además posible que maíz y teosinte puedan hibridar de forma espontánea (Wilkes, 1977) dificultando aún más su detección.

Por otro lado, España es el país de la UE con mayor superficie cultivada de maíz genéticamente modificado (GM), maíz que expresa la toxina Cry1Ab resistente a insectos (maíz *Bt*), concentrándose ese cultivo en la zona del Valle del Ebro (MAGRAMA, 2019). En la evaluación de riesgo medioambiental del cultivo de maíz GM en la UE no había sido considerado el riesgo de flujo de genes del maíz GM a otras plantas al no existir en la UE parientes silvestres relacionados con el maíz. Sin embargo, la detección de teosinte en esas regiones y la posibilidad de hibridación entre el maíz y el teosinte puede plantear la necesidad de revisar esta evaluación. *Zea mays* ssp. *mexicana* L. (Schrad.) Iltis y *Zea mays* ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley son las especies que están más estrechamente relacionadas con el maíz (Doebley, 2004). En un estudio reciente, Tritkova *et al.* (2017) describen que el teosinte encontrado en España no se agrupa en ninguno de los taxones reconocidos y podría ser de origen mixto, con *Z. m.* ssp. *mexicana* como taxón parental y una variedad de maíz cultivado no identificado.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de hibridación entre maíz y estas dos especies de teosinte, y realizar la caracterización morfológica de híbridos previamente obtenidos entre *Z. m.* ssp. *mexicana* y el maíz.

2. Material y Métodos

2.1. Material vegetal. Para la realización del estudio se utilizó la variedad de maíz (*Z. mays*.) DKC6451YG, que expresa la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* (maíz *Bt*, evento MON810). Este maíz es heterocigótico para el transgen que confiere resistencia a determinados insectos plaga del maíz. El material de teosinte utilizado fueron varias entradas procedentes del banco de germoplasma del USDA: Ames 21860 y Ames 21851 de *Z. m.* ssp. *mexicana*, que se denominaron Tm4 y Tm5, respectivamente, y Ames 21785 de *Z. m.* ssp. *parviglumis*, denominada Tp1.

2.2. Realización de cruzamientos teosinte ♀ x maíz ♂. En los meses de marzo y abril de 2018 se sembraron plantas de *Z. m.* ssp. *mexicana* y *Z. m.* ssp. *parviglumis* en tiestos con una mezcla de tierra:mantillo:arena (1:1:1) fertilizados con NPK (12:6:12, 300 kg ha⁻¹). En el caso del maíz, para asegurar el solapamiento en la época de floración entre maíz y teosinte, se realizaron diferentes siembras seriadas a intervalos de 2 a 3 semanas desde marzo hasta julio. Cuando las plantas de maíz estaban entre V4-V6, todas las plantas se fertilizaron con urea (300 kg ha⁻¹). Los tiestos se regaron con un sistema de riego automático por goteo según la necesidad de las plantas.

En el momento de la floración de *Z. m.* ssp. *mexicana*, se colocaron 5 plantas de teosinte junto a 5 plantas de maíz (1:1) en el interior de un jaulón cerrado con doble visillo para su polinización libre en condiciones de competencia de polen. Puesto que la floración del teosinte es más duradera que la del maíz, una vez finalizada la producción de polen

de las plantas de maíz, éstas se retiraron y se introdujeron 5 nuevas plantas para prolongar la disponibilidad de polen. Los granos formados permanecieron en las plantas madre de *Z. m. ssp. mexicana* hasta su maduración y recolección. Los cruzamientos se realizaron dentro de jaulones situados en el exterior de las instalaciones del INIA (40° 27' N; 3° 45' O) en condiciones ambientales no controladas. *Zea m. ssp. parviglumis* comenzó su floración en octubre de 2018 cuando el polen de la última siembra de maíz estaba prácticamente finalizado y sólo se consiguió solapar la floración de una planta de teosinte con una planta maíz. Debido a la gran diferencia de altura entre el tallo principal de *Z. m. ssp. parviglumis* (3,5 m aprox.) y el maíz (1,8 m aprox.), se seleccionó en la planta de teosinte un tallo similar en altura a la planta de maíz y se eliminó el resto de tallos para posibilitar el cruzamiento. El cruzamiento se realizó en el interior de un invernadero, pero sin control de las condiciones ambientales. Los granos formados permanecieron en las plantas madre de *Z. m. ssp. parviglumis* hasta su maduración y recolección.

2.3. Identificación de los híbridos. Un mínimo del 20% de las semillas recogidas de cada planta madre de teosinte se desinfectaron con una mezcla de lejía y detergente (Domestos®) al 7% durante 10 minutos y se aclararon tres veces con agua. Las semillas se sembraron en una mezcla al 50% de tierra:mantillo:arena (1:1:1) y vermiculita, anotándose la germinación. La identificación de las plantas F₁ híbridas entre las dos especies de teosinte y maíz se realizó mediante el análisis de la presencia de toxina Cry1Ab por ELISA (AgraStrip® Cry1Ab Seed and Leaf) cuando las plantas se encontraban el estado de 3-4 hojas.

