

PLANES DE SEGUIMIENTO AMBIENTAL DEL CULTIVO DE MAÍZ MODIFICADO GENÉTICAMENTE EN ESPAÑA



MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

**PLANES DE SEGUIMIENTO AMBIENTAL
DEL CULTIVO DE MAÍZ MODIFICADO GENÉTICAMENTE EN ESPAÑA**



2010

Título original: *Planes de seguimiento ambiental del cultivo de maíz modificado genéticamente en España*



MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO

Secretaría General Técnica: Alicia Camacho García. **Subdirector General de Información al ciudadano, Documentación y Publicaciones:** José Abellán Gómez. **Director del Centro de Publicaciones:** Juan Carlos Palacios López. **Jefa del Servicio de Producción y Edición:** M^a Dolores López Hernández.

Edita:

© Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Distribución y venta

Paseo de la Infanta Isabel, 1
Teléfono: 91 347 55 51 - 91 347 55 41
Fax: 91 347 57 22

Plaza San Juan de la Cruz, s/n
Teléfono: 91 597 60 81
Fax: 91 597 66 01

Tienda virtual: www.mam.es
e-mail: centropublicaciones@mm.es

NIPO: 770-11-168-4

Catálogo General de publicaciones oficiales:
<http://www.060.es> (servicios en línea/oficina virtual/Publicaciones)

**PLANES DE SEGUIMIENTO AMBIENTAL DEL CULTIVO DE MAÍZ
MODIFICADO GENÉTICAMENTE EN ESPAÑA**

Página

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Antecedentes.....	8
1.2. Iniciativas de planes de seguimiento de plantas modificadas genéticamente en España.....	10
1.2.1. Planes de seguimiento financiados por las empresas.....	11
1.2.2. Planes de seguimiento financiados por la Administración Central.....	12
2. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS POTENCIALES DEL MAÍZ Bt SOBRE ORGANISMOS DIANA	
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)	14
2.1 Introducción.....	14
2.2. Resistencia de los taladros al maíz Bt y manejo de la resistencia.....	16
2.3. Seguimiento de la evolución de resistencia de taladros al maíz Bt.....	18
2.3.1. Muestreos en áreas agro-ecológicas de interés.....	19
2.3.2. Bioensayos de susceptibilidad a la toxina Cry1Ab.....	20
2.3.3. Seguimiento de la susceptibilidad durante 10 años en poblaciones de campo.....	21
2.3.4. Selección de resistencia en condiciones de laboratorio.....	22
2. 4. Conclusiones.....	23
2.5. Publicaciones científicas.....	24
3. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS POTENCIALES DEL MAÍZ Bt SOBRE FAUNA NO DIANA	
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)	27
3.1. Introducción.....	27
3.2. Métodos para cuantificar las poblaciones de artrópodos en el cultivo del maíz Bt.....	28

3.3. Estudios de campo para determinar los posibles efectos del maíz Bt sobre los artrópodos depredadores.....	30
3.4. Ensayos de laboratorio con especies indicadoras.....	34
3.5. Conclusiones.....	35
3.6. Publicaciones científicas.....	36
4. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS POTENCIALES DEL MAÍZ Bt SOBRE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO	
Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).....	39
4.1. Transferencia de genes de maíz recombinante bt a la rizosfera de la planta y tipificación molecular de rizosferas.....	39
4.1.1. Bacterias cultivables en rizosferas de maíz transgénico y no transgénico.....	40
4.1.2. Diseño, validación y especificidad de cebadores para el gen de la beta-lactamasa.....	40
4.1.3. Presencia del gen de la beta-lactamasa y del promotor 35S: Sensibilidad de detección.....	42
4.2. Efecto estimulador de las bacterias del suelo Gram positivas en el crecimiento de plantas.....	44
4.3. Caracterización microbiológica de la rizosfera: trazabilidad molecular de rizosferas.....	46
4.4. Trazabilidad molecular de rizosferas: Hacia la determinación de un paisaje genómico.....	48
4.4.1. Introducción.....	48
4.4.2. Utilización de micromatrices de ADN de genomas bacterianos completos.....	49
4.4.2.1. Sensibilidad de detección.....	49
4.4.2.2. Efecto de la toxina Bt en las rizobacterias del maíz.....	51
4.4.2.3. Huella molecular de rizosferas.....	52
4.5. Conclusiones.....	56
4.6. Publicaciones científicas.....	56

5. ENSAYOS DE CAMPO CON CULTIVOS TRANSGÉNICOS TOLERANTES A HERBICIDAS EN PROCESO DE APROBACIÓN: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS POTENCIALES DE LOS HERBICIDAS SOBRE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO.

