

Hibridación y fenología de los híbridos obtenidos entre teosinte introducido en España y maíz tolerante a cicloxydim

Hybridization and phenology of hybrids obtained between teosinte introduced in Spain and cycloxydim tolerant maize

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.35123>

Recibido/received: 2024.01.15
Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

El término teosinte se aplica a un grupo de especies y subespecies del género *Zea*, entre las que se encuentra el ancestro silvestre del maíz. En 2014 se notificó su presencia en campos de maíz de Aragón y Cataluña, donde ocasiona reducciones importantes en la cosecha. Se han puesto en marcha diferentes medidas de control para contener su avance, entre ellas la autorización excepcional del cultivo de maíz tolerante al herbicida cicloxydim (inhibidor del enzima acetil CoA carboxilasa) en las zonas infestadas. La relación entre el maíz y el teosinte permite su hibridación y la posibilidad de un flujo de genes del maíz a la planta silvestre. La introgresión de genes de resistencia a herbicidas del maíz a teosinte ha sido recientemente citada en Francia donde está autorizado el cultivo de maíz tolerante a cicloxydim. En este estudio se ha determinado durante dos años la tasa de hibridación entre un cultivar de maíz tolerante a cicloxydim y el teosinte introducido en España y se ha realizado un seguimiento de la fenología vegetativa y reproductiva de híbridos y parentales durante un año. Para ello, se han llevado a cabo cruzamientos de floración libre entre teosinte como parental femenino y maíz como parental masculino en el exterior en condiciones ambientales no controladas. La identificación de los híbridos se realizó mediante pulverización con cicloxydim (200 g. m.a. ha⁻¹). A pesar del solapamiento de la floración entre el teosinte y el maíz, únicamente se obtuvieron híbridos en uno de los años en un porcentaje del 3,4%.

Palabras clave: *Zea mays*, tolerancia a herbicidas, riesgo agrícola, flujo de genes.

ABSTRACT

The term teosinte applies to a group of species and subspecies of the genus *Zea*, including the wild ancestor of maize. In 2014, its presence was reported in corn fields in Aragon and Catalonia, where it can cause significant reductions in the harvest. Different control measures have been put in place to contain its advance, including the exceptional authorization of the cultivation of corn tolerant to the herbicide cycloxydim (acetyl CoA carboxylase enzyme inhibitor) in infested areas. The relationship between maize and teosinte allows hybridization and the possibility of gene flow from maize to the wild plant. Introgression of herbicide resistance genes from maize to teosinte has recently been reported in France where cycloxydim-tolerant maize is authorized for cultivation. In this study, the hybridization rate between a cycloxydim tolerant maize cultivar and teosinte introduced in Spain was determined during three years and the phenology during the vegetative and reproductive phase of hybrids and parents was monitored. For this purpose, free-flowering crosses between teosinte as female parent and maize as male parent were carried out under outside uncontrolled environmental conditions. Hybrid identification was carried out by spraying with cycloxydim (200 g. m.a. ha⁻¹). Despite the flowering overlap between teosinte and maize, hybrids were obtained in only one of the three years at a rate of 3.4%.

Keywords: *Zea mays*, herbicide tolerance, agricultural risk, gene flow.

INTRODUCCIÓN

El teosinte es el nombre común con el que se conoce a un conjunto de especies y subespecies del género *Zea*, cuyo centro de origen se encuentra en México y Mesoamérica. En la UE se ha citado la presencia de teosinte de forma oficial en Francia en 1990, en el norte de la región de Nouvelle Aquitaine (Arvalis, 2013) y en España en 2014, en la zona del Valle del Ebro de Aragón y Cataluña (Pardo *et al.*, 2014). Los análisis genómicos han determinado que el teosinte encontrado en España es de origen mixto *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*, posibles ancestros del maíz cultivado, y una variedad cultivada de maíz no identificada (Díaz *et al.*, 2020). Debido a este parentesco, el maíz y teosinte pueden cruzarse y producir híbridos viables (Anderson & de Vicente, 2010). A través del flujo de genes el teosinte podría adquirir características del cultivo que favorezcan su proliferación y persistencia (Le Corré *et al.*, 2020; Arias-Martín *et al.*, 2022).

En España, la presencia de esta mala hierba en los campos de maíz representa un riesgo agrícola al competir con el cultivo causando importantes pérdidas económicas. En las zonas infestadas se han puesto en marcha diferentes medidas de control para contener su avance, entre ellas la autorización excepcional del cultivo de maíz tolerante al herbicida cicloxidim (inhibidor del enzima acetil CoA carboxilasa), que permitiría el control del teosinte. Sin embargo, a posteriori, se ha visto que es posible la introgresión de genes de resistencia a herbicidas del maíz a teosinte (Le Corré *et al.*, 2020).

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de hibridación entre maíz tolerante a cicloxidim y el teosinte introducido en España y, con los híbridos obtenidos, realizar un seguimiento de la fenología vegetativa y reproductiva con el fin de compararla con la de los parentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron las variedades de maíz Mas 46.CR tolerante al herbicida cicloxidim (inhibidor del enzima acetil CoA carboxilasa), denominada variedad

DUO. Las semillas de teosinte (Tz) que infestaba campos de maíz localizados en Candasnos (Zaragoza, España) fueron proporcionadas por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

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

Durante los años 2021 y 2022 se realizaron cruzamientos por polinización libre en condiciones de competencia de polen para la obtención de híbridos F₁ entre el teosinte y maíz DUO. Las siembras se realizaron el 5 y el 15 de mayo en 2021 y 2022, respectivamente 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 16:8h día/noche). Cuando las plántulas se encontraban en el estado de 2-3 hojas, se realizó una aplicación con cicloxidim a dosis de campo (200 g. m.a. ha⁻¹). Los tratamientos se realizaron con un pulverizador automático (Devries Manufacturing, Hollandale, EEUU) equipado con una boquilla plana Teejet 8002-E calibrado para pulverizar 175 L.ha.⁻¹ a 130 kPa. Tres semanas después del tratamiento se contabilizaron las plantas supervivientes que se identificaron como híbridos F₁. Se calculó la hibridación como la razón entre el nº de híbridos detectados y el nº de semillas germinadas, en porcentaje. Además, 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

Para el seguimiento fenológico de su etapa vegetativa y reproductiva, el 15 de mayo de 2022 se realizaron las siembras de los parentales directamente en macetas ubicadas en el exterior. Los híbridos F₁ se sembraron el 10 de mayo en condiciones controladas para su identificación y 18 días después se

trasplantaron a las macetas definitivas. El cultivo de las plantas se realizó en las condiciones descritas en el apartado anterior. El crecimiento vegetativo (VE) de las mismas 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 los estigmas (R1). La duración de VE, VT y R1 se expresó en grados-día acumulados (GDA). Los grados-día se calcularon con límites de temperatura máxima (T_{máx}) y mínima (T_{mín}) de 30 °C y 10 °C respectivamente, siguiendo la ecuación $GDD_{30,10} = [(T_{mín} + T_{máx})/2] - T_b$, donde la temperatura base (T_b) fue de 10 °C (Tsimba *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Se analizaron los datos para evaluar las diferencias en la altura, área del tallo, nº de hojas y nº de tallos secundarios durante la fase vegetativa entre los parentales y la F1 mediante un Modelo Lineal Multivariante (MLM) con corrección de Bonferroni. El factor fijo fue el genotipo, empleando como covariable los GDA en cada día de muestreo. Las medias marginales son los niveles medios generales predichos por el modelo MLM en cada medición. Se utilizó el software SPSS (IBM®SPSS® Estadística, V29, 2022).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hibridación entre maíz DUO y teosinte

Sólo se consiguieron híbridos en el año 2022 en el cruzamiento entre el teosinte como parental

femenino y el maíz DUO como masculino, con una tasa del $3,4 \pm 7,6$ %, y una hibridación mínima estimada de $1,6 \pm 3,5$ % (Tabla 1). Este resultado coincide con los obtenidos en los experimentos de cruzamientos entre Tz y una variedad de maíz Bt (MON810 resistente a insectos) realizados en idénticas condiciones experimentales, en el que sólo se consiguió éxito en el cruzamiento en el año 2022 de tres evaluados (Arias-Martín *et al.*, 2024).

De las cuatro plantas analizadas del cruzamiento Tz x maíz DUO en 2022, sólo una de ellas se cruzó con el maíz. En esta planta se contabilizaron 102 semillas de las cuales germinaron 47 (46 %). Se identificaron ocho plantas híbridas, lo que corresponde a un porcentaje de hibridación del 17%, siendo la hibridación mínima estimada del 7,8%.

La introgresión de genes de resistencia a herbicidas del maíz a teosinte ha sido recientemente citada en Francia en condiciones de campo (Le Corré *et al.*, 2020), donde está autorizado el cultivo de maíz DUO desde el año 2000. En el año 2021 se documentó que el nivel de casos de plantas de teosinte con resistencia a cicloxídim, y por tanto híbridadas con maíz, detectados en Francia era moderado (5-20 casos) (R4P, 2023).

Fenología de las plantas en la etapa vegetativa

La Tabla 2 muestra los valores (media marginal \pm DE) para los parámetros evaluados. Los híbridos F₁ Tz x DUO presentaron una altura que fue significativamente mayor a la de las plantas de los parentales. En estas plantas F₁ las hojas emergieron antes, lo que dio lugar a un número de hojas significativamente mayor. En relación a la sección del tallo, las plantas F₁ tuvieron un área del tallo

Tabla 1 - Hibridación entre maíz DUO y teosinte introducido en España. El valor de hibridación (media \pm DE) se calcula en relación a las semillas germinadas. La hibridación mínima estimada (media \pm DE) se calcula en relación a las semillas analizadas

Año	Plantas analizadas (Nº)	Total semillas (semillas/ /planta)	Semillas analizadas	Germinación (%)	Nº híbridos detectados	Plantas con híbridos (%)	Hibridación mínima estimada (%)	Hibridación (%)
2021	5	861 (172,2 \pm 171)	400	59,8	0	0	0	0
2022	4	527 (105,4 \pm 74)	527	37,2	8	20	1,6 \pm 3,5	3,4 \pm 7,6
Total	9						0,8 \pm 1,1	1,7 \pm 2,4

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 seis semanas desde la emergencia. Letras diferentes indican diferencias significativas [(MLM, $F(P < 0.05)$)]

Generación	Altura (cm)	Área del tallo (cm ²)	Nº hojas	Nº tallos secundarios
Maíz DUO	53,47 \pm 1,3 a	2,1 \pm 0,1 b	8,6 \pm 0,1 a	0 a
Teosinte Tz	53,8 \pm 1,3 a	1,5 \pm 0,1 a	8,1 \pm 0,1 a	2,4 \pm 0,2 c
F ₁ (Tz x DUO)	73,6 \pm 1,3 b	2,0 \pm 0,1 b	11,2 \pm 0,1 b	0,8 \pm 0,2 b
F (P)	83,3 (<0,00)	10,93 (<0,00)	161,47 (<0,00)	28,15 (<0,00)

igual al del maíz y significativamente mayor que el de las plantas de teosinte. En cuanto a los tallos secundarios, las plantas de teosinte fueron aquellas que presentaron el mayor número, seguidos de los híbridos y por último la variedad de maíz, que no los presentó (Tabla 2).

Evolución temporal de las fases reproductivas

Las plantas híbridas necesitaron unos GDD similares a los del maíz DUO, para la aparición de inflorescencias masculinas y femeninas, lo que corresponde a que las plantas F₁ llegaron a sus fases reproductivas alrededor de 10 días después que las del maíz. Sin embargo el parental silvestre necesitó un mayor número de GDA para completar las

fases reproductivas: 1232 GDA para alcanzar VT y 1516 GDA en el caso de R1, lo que en términos de días supuso un mínimo de un mes más. Las sedas o estigmas aparecieron a finales de agosto, mientras que el maíz DUO entró en antesis a finales de julio junto con las plantas híbridas (Figura 1). En una única generación el ciclo reproductivo de las plantas F1 se aproxima a la del maíz. Esto podría favorecer el cruzamiento de las plantas con fondo genético teosinte con el cultivo en condiciones de campo.

CONCLUSIONES

El teosinte introducido en España es capaz de hibridar con la variedad de maíz DUO resistente al herbicida cicloxidim. El porcentaje medio de los dos años estudiados para la hibridación de ambos genotipos fue del 1,7% (0 % - 3,4 %). Los híbridos obtenidos sobrevivieron a una aplicación de herbicida a la dosis empleada en condiciones de campo. Además, las plantas híbridas eran más altas y con un mayor número de hojas que ambos parentales, características que podrían favorecer su persistencia. El ciclo reproductivo de las plantas híbridas se acorta en relación al de las plantas de teosinte y se aproxima al del maíz, lo que podría favorecer su retrocruzamiento, dando lugar a plantas más parecidas al maíz.

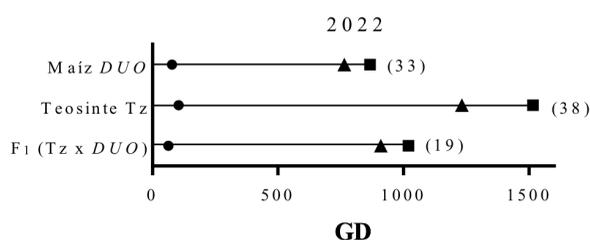


Figura 1 - Grados-día de crecimiento (GD) hasta VE (●), VT en el 50% de las plantas (▲), y R1 en el 50% de las plantas (■) de los parentales e híbridos. Entre paréntesis se indica el número de plantas evaluadas.

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.
- 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.
- Arias-Martín, M.; Escorial, M.C. & Loureiro, I. (2022) - Hibridación entre maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) y los teosintes *Z. m.* ssp. *mexicana* y *Z. m.* ssp. *parviglumis*. In: *XVIII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*, Mérida, España, p. 327-332.
- Arias-Martín, M.; Escorial, M.C. & Loureiro, I. (2024) - Teosinte introducido en España y maíz *Bt*: tasa de hibridación, fenología y cuantificación de toxina Cry1Ab en los híbridos. In: *XIX Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*, Beja, Portugal. <https://doi.org/10.19084/rca.35040>
- Arvalis (2013) - *Téosite: une adventice qui demande une vigilance toute particulière*. 13/14 Service Communication Marketing Arvalis (Institut du vegetal). 4p.
- 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 & Crop Evolution*, vol. 67, p. 225-239. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00828-z>
- Le Corré, V.; Siol, M.; Vigouroux, Y.; Tenaillon, M.I. & Delye, C. (2020). Adaptive introgression from maize has facilitated the establishment of teosinte as a noxious weed in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 117, n. 41, p. 25618-25627. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006633117>
- Pardo, G.; Cirujeda, A. & Betrán, E. (2014) - *El teosinte (Zea mays, spp.)*. Informaciones técnicas, gobierno de Aragón (Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario, Centro de Sanidad y Certificación Vegetal).
- R4P (2023) - *Maps of the published cases of resistance to herbicides in France*. Recherche sur la Résistance aux Pesticides. [cit. 2023.12.12]. <https://www.r4p-inra.fr/wp-content/uploads/2023/07/MapsResistantWeedsJune23.pdf>
- Tsimba, R.; Edmeades, G.O.; Millner, J.P. & Kemp, P.D. (2013) - The effect of planting date on maize: phenology: thermal time durations and growth rates in a cool temperature climate. *Field Crops Research*, vol. 150, p. 145-155. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.05.021>