2.4. Fenología de los híbridos *Z. m. ssp. mexicana* x maíz. Se estudió la fenología de 5 plantas híbridas obtenidas en los cruzamientos realizados en 2017 entre *Z. m. ssp. mexicana* Tm4 como parental femenino y maíz *Bt* como parental masculino (Escorial *et al.*, 2019). En el momento de la floración, las plantas se aislaron de forma individual para evaluar su fertilidad por autofecundación. Cuando alcanzaron la madurez, se midió la altura de las plantas y el número de tallos, de inflorescencias femeninas y de semillas. Estos parámetros también se registraron para 10 plantas del parental teosinte.

3. Resultados y Discusión

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos para el cruzamiento entre las dos muestras de *Z. m. ssp. mexicana* y maíz. En el caso de Tm4, se recogieron un total de 272 semillas en las 5 plantas de teosinte, mientras que para Tm5 se recogieron 979 semillas. El porcentaje de germinación de las semillas fue similar en ambos casos, entre el 21-25%. Se obtuvieron un total de 9 plantas híbridas con Tm4 y 2 para Tm5, lo que corresponde a unos porcentajes estimados de hibridación del 13,3% y 1,6%, respectivamente. En el caso del cruzamiento con Tm4, esta tasa de hibridación es mayor que la obtenida por Ellstrand *et al.* (2007), que indica que la hibridación espontánea entre teosinte mexicana y maíz está por debajo del 1%. Además, esta tasa obtenida con Tm4 es similar a los valores obtenidos en ensayos realizados en 2017 (19,2%) (Escorial *et al.*, 2019).

Tabla 1. Hibridación entre *Z. m. ssp. mexicana* y maíz. Se indica el número de semillas recogidas por planta, porcentaje de germinación y porcentaje de hibridación estimada.

<i>Z. m. ssp. mexicana</i>	N° Semillas por planta (media ± DE)	Germinación ¹ (%)	N° híbridos detectados (estimados) ²	Hibridación estimada (%)
Tm 4	272 (54,4 ± 22,3)	25,2	9 (18)	13,3
Tm 5	979 (195,8 ± 10,6)	21,3	2 (4)	1,6

¹ Para Tm4 se analizaron 135 semillas y para Tm5 244 semillas.

² La identificación de híbridos se realizó mediante detección de la proteína Cry1Ab por ELISA. El porcentaje de híbridos obtenidos se multiplicó por dos debido a que el parental de maíz era heterocigótico para el carácter dominante de producción de toxina Cry1Ab.

En el caso del cruzamiento entre *Z. m. ssp. parviglumis* x *Z. mays*, se obtuvieron 30 semillas, de las que sólo germinaron dos. El porcentaje de hibridación estimado para esta especie fue del 6,7%. Este porcentaje es menor que el encontrado en el estudio de Ellstrand *et al.* (2007), en el que se obtuvo un porcentaje de hibridación del 50%, y en el que también señalaron las mismas dificultades para conseguir los cruzamientos. Aunque no parecen existir incompatibilidades de hibridación entre las dos especies, el que no solapen en la floración en determinadas condiciones, reduciría la posibilidad de cruzamientos espontáneos. Puesto que los datos presentados proceden de un único cruzamiento en condiciones diferentes de las naturales de campo, es necesario realizar más ensayos para confirmar o rechazar estos resultados preliminares.

Las plantas híbridas obtenidas de los cruzamientos entre *Z. m. ssp. mexicana* Tm4 y maíz presentaron entre 1 y 4 tallos con una altura media de 127 cm. El número de inflorescencias femeninas producidas fue menor que en el caso del parental silvestre, pero con un mayor número de semillas por planta (Tabla 2, Figura 1).

Tabla 2. Parámetros morfológicos (media ± DE) de plantas de teosinte (*Z. m. ssp. mexicana*) y de plantas F₁ híbridas entre *Z. m. ssp. mexicana* Tm4 y *Z. mays*.