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)	59
5.1. Introducción.....	59
5.2. Estimación somera del efecto de los herbicidas.....	60
5.3. Huella molecular de rizosferas.....	62
5.4. Pirosecuenciación de la región V6 del rARN 16S.....	63
5.5. Conclusiones.....	68
5.6. Publicaciones científicas.....	70

6. CONCLUSIONES DE LOS PLANES.....72

7. AGRADECIMIENTOS.....72

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El uso de los organismos modificados genéticamente (OMG) y su liberación al medio ambiente están regulados específicamente mediante una legislación comunitaria y española exhaustiva y rigurosa. El objetivo de estas normas es el de garantizar la seguridad para el medio ambiente y la salud humana y animal, tanto para su utilización en etapas de investigación y desarrollo como para su comercialización. Para ello, en la Unión Europea se aplican procedimientos de autorización “paso a paso” y “caso por caso” basados en un análisis de riesgo integrado, en el que la fase de evaluación de los riesgos potenciales para la salud y el medio ambiente, fundamentada en el conocimiento científico, es uno de los pilares básicos de dicha regulación.

En el caso de que un OMG concreto supere todos los controles de seguridad ambiental y sanitaria y sea aprobado para su comercialización en la Unión Europea, además estará sujeto a los requisitos establecidos en la Directiva 2001/18/CE¹ o en el Reglamento (CE) nº 1829/2003² por los cuales los titulares de los organismos modificados genéticamente deberán llevar a cabo Planes de Seguimiento sobre sus efectos medioambientales una vez que se liberan al medio ambiente a escala comercial.

El objetivo de la ejecución de estos planes de seguimiento es profundizar en el conocimiento de los posibles efectos de los OMG sobre el medio ambiente y la salud con el fin de conocer el impacto a medio y largo plazo, así como implementar las medidas de gestión del riesgo necesarias para cada caso.

Así, según el Anexo VII de la Directiva 2001/18/CE y las notas de orientación desarrolladas con posterioridad (Decisión 2002/811/CE)³, los **objetivos** del plan de seguimiento serán:

¹ Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE (DOCE nº L106, de 17.05.01).

² Reglamento (CE) Nº 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre alimentos y piensos modificados genéticamente (DOUE nº 268, de 18.10.03).

³ Decisión 2002/811/CE del Consejo, de 3 de octubre de 2002, por la que se establecen unas notas de orientación complementarias al anexo VII de la Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo (DO L 280, de 18.10.2002, p. 27-36).

- *“Confirmar cualquier hipótesis relativa a la posible aparición y consecuencias de los efectos adversos potenciales del OMG o de su uso identificados en la evaluación del riesgo para el medio ambiente (ERMA), e*
- *Identificar si se producen otros efectos adversos del OMG o de su uso en la salud humana o el medio ambiente que no se hubieran contemplado en la ERMA”.*

En cuanto a los principios generales, dicho seguimiento tendrá lugar desde el momento de la autorización para comercializar un OMG. Cuando se observen cambios relevantes en el medio ambiente, se deberá realizar una nueva evaluación que establezca si son una consecuencia del uso de OMG o no, ya que podrían ser debidos a factores medioambientales ajenos a éstos. El diseño del plan de seguimiento:

- Se desarrollará en cada caso, teniendo en cuenta la ERMA realizada con anterioridad, y en función de las características del OMG y la escala de su uso previsto y la gama más completa posible de las condiciones medioambientales donde se espera que se libere el OMG.
- Incluirá una **vigilancia general** para detectar los efectos adversos imprevistos así como, en caso necesario, un control específico centrado en los posibles efectos adversos identificados en la ERMA (son los llamados estudios de **casos específicos**).
- Se determinará un plazo de duración suficiente para detectar los efectos inmediatos y directos, así como, si procede, los efectos diferidos e indirectos que se hayan identificado en la ERMA.
- Se utilizarán, siempre que sea posible, redes de vigilancia existentes (supervisión de los cultivos agrícolas, la protección fitosanitaria o de medicamentos de uso humano y veterinario).
- Se facilitará la observación, de manera sistemática, de la liberación de un OMG en el entorno receptor y la interpretación de dichas observaciones en lo que se refiere a la seguridad de la salud humana o del medio ambiente.
- Se determinará la responsabilidad para llevar a cabo las diversas tareas que requiere el plan de seguimiento, y se asegurará un canal que permita que el titular de la autorización y la Autoridad competente estén informados sobre cualquier efecto adverso que se observe en la salud humana y el medio ambiente, así como permitir que el titular de la autorización o la Autoridad competente, en su caso, tomen las medidas necesarias para proteger la salud humana y el medio ambiente.

Una vez diferenciados conceptualmente los *casos específicos* y la *vigilancia general*, deben establecerse marcos y fijar estrategias para desarrollar los planes de seguimiento. Mientras que para los casos específicos es necesario desarrollar métodos y protocolos científicos estandarizados para cada tipo de OMG, para la vigilancia general será muy útil emplear las redes de vigilancia existentes, u otras herramientas de estudio y prospección con el fin de concentrar esfuerzos en aquello que debe ser preservado en el entorno, centrándose principalmente en los objetivos de protección establecidos en la normativa española y comunitaria y en determinadas especies indicadoras.

1.2. Iniciativas de planes de seguimiento de plantas modificadas genéticamente en España

Los planes de seguimiento comenzaron a ser un requisito obligatorio a raíz de la entrada en vigor de la Directiva 2001/18/CE en abril de 2001. Sin embargo, cabe enfatizar que en España se comenzó a desarrollar y aplicar un Plan de Seguimiento para el cultivo de maíz modificado genéticamente desde el año 1998 cuando fueron aprobadas las primeras variedades comerciales procedentes del evento de transformación Bt176, que expresan la proteína insecticida Cry1Ab, y cuyo objetivo es contribuir al control selectivo de dos importantes plagas que afectan a este cultivo: los taladros del maíz *Ostrinia nubilalis* y *Sesamia nonagrioides*. Es decir, las Autoridades competentes en España, tomando en consideración el Principio de Precaución, exigieron un plan de seguimiento para estas variedades de maíz Bt desde su inclusión en el Registro Español de Variedades Comerciales (Orden de 23 de marzo de 1998)⁴.

Durante los 6 años posteriores a la aprobación de esta modificación genética se llevó a cabo un Plan de seguimiento post-comercialización (1998-2005) de variedades de maíz Bt176 resistentes a taladros de la empresa Syngenta. Un segundo plan de seguimiento para variedades de maíz del evento de transformación MON810, igualmente resistente a taladros y de la empresa Monsanto, se inició en 2003 y sigue actualmente en curso, para todas las variedades actualmente en el Registro de Variedades Comerciales del Ministerio de Medioambiente, y Medio Rural y Marino (MARM).

Estos planes fueron diseñados conjuntamente por el titular del evento de transformación y los expertos de la Comisión Nacional de Bioseguridad, que emitió los

⁴ BOE núm. 73, de 26.03.1998, p. 10193.

correspondientes informes favorables sobre los protocolos y estudios incluidos en dichos planes. Las variedades comerciales que contienen el evento de transformación fueron aprobadas finalmente por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) con las correspondientes Órdenes ministeriales para el registro de variedades comerciales⁵.

1.2.1. Planes de seguimiento financiados por las empresas

Los planes de seguimiento para las variedades de maíz que contienen las transformaciones genéticas resistentes a insectos (eventos Bt176 o MON810) que se han llevado a cabo bajo responsabilidad de las empresas en cumplimiento con los requisitos establecidos en la legislación, incluyeron los siguientes estudios:

- Evaluación de la efectividad del carácter insecticida de la modificación introducida en estas variedades.
- Estudio de la posible aparición de resistencias a la toxina Cry1Ab en las poblaciones de las 2 especies mencionadas de taladros del maíz.
- Posibles efectos sobre la entomofauna y sobre los microorganismos del suelo en las parcelas cultivadas con estas variedades.
- Posibles efectos sobre la evolución de las poblaciones bacterianas de la flora digestiva de los animales que consumen este maíz y en especial en lo que concierne a la resistencia a la ampicilina⁶.
- Impacto sobre ciclos biogeoquímicos: medición de parámetros químicos (metabolismos del C y N) y biológicos (caracterización de microorganismos asociados a la rizosfera y variación poblacional a lo largo del periodo de duración del plan).

Además, los planes de seguimiento incluyen los siguientes requisitos:

- Indicación de la superficie que deberá sembrarse con variedades convencionales en relación con la superficie sembrada con variedades transgénicas, al objeto de que sirvan de refugio al taladro.
- Programas de información a los agricultores, recomendando prácticas culturales para el control de plantas adventicias, así como de la necesidad de la siembra de

⁵ Reglamento general del Registro de variedades Comerciales, Orden de 23 de marzo de 1998 y sucesivas Órdenes APA y ARM (www.boe.es).

⁶ Este estudio sólo se realizó para el maíz Bt176, que contiene el gen marcador de resistencia a ampicilina.

una banda con una variedad convencional de maíz con la anchura y características adecuadas en cada caso.

Los resultados de estos estudios realizados tanto por instituciones científicas públicas como privadas han sido incorporados en los informes elaborados por las empresas Syngenta y Monsanto (Informe del Plan de Seguimiento maíz Bt176, 2005, e Informes del Plan de Seguimiento del MON810, 2006, 2007 y 2008) y alguno de ellos publicado en revistas científicas reconocidas. Dichos informes anuales son remitidos por las empresas a la Comisión Europea y a los Estados miembros para su consideración y si procede, para su revisión y adaptación, siendo, además, accesibles al público.

1.2.2. Planes de seguimiento financiados por la Administración Central

Desde 1998 y mediante convenios de colaboración con Centros Públicos de Investigación, se están llevando a cabo estudios científicos encaminados a evaluar posibles efectos ambientales, directos e indirectos y a largo plazo derivados del cultivo de las variedades de maíz modificadas genéticamente resistentes a insectos (eventos Bt176 y MON810). Estos estudios de investigación han sido promovidos por la Comisión Nacional de Bioseguridad, financiados por el Gobierno Central y llevados a cabo por dos Centros del CSIC de reconocido prestigio científico, el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) y el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).

Con el propósito de desarrollar métodos y protocolos adecuados para el establecimiento de planes de seguimiento para aquellos cultivos que están en fase de aprobación, en el año 2007 comenzaron otros estudios relacionados con el impacto ambiental de maíz tolerante a herbicidas y de algodón, también tolerante a un herbicida en 2009. En relación con estos últimos, los resultados serán publicados en cuanto estén disponibles.

Los estudios que se han efectuado o se están llevando a cabo por Centros públicos de investigación son los siguientes:

- Evaluación de los efectos potenciales de maíz Bt resistente a insectos sobre organismos diana y fauna auxiliar. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC).

- Evaluación de los efectos potenciales de las plantas modificadas genéticamente sobre los microorganismos del suelo: transferencia genética del maíz transgénico a las poblaciones bacterianas en el suelo de cultivo (CNB-CSIC).
- Evaluación científica del impacto ecológico sobre la biodiversidad del maíz tolerante a herbicida: evaluación de los efectos potenciales de los herbicidas sobre los microorganismos del suelo (CNB-CSIC)⁷.

En los capítulos sucesivos se presentan de forma detallada los principales resultados obtenidos de estos estudios financiados por el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y llevados a cabo por las instituciones científicas mencionadas.

⁷ Aunque hasta la fecha no se ha autorizado para el cultivo comercial ningún maíz tolerante a herbicida, sin embargo se ha iniciado este tipo de estudios anticipándose a un posible futuro cultivo utilizando material de un ensayo experimental autorizado.

2. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS POTENCIALES DEL MAÍZ Bt SOBRE ORGANISMOS DIANA.

Félix Ortego, Gema P. Farinós, Pedro Castañera

Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040

2.1. Introducción

Existe un amplio consenso en cuanto a que los taladros o barrenadores del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Crambidae) y *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera, Noctuidae), son las plagas de mayor importancia económica del cultivo del maíz en España. Las larvas penetran en el tallo de las plantas de maíz excavando largas galerías. Estos daños causan notables pérdidas de rendimiento debidas a la disminución en la disponibilidad de asimilados en la planta y al debilitamiento de su estructura (Figura 1), lo que incrementa aún más las pérdidas por la caída de plantas al impedir su cosecha. Este comportamiento larvario endófito limita notablemente la utilidad de las prácticas de control biológico y químico. Las cañas del maíz actúan como una barrera de protección dificultando la acción de depredadores y parasitoides, así como la de los insecticidas convencionales.

Figura 1.- Adultos y larvas de los taladros del maíz *Sesamia nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*.



Sesamia nonagrioides



Ostrinia nubilalis



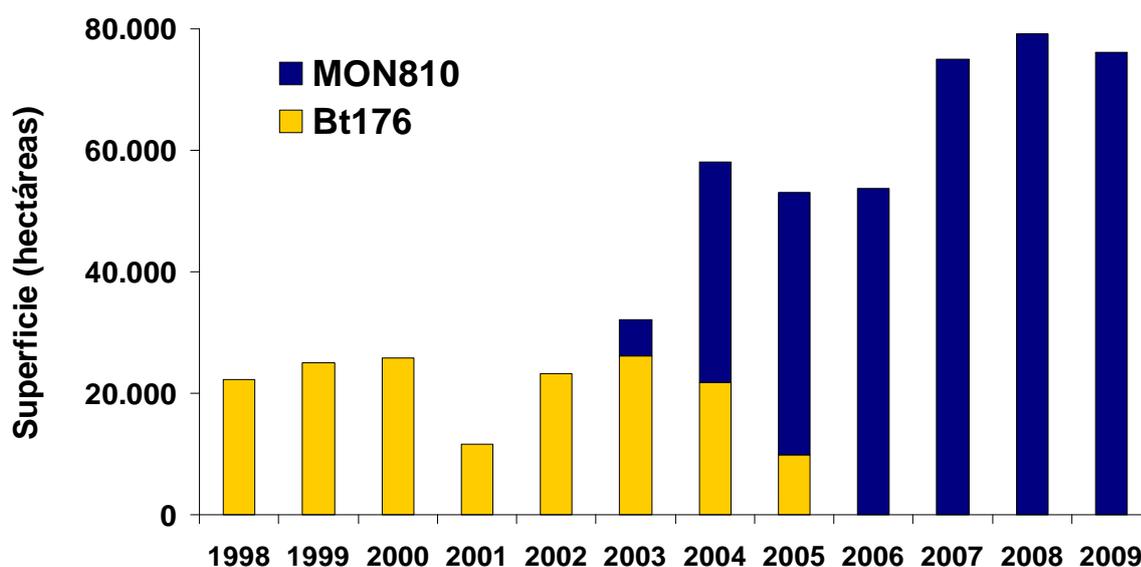
La utilización de variedades que expresan caracteres físicos y/o químicos de resistencia, obtenidas por mejora genética, ha sido durante décadas la estrategia de control más común y efectiva para la protección del maíz contra ambas especies de taladros. Una limitación de esta estrategia ha sido el escaso número de genes transferibles y el tiempo necesario para la obtención de variedades resistentes. El desarrollo de plantas transgénicas que expresan proteínas insecticidas ha permitido una vía más rápida y flexible para conseguir plantas de maíz con altos niveles intrínsecos de resistencia a las dos especies de taladro.

La bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) ha sido una fuente inagotable de toxinas específicas para el control de insectos, que expresadas en distintas plantas cultivadas han dado lugar a lo que se conoce genéricamente como plantas Bt (Sanchis y Bourguet, 2008). Entre ellas se encuentran diversas variedades de maíz modificado genéticamente (maíz Bt), altamente eficaces para el control de los taladros del maíz. Hasta la fecha, la Unión Europea ha aprobado para su cultivo dos eventos de maíz Bt que expresan la toxina Cry1Ab: Evento 176 (Syngenta) y MON810 (Monsanto). En España, el cultivo del maíz Bt se inició en 1998 con la aprobación de la variedad Compa CB (Evento 176) de Syngenta. La superficie cultivada con esta variedad se mantuvo en torno a las 20.000 hectáreas, hasta su retirada del mercado en el año 2005. A partir del año 2003 comenzaron a comercializarse variedades derivadas del evento MON810 por distintas empresas de semillas. Su superficie ha ido en aumento hasta alcanzar las 79.000 ha en la campaña 2008, lo que representa un 22% del total de la superficie de maíz cultivado en España (Figura 2). Actualmente, el número de variedades registradas de maíz Bt es superior a 120, lo que permite su cultivo en distintas zonas agro-ecológicas.

La legislación europea en materia de plantas transgénicas exige la realización de estudios exhaustivos para determinar que su liberación no supone ningún tipo de riesgo sobre la salud humana o el medio ambiente (Evaluación de Riesgos Ambientales, ERA). Asimismo, contempla la posibilidad de implementar programas de seguimiento que permitan evaluar el impacto ecológico de su cultivo a gran escala. Estos planes de seguimiento sólo son requeridos a nivel europeo desde el año 2001 pero, ateniéndose al principio de precaución, las autoridades españolas exigen la realización de planes de seguimiento para el maíz Bt desde el año 1998. Como parte del plan de seguimiento se estableció un Convenio de colaboración entre el entonces Ministerio de Medio Ambiente (MMA) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), a través del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), para evaluar los potenciales riesgos ecológicos derivados del cultivo a gran escala del maíz Bt (Castañera y Ortego, 2000; Bartsch *et al.*, 2006;

Ortego *et al.*, 2009). Entre los diferentes aspectos que se contemplan, hay uno de especial relevancia en relación a la interacción del cultivo con las plagas diana. Esto es, la posible aparición de poblaciones de taladros resistentes a la toxina Cry1Ab, expresada en el maíz Bt, debido a una alta exposición continuada a la toxina.

Figura 2.- Superficie cultivada con variedades de maíz Bt, procedentes de los eventos Bt176 y MON810, entre los años 1998 y 2009 en España. Fuente: MARM: <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/semillas/estadisticas.htm>.

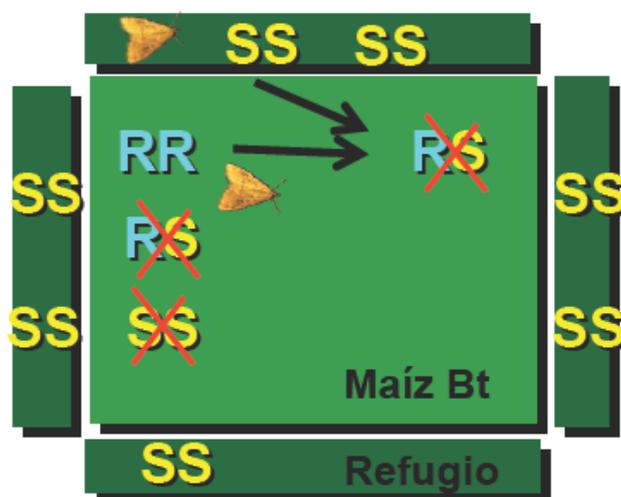


2.2. Resistencia de los taladros al maíz Bt y manejo de la resistencia

Los niveles de toxina expresados en el maíz Bt suponen una elevada presión de selección para ambas especies de taladro, por lo que su cultivo a gran escala podría favorecer un rápido proceso de selección de resistencia. El desarrollo de resistencia es un fenómeno complejo, ligado a la interacción de factores genéticos y ambientales, y está considerado como uno de los riesgos principales del uso comercial de plantas Bt (Tabashnik *et al.*, 2009). Para poder mantener la eficacia del maíz Bt a largo plazo es necesario detectar cambios en la susceptibilidad de los taladros a la toxina, así como la utilización de estrategias de manejo de la resistencia que permitan prevenir o retrasar la aparición de poblaciones resistentes. En España, al igual que en otros países donde se cultiva el maíz Bt, la estrategia mayoritariamente recomendada para el manejo de la resistencia en campo se basa en el uso de variedades con un alto grado de expresión de la toxina en la planta, junto con el establecimiento de campos adyacentes no transgénicos

(20% de la superficie) que actúen como reservorio para poblaciones susceptibles a las toxinas (Figura 3). Esta estrategia es conocida como de “dosis alta / refugio” (Bravo y Soberón, 2008). Para que dicha estrategia sea efectiva, se requieren tres requisitos esenciales: una baja frecuencia de alelos de resistencia para que el número de homocigotos resistentes sea muy reducido; que los insectos resistentes que provienen de los campos de maíz Bt se crucen con los insectos susceptibles que se preservan en los refugios; y que la resistencia sea funcionalmente recesