

COEXISTENCIA ENTRE MAÍZ CONVENCIONAL Y TRANSGÉNICO: INFLUENCIA DE LA FECHA DE SIEMBRA EN LA COINCIDENCIA DE LA FLORACIÓN



Plantas de maíz durante la floración femenina. Foto: IRTA.



Seguimiento de la floración en una parcela de maíz. Foto: IRTA.

01 Introducción

La autorización de cultivos transgénicos de maíz en la Unión Europea ha propiciado la aparición del concepto de coexistencia definido como el derecho que tienen los agricultores de poder escoger entre la producción de cultivos convencionales, ecológicos o modificados genéticamente (transgénicos), siempre que cumplan las obligaciones legales que marca la normativa europea.

Por otra parte, el reglamento sobre etiquetado (1830/2003) establece el umbral del 0,9% de contenido de transgénicos por encima del que los productos se habrán de etiquetar como tales. De acuerdo con este reglamento, la presencia accidental de OGM (organismos genéticamente modificados) por encima del umbral del 0,9% en un cultivo inicialmente no transgénico, determinaría que este cultivo se etiquetara como transgénico, hecho que en algún caso, podría perjudicar económicamente al agricultor. Por lo tanto, de acuerdo con la Unión Europea, hay que establecer una serie de normas que ayuden a disminuir al máximo la mezcla entre los OGM y los convencionales o ecológicos.

La presencia accidental de material transgénico puede venir determinada por varios factores,

como por ejemplo la pureza de la semilla, la polinización cruzada, la presencia de rebrotes y finalmente las posibles mezclas durante la cosecha y la postcosecha. Así, la polinización cruzada es la que despierta más preocupación, porque en condiciones de campo es difícil controlarla.

El maíz se fecunda mayoritariamente por polinización cruzada, y el viento favorece que el polen de una planta fecunde las plantas de alrededor. Como esta característica es propia de la especie, el maíz transgénico no tiene por qué ser una excepción. Asimismo, el denominado flujo de genes, es decir la dispersión de los transgenes (genes introducidos en la planta transgénica) mediante el polen puede tener una cierta influencia a la hora de aplicar las normativas sobre trazabilidad y etiquetado. Así, el grado de polinización cruzada entre un campo transgénico y un campo no transgénico podría determinar si el producto final se debe etiquetar como transgénico o no.

Desde el año 2003 el IRTA ha realizado una serie de ensayos orientados a cuantificar el flujo de genes, a establecer las distancias de seguridad necesarias para minimizarlo y sobre todo a tener datos cuantitativos fiables que sirvan de base de la normativa que se debe establecer en nuestro país, para asegurar la coexistencia entre cultivos transgénicos, convencionales y

ecológicos (Melé y col., 2006). En estos ensayos se ha demostrado que una distancia de seguridad de unos 20-25 m es suficiente para mantener la presencia accidental de los OGM en un campo convencional vecino por debajo del umbral del 0,9%. El estudio realizado en condiciones reales de coexistencia en dos zonas de Cataluña donde habitualmente se cultiva maíz transgénico, confirmó este resultado (Messeguer y col., 2006). Por otra parte, también se ha demostrado que una barrera de unos cuantos surcos de maíz (zona tampón) es más eficaz que una distancia equivalente sin nada cultivado. Hace falta destacar que los



El objetivo del ensayo fue determinar hasta qué punto las diferencias en las fechas de siembra pueden ser efectivas de cara a minimizar el flujo de genes entre el trigo de maíz convencional y trigo de maíz Bt



Figura 2. A la izquierda, aspecto del campo de ensayo el 25 de mayo poco después del nacimiento de la última siembra. A la derecha, vista del campo el 2 de julio. Los bordes de separación y la primera siembra de blanco ya en floración.

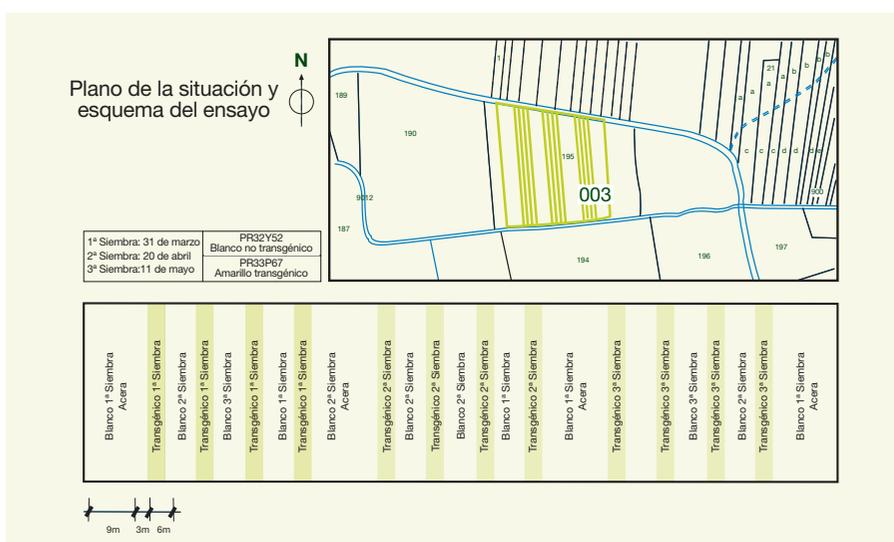


Figura 1. Datos básicos del ensayo: Plano de situación, fechas de siembra, variedades y esquema de plantación.

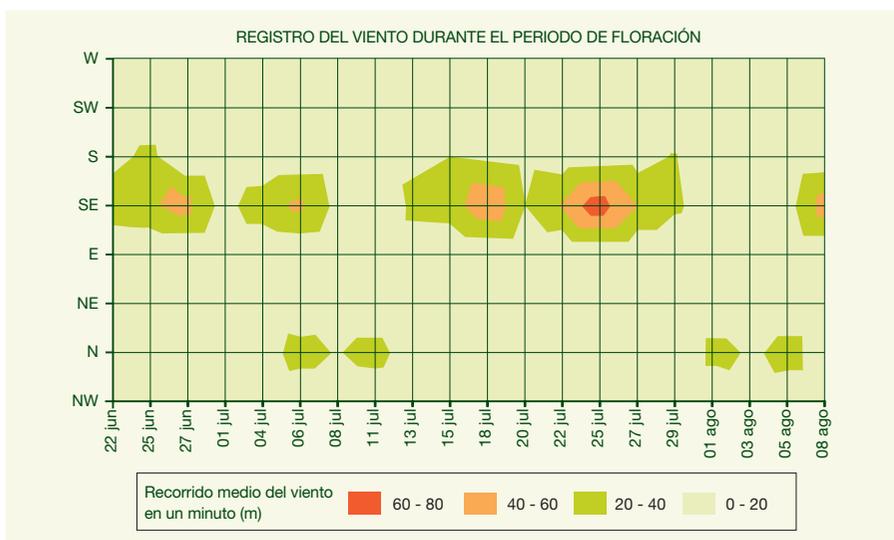


Figura 3. Recorrido medio del viento (Wind Run) expresado en metros y minutos. Esta medida tiene en cuenta la velocidad media del viento y la frecuencia en cada dirección.

resultados obtenidos en los ensayos realizados en otros países de la Unión Europea y de América coinciden plenamente con los que se han obtenido aquí (Brookes y col., 2006 y referencias citadas; Devos y col., 2006).

Todos estos ensayos se planifican de forma que las variedades transgénicas y convencionales florezcan al mismo tiempo para detectar el máximo nivel de flujo de genes que se podría producir. Ahora bien, dado que en determinadas zonas de nuestro país es posible hacer siembras muy tempranas o muy tardías, habría que averiguar si la polinización cruzada y consecuentemente el flujo de genes se podía controlar mejor disminuyendo tanto como fuera posible la coincidencia en la floración.

02 Diseño del ensayo

Durante la campaña 2005 se diseñó un ensayo combinando tres fechas de siembra de maíz de grano amarillo transgénico (variedad PR32P76) con 3 fechas de siembra de maíz de grano blanco no transgénico (variedad PR32Y52). El ensayo se hizo en la zona de Foixà (Baix Empordà) y lo financiaron el IRTA y el DARP.

El campo de 126 m de largo por 100 m de ancho se dividió en tres partes iguales para tener tres réplicas, separadas una de la otra por una calle de 9 m sembrada con el maíz de grano blanco (Figura 1). En cada una de estas réplicas, se sembraron cuatro parcelas de 3x100 m de la variedad de grano amarillo PR32P76 a (4 líneas) que se consideraron como donadoras de polen, separadas entre ellas por tres parcelas de 6x100 m (8 líneas) de maíz blanco

PR32Y52, que se consideraron como receptoras de polen. Las variedades, las dos de ciclo 700, se sembraron en tres fechas: 31 de marzo (siembra temprana), 20 de abril (siembra media) y 11 de mayo (siembra tardía). El ensayo se orientó de tal manera que el viento dominante de la zona favoreciera al máximo la polinización cruzada.

Dado que las variedades de maíz convencional que habitualmente se siembran en la zona son de grano amarillo, durante los primeros estados de crecimiento se revisó el campo para eliminar las posibles plantas que pudieran crecer fruto de restos de mazorcas de la cosecha del año anterior (rebrotos), con tal de evitar falsos positivos en la evaluación del flujo (Figura 2).

La velocidad y dirección del viento así como la pluviometría durante la época de floración se registraron en la estación meteorológica instalada en el extremo del campo.

Las fechas de floración se obtuvieron por observación directa y por la evaluación de 40 plantas individuales de cada uno de los tratamientos del ensayo sobre las cuales se determinó con precisión el inicio y el final de la floración masculina y la femenina.

La preparación del terreno, las siembras y la conducción general de la plantación se llevó a cabo siguiendo las buenas prácticas culturales establecidas en la zona con la colaboración del propietario del campo y la supervisión del personal del IRTA.

Al final del ensayo, y para facilitar la tarea de la recogida de muestras antes de la cosecha se hicieron dos pases transversales con la cosechadora para abrir dos caminos, de forma que de cada tratamiento se pudieran tomar mues-

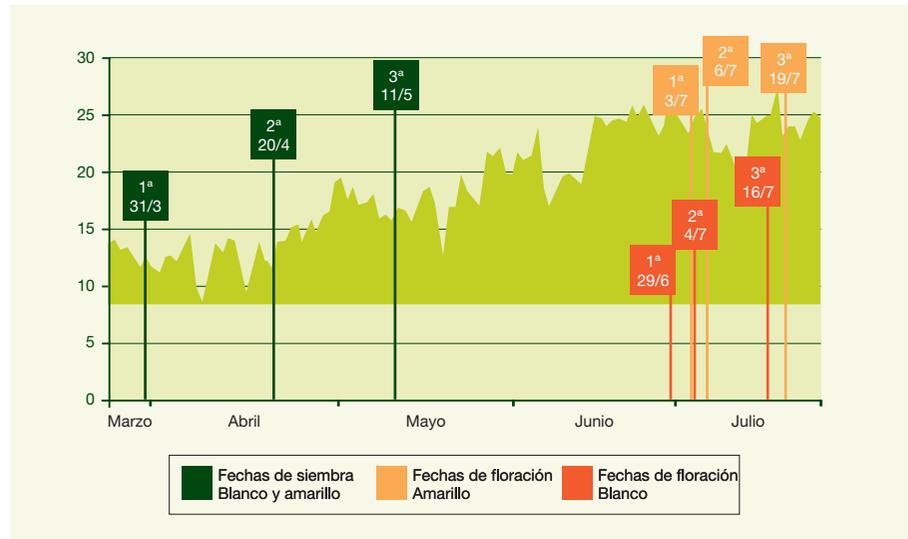


Figura 4. Representación gráfica de las fechas más representativas del cultivo superpuestas en la evolución de las temperaturas medias. El área en amarillo estima el valor de la integral térmica sobre la base de 8 °C.

tras de cuatro lugares en el interior del campo (a derecha e izquierda de cada uno de los caminos abiertos). Se tomaron en cada lugar tres mazorcas de cada uno de los 8 riegos de cada tratamiento (96 mazorcas por tratamiento).

Las muestras se analizaron siguiendo dos metodologías: en el método fenotípico, en cada mazorca se hizo un recuento de los granos amarillos sobre el total de granos blancos. Teniendo en cuenta que los caracteres blanco y amarillo son homocigotos y que el amarillo es dominante sobre el blanco, el número de granos amarillos/granos blancos nos da la proporción de polinización cruzada que ha habido. Y, teniendo en cuenta que el carácter de resistencia al barrenador en las plantas transgénicas está en hemicigosis, solamente la mitad del polen será transgénico, y de aquí se desprende que el número granos amarillos/granos blancos dividido por dos será la propor-

ción de granos transgénicos encontrados; en el método molecular, se usó la técnica estándar de la PCR cuantitativa (RT-PCR) para evaluar el porcentaje de ADN transgénico en relación al ADN total.

03 Resultados

En todas las siembras hubo un buen nacimiento y las plantas se desarrollaron normalmente (Figura 2).

En el diseño del ensayo se tuvo en cuenta la dirección de los vientos dominantes de la zona (brisa del mar), de forma que la distribución de las parcelas se hizo procurando que el flujo de grano quedará favorecido al máximo. El registro de los vientos que se muestra en la Figura 3 confirmó para estos días la persistencia de los vientos del SE y la presencia ocasional de vientos de tramontana durante la floración.

Jornada de puertas abiertas, visión general de uno de los pasillos que se abrieron para poder recoger las muestras. Foto: IRTA.





Conseguir separar las floraciones diez días es una buena estrategia para el control del flujo genético

Mazorcas de maíz blanco donde se ven los granos amarillos, fruto de la polinización cruzada con el maíz Bt. Foto: IRTA.



Pese a las diferencias claras en las épocas de siembra espaciadas cada tres semanas, las diferencias entre las fechas de floración de los tratamientos ensayados fueron mucho menores. En la Figura 4 se ha representado la evolución de las temperaturas medias durante el periodo desde la primera siembra hasta la última floración.

El área amarilla representa la integral térmica (sobre una base de 8°C) que explica satisfactoriamente el reagrupamiento de las fechas de floración especialmente entre la primera y segunda siembra tanto en el maíz blanco como en el transgénico. El calor acumulado las tres primeras semanas de abril por las plantas de la primera siembra es poco y se traduce al final en un adelantamiento de la floración de sólo tres o cuatro días respecto a la segunda siembra.

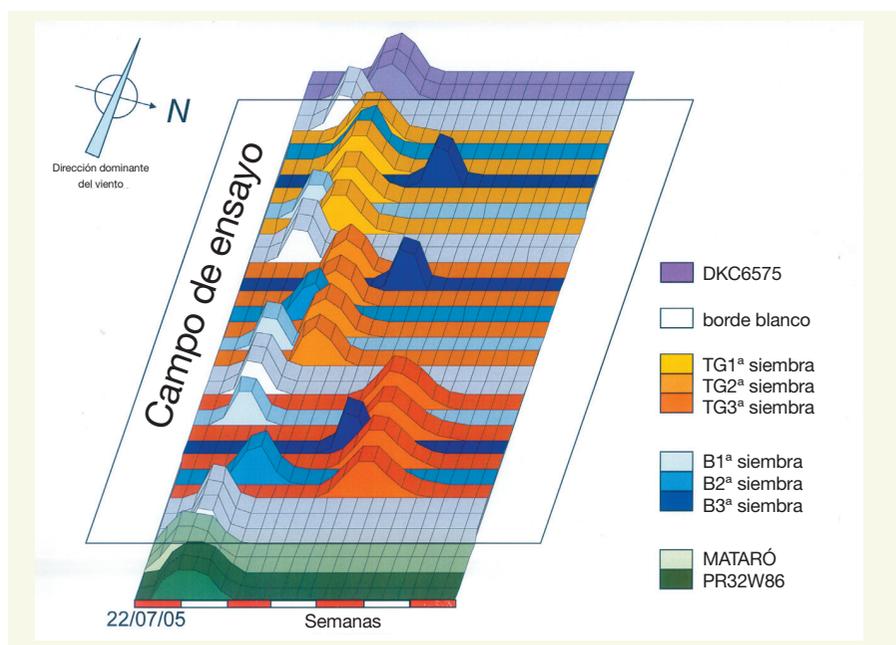


Figura 5. Diagrama de la evolución de las floraciones representadas según la distribución de las parcelas del campo de ensayo para poder visualizar mejor las coincidencias entre tratamientos.

Tabla 1. Recuento total del porcentaje de granos amarillos detallado por tratamiento (media \pm error estándar). Se contabilizaron 96 mazorcas por tratamiento: Se detalla también los días de separación entre el inicio de las floraciones

NO TRANSGÉNICO	TRANSGÉNICO	FLORACIÓN	INTERVALO	N OBS.	% GRANOS AMARILLOS
BLANCO 1ª SIEMBRA FLORACIÓN 29/6	Amarillo 1ª siembra	3/7	4	96	11,73 \pm 1,02
	Amarillo 2ª siembra	6/7	7	96	2,96 \pm 0,31
	Amarillo 3ª siembra	19/7	20	96	3,36 \pm 0,38
BLANCO 2ª SIEMBRA FLORACIÓN 4/7	Amarillo 1ª siembra	3/7	1	96	33,64 \pm 2,22
	Amarillo 2ª siembra	6/7	2	96	10,105 \pm 0,93
	Amarillo 3ª siembra	19/7	15	96	3,58 \pm 0,39
BLANCO 3ª SIEMBRA FLORACIÓN 16/7	Amarillo 1ª siembra	3/7	13	96	0,42 \pm 0,11
	Amarillo 2ª siembra	6/7	10	96	3,74 \pm 0,71
	Amarillo 3ª siembra	19/7	3	96	9,76 \pm 1,53

La fecha de floración corresponde al momento en que el 50% de las plantas entra en floración. Como se puede observar claramente en la Figura 4, la variedad transgénica amarilla PR32P76 floreció algo más tarde que la variedad blanca PR32Y52, pero el diseño correcto del ensayo ha permitido igualmente estudiar todos los casos, tanto de máxima coincidencia (2ª del blanco con la 1ª del transgénico amarillo) como otras posibilidades intermedias hasta la separación total entre la 1ª del blanco con la 3ª del amarillo).

En la Figura 5 se ha representado el desarrollo del ensayo durante los días de la polinización. En el eje horizontal está representado el tiempo en semanas a partir del día 22 de julio. Conservando la misma situación en la que estaban plantadas en el campo de ensayo, se ha representado en vertical el porcentaje de plantas en

floración activa. Se ha considerado la floración masculina para los campos transgénicos donadores de polen y la floración femenina para los campos de maíz blanco sobre los cuales se debía medir el flujo genético. Se han representado también fuera del recuadro del campo de ensayo propiamente dicho las floraciones de los campos vecinos de maíz amarillo no transgénico (Mataró y PR32W86) situados a favor del viento y el transgénico DKC6575 en la dirección contraria del viento dominante.

Se puede ver muy claramente la completa coincidencia entre la floración del blanco de segunda siembra con el transgénico amarillo de primera siembra, y las coincidencias parciales del blanco de 1ª siembra con el transgénico de 1ª, del blanco de 2ª con el transgénico de 2ª y

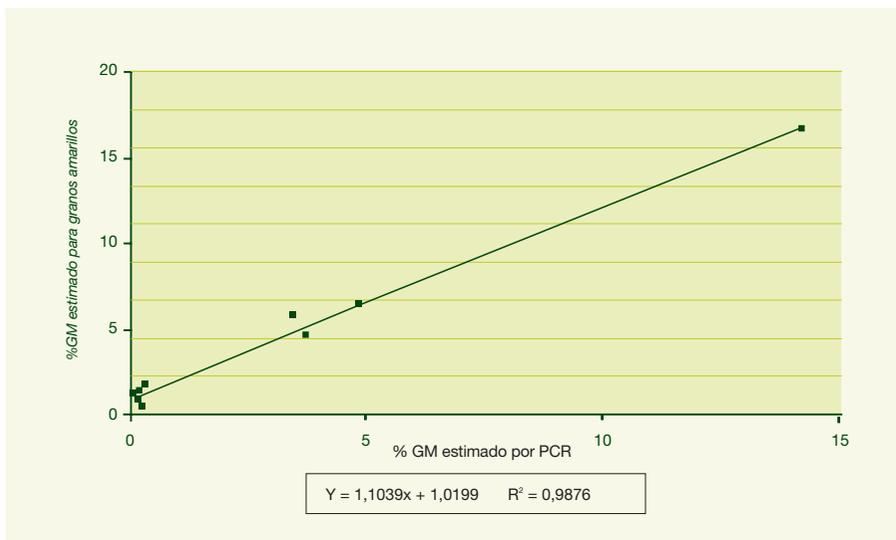


Figura 6. Correlación entre los valores de % de transgénico estimados por RT-PCR o por el recuento de los granos amarillos. Se representa también la recta de regresión de los valores obtenidos contando los mayores sobre los valores de la RT-PCR.

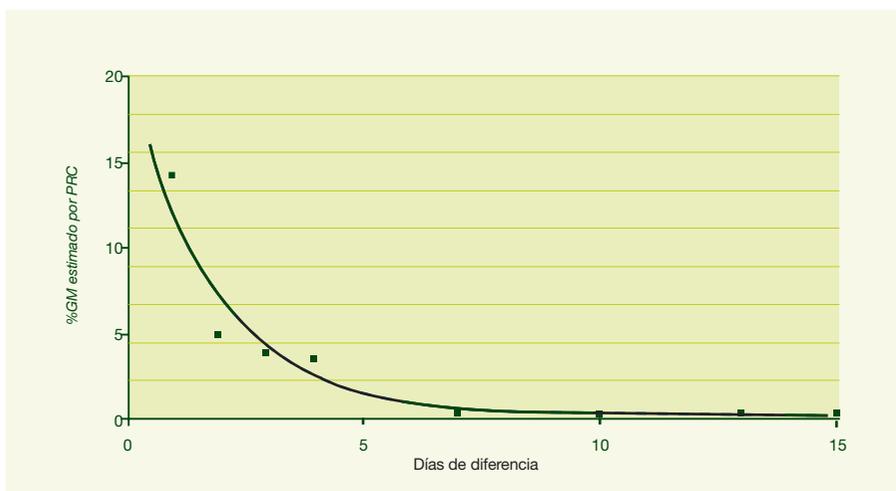


Figura 7. % De GM estimado por RT-PCR en función del intervalo entre las fechas de floración entre transgénico y blanco para cada uno de los tratamientos ensayados.

del blanco de 3ª con el transgénico de 3ª. Hay también unos pequeños solapamientos entre el transgénico de 2ª siembra y las 1ª y 3ª siembras del blanco. En todos los demás casos, el intervalo entre las floraciones fue casi total.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de granos amarillos encontrados en cada uno de los casos analizados. El valor más alto (33%) corresponde al tratamiento de mayor coincidencia en la floración y los valores siguientes (alrededor del 10%) también se corresponden con los tratamientos antes mencionados de coincidencia parcial. También encontramos una buena correlación (valores alrededor del 3%) en los tratamientos de escasa coincidencia. Hay dos casos en los que según las medidas de floración hechas en campo no se debían encontrar granos

amarillos porque las floraciones habían sido muy distantes y en cambio, se encontraron valores del 3%. Estos tratamientos son los de blanco de 1ª y 2ª siembra polinizados por transgénico de 3ª siembra donde se habrían de esperar valores parecidos a los obtenidos en el caso del transgénico de 1ª siembra sobre el blanco de 3ª, que eran sólo del 0,4%.

Observando la situación de los campos adyacentes, especialmente en la dirección favorable del viento, se puede deducir que estas diferencias podrían ser debidas al efecto de la coincidencia de la floración con otras variedades ajenas al ensayo.

Con tal de comprobar esta hipótesis y también para validar los resultados del ensayo se hicie-



El intervalo entre las fechas de siembra puede ser una herramienta útil para regular la coexistencia.

Siembra del ensayo. Foto: IRTA.



ron una serie de análisis por PCR cualitativa y RTPCR para poder determinar la equivalencia entre granos amarillos y contenido en %OGM.

De acuerdo con el planteamiento del ensayo, sólo la mitad de los granos amarillos medidos traerían el gen de resistencia al taladro, puesto que la plantación de transgénico donador de polen es una variedad híbrida. Esta aproximación se hace porque es mucho más sencillo y preciso hacer un recuento visual de los granos que no pasar los costosos análisis moleculares para detectar el contenido real de OGM. Tiene el inconveniente, que contando los granos amarillos no se puede evaluar el porcentaje de polen que proviene de otros campos amarillos que no sean transgénicos. Estas interferencias se habrían podido eliminar con una protección

de maíz blanco mucho mayor que la que se pudo hacer dadas las medidas del ensayo y del presupuesto disponible.

Por estos motivos, se analizaron 8 muestras de cada uno de los tratamientos para saber el contenido real de transgénicos y evaluar el efecto de otras fuentes productoras de polen amarillo no transgénico. El interés mayor, sin embargo, estaba centrado en los valores de los casos antes señalados en que el flujo detectado no concordaba con la coincidencia de floración de las partes implicadas. Los análisis de PCR para el tratamiento blanco de 1ª Transgénico/amarillo de 3ª dieron $0,05 \pm 0,03$ y para el tratamiento blanco de 2ª Transgénico/amarillo de 3ª dieron $0,34 \pm 0,06$ valores muy inferiores a los de 1,5%, que corresponderían a dividir el porcentaje de granos amarillo entre 2. De esta manera se ha podido comprobar la procedencia ajena al ensayo de la mayoría de los granos amarillos de estos tratamientos.

Una colección de muestras representativas del ensayo (uno de los grupos de muestras tomadas a lo largo del camino abierto en medio del campo) se procesaron para hacer el análisis estándar de contenido de OGM y poderlo comparar con los valores obtenidos sobre la misma muestra.

En la Figura 6 se muestra la correlación entre los valores estimados haciendo el recuento de granos amarillos de cada tratamiento y los correspondientes análisis por PCR. Los porcentajes de transgénicos dan valores muy parecidos en ambos casos, puesto que el índice de correlación es muy alto ($R^2 = 0,99$) y la pendiente de la recta muy próxima a la unidad (1,1). Por otra parte, la desviación de la recta en el origen nos da una medida de las interferencias y evidencia también

que parte de los granos amarillos contados no tienen su origen en las parcelas del ensayo.

El efecto del número de días de separación entre floraciones sobre el flujo genético producido se muestra en la Figura 7. Se observa claramente cómo disminuye muy deprisa, de forma que a partir de los 8 días el flujo es ya muy bajo.

Se ha añadido una línea de tendencia, aunque quizás sería más adecuado dividir la gráfica en dos partes bien diferenciadas, es decir, si hay coincidencia o no. En la primera parte, el %OGM es inversamente proporcional a los días de diferencia; y en la segunda, si no hay coincidencia, no hay flujo.

Estos valores concretos son válidos sólo para las dos variedades ensayadas, puesto que la duración de las floraciones puede depender de cada variedad y también de otros factores climáticos o ambientales. Este resultado, sin embargo, es concordante con otros estudios más generales hechos dentro del proyecto SIGMEA, donde se estimó que una distancia de unos 10 días entre las floraciones de campos vecinos era totalmente suficiente para garantizar la coexistencia (Messeguer y col., 2006).

04 Conclusiones

Aunque este ensayo no tenía el objetivo de medir el flujo de genes y dar valores absolutos, se pueden también sacar algunas conclusiones. El diseño del ensayo estaba pensado para favorecer al máximo el efecto del polen transgénico sobre el campo receptor, de forma que los resultados nos dan una idea de lo que pasa en los bordes del campo que está cerca del transgénico pero no de lo que pasaría en el interior del campo.

Sin embargo, estos datos son muy similares a los obtenidos en los bordes de los campos adyacentes en un ensayo hecho el año anterior, igualmente en el Baix Empordà (4 ha maíz transgénico amarillo sobre 24ha de blanco) donde se pudo estimar que si el campo receptor tenía más de 40 m de anchura el efecto total sobre la cosecha estaría ya por debajo del 0,9 % en el peor de los casos (Pla y col., 2006).

Este ensayo de fechas de siembra pone también de manifiesto que es difícil conseguir valores muy altos de flujo genético, puesto que para llegar a valores superiores al 10% (20% de granos amarillos) no sólo hay una coincidencia perfecta de la floración sino que también hay que situar todas las plantas prácticamente al lado de los transgénicos amarillos donadores.

Con respecto a las conclusiones propiamente objeto del ensayo, podemos decir que:

Los resultados de este ensayo confirman que un intervalo de diez días o más entre floraciones es muy eficaz para controlar el flujo de genes. Esto confirma los resultados obtenidos en los ensayos de coexistencia que se han hecho en el marco del proyecto SIGMEA.

El intervalo entre las fechas de siembra puede ser una herramienta útil para regular la coexistencia. El problema, sin embargo, es que estos intervalos entre floraciones no tienen una equivalencia sencilla con las fechas de siembra que las originan.

El tiempo que el maíz necesita para llegar a florecer viene determinado por su ciclo, que hace referencia a la cantidad de calor que necesita acumular la planta para llegar a la floración. La floración dependerá, por tanto, de las tempera-

Presentación de resultados al sector. Foto: IRTA.



turas que se den durante el periodo vegetativo de la planta. En términos generales y tal y como se ha visto en este ensayo, el intervalo en la floración entre la siembra primera y la segunda ha sido muy escasa, de forma que tres semanas de diferencia en la siembra (31 de marzo-21 de abril) se han traducido al final en cuatro o cinco días en el maíz blanco y dos o tres en el transgénico amarillo. Esto se da porque el calor que acumula la primera siembra durante los días que pasan antes de que se haga la segunda es muy poco, ya que los días son muy fríos. En cambio, entre la segunda y la tercera siembra (21 de abril, 11 de mayo) las diferencias producidas en la floración serían notablemente más largas y eficientes para controlar el flujo producido.

En las condiciones normales de cultivo de las zonas de producción estudiadas no tiene demasiado sentido promover diferencias en las fechas de siembra tempranas de marzo y abril, puesto que la separación que se obtiene es insuficiente. En cambio, en siembras medias y sobre todo tardías es relativamente fácil obtener una diferencia en floración eficaz para controlar el flujo genético no deseado. La dinámica general observada durante estos años en las zonas estudiadas, es que las plantaciones de maíz transgénico se hacen a menudo en fechas tardías mientras que el maíz convencional se encuentra más en plantaciones tempranas, seguramente porque el ataque del barrenador es más fuerte con los calores del final de verano.

Este estudio demuestra que las fechas de siembra tienen una gran influencia en el control del flujo genético y permite sacar conclusiones muy concretas como por ejemplo que los cultivos convencionales sembrados antes del 20 de abril no se verán afectados por los campos transgénicos que se siembran más tarde del 11 de mayo. Es evidente que esto no es válido para todos los casos posibles, sin embargo, considerada en conjunto con otras medidas preventivas, la separación de fechas de siembra puede ser una herramienta útil para regular la coexistencia.

05 Referencias

BROOKES G., MESSEGUER J., MELÉ E., CUBERO JI., GARCÍA OLMEDO F., LEPRINCE-BÉNÉTRIX F., FOUÉILLASSAR X., WEBER E., SANVIDO O., BIBLER F., WINZELER M., ALPI A., ROSSI F., SANTANIELLO V., TONELLI C.,



Aspecto del ensayo en el momento de la cosecha. Foto: IRTA.

MEZZETTI B., TUBEROSA R., FOGHER C., DEFEZ R., PHIPPS R., STAMP P., SALEVE MP. (2006) *Coexistence of genetically modified and non-genetically modified maize: making the point on scientific evidence and commercial experience* (On line) <http://www.pgeconomics.co.uk/>

DEVOS Y, REHEUL D AND DE SCHRIJVER A . (2006) "The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization" *Environ. Biosafety Res.* 4 , págs. 71-87.

MELÉ, E., MESSEGUER, J., PALAUDELMÀS, M., PEÑAS G., SALVIA J. Y SIERRA J. (2006) "Coexistència entre blat de moro Bt i convencional" *Dossier Tècnic, 10. Formació i assessorament al sector agroalimentari*, págs.19-23. Generalitat de Catalunya, DAR. <http://www.ruralcat.net>

MESSEGUER J., PEÑAS G., BALLESTER J., BAS M., SIERRA J., SALVIA J, PALAUDELMAS M., MELE E. (2006) "Pollen mediated gene flow in maize in real situations of coexistence" *Plant Biotechnology Journal*, 4, págs. 633-645

PLAN M., PAZ J.L., PEÑAS G., GARCÍA N., PALUADELMÀS M., ESTEVE T., MESSEGUER J. AND MELÉ E. (2006) "Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated gene flow from GM to conventional maize in a field study" *Transgenic Research*, 15, págs. 219-228

06 Autores

Personal investigador involucrado en este ensayo.



Palauelmàs Carles, Montserrat
IRTA Cabriels
montserrat.palauelmas@irta.es

Peñas Civit, Gisela
IRTA Cabriels
gisela.penas@irta.es

Messeguer Peypoch, Joaquina
IRTA Cabriels
joaquina.messeguer@irta.es

Melé Grau, Enric
IRTA Cabriels
enric.mele@irta.es

Serra Gironella, Joan
IRTA Estación Experimental Agrícola Mas Badia
joan.serra@irta.es

Salvia Fuentes, Jordi
IRTA Estación Experimental Agrícola Mas Badia
jordi.salvia@irta.es

Pla De Sola-Morales, Maria
INTEA. Universidad de Girona
maria.pla@udg.es

Nadal Matemala, Anna
INTEA. Universidad de Girona
anadal@intea.udg.es

07 Agradecimientos

Este ensayo ha sido financiado por el IRTA y el DAR. Volvemos a agradecer al Sr. Pere Falgàs, propietario del campo dónde se realizó el ensayo, su gran dedicación para conseguir la buena marcha agronómica de este.