Plantas	Altura (cm)	N° tallos	N° inflorescencias femeninas	N° semillas por planta
<i>Z. m. ssp. mexicana</i>	155 ± 6,4	3,5 ± 0,4	36,9 ± 9,9	47,7 ± 11,1
F₁ Tm4 x maíz	127 ± 6,4	2,0 ± 0,5	9,6 ± 1,2	67,8 ± 19,5

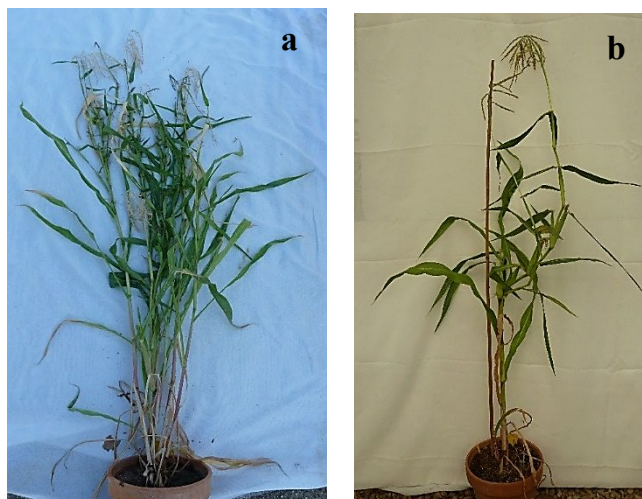


Figura 1. Morfología de las plantas de (a) teosinte (*Z. m. ssp. mexicana*) y (b) F₁ híbrida entre *Z. m. ssp. mexicana* y *Z. mays*.

La semilla F₂ recogida de las plantas híbridas tras su autofecundación fue viable, con un germinación media de $79,5\% \pm 6,3$, similar a la citada por ELLSTRAND *et al.* (2007).

Según los resultados obtenidos, diferentes accesiones de la misma especie de teosinte pueden tener diferente cruzabilidad con el maíz. Esto puede ser debido a diversos factores entre los que se pueden encontrar variaciones genéticas, condiciones ambientales y/o la sincronización en los periodos de floración entre especies. En la actualidad se están llevando a cabo nuevos ensayos de cruzabilidad que permitirán adquirir más conocimientos sobre la posible hibridación del teosinte-maíz en nuestras condiciones.

Referencias

DOEBLEY J (2004) The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*. **38**, 37-59.

ELLSTRAND NC, GAENER LC, HEGDE S, GUADAGNUOLO R & BLANCAS L (2007) Spontaneous hybridization between maize and teosinte. *Journal of Heredity* **98**,183-187.

ESCORIAL C, CHUECA C & LOUREIRO I (2019) Hybridization between maize (*Zea mays*) and teosinte *Z. mays ssp. mexicana* and *Z. mays ssp. parviglumis*. 15th International Society for Biosafety Research, Tarragona, España.

EFSA, European Food Safety Authority (2016) Technical Report; Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. EFSA supporting publication 2016: EN-1094. 13 pp.

MAGRAMA (2019) Estimación superficie cultivada de maíz MON 810 por provincias. En: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/consejo-interministerial-de-ogms/superficie.aspx> (Último acceso: 8 julio 2019).

PARDO G, CIRUJEDA A, BETRÁN E, FERNÁNDEZ-CAVADA S, FUERTES S, RODRÍGUEZ E, PERDIGUER A, AIBAR J & ZARAGOZA C (2014) El teosinte (*Zea mays*, spp.). *Informaciones técnicas*

gobierno de Aragón (Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario, Centro de Sanidad y Certificación Vegetal).

PARDO G, CIRUJEDA A, MARÍ AI, AIBAR J, FUERTES S & TABERNER A (2016) El teosinte: descripción, situación actual en el valle del Ebro y resultados de los primeros ensayos. *Vida Rural* **408**, 42-48.

TRITKOVA 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* **7**, 1560.

WILKES HG (1977) Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and improvement of maize. *Economic Botany* **31**, 254-293.

Crossability between maize (*Zea mays*) and teosinte (*Z. mays* ssp. *mexicana* and *Z. mays* ssp. *parviglumis*) and morphological characterization of the hybrids

Summary: Teosinte is a group of *Zea* species and subspecies, among which is the wild ancestor of maize (*Zea mays* L.). The first evidence of its presence in Spain was reported in 2014, as a weed in maize fields in Aragon and Catalonia. The common origin between maize and teosinte allows their spontaneous hybridization. The aim of this study was to assess the potential hybridization between maize and two teosintes, *Zea mays* ssp. *mexicana* L. (Schrad) Iltis and *Zea mays* ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley, and to characterize the morphology of the obtained hybrids. For this purpose, crosses between teosinte as female parent and maize as male parent have been carried out under non-controlled environmental conditions. Hybridization rates of 1.6% and 13.3% were obtained in the experimental crosses between two different *Z. m.* spp. *mexicana* accessions and maize. In the case of the crosses with *Z. m.* spp. *parviglumis*, a significant asynchrony was observed in the reproductive phases between this species and maize, which only allowed to cross a pair of plants, in which hybrids were obtained at a 6.7% rate. The hybrids between *Z. m.* spp. *mexicana* and maize are fertile and have an intermediate morphology between parents.

Keywords: Hybridization, maize, teosinte, *Bt*, F₁, environmental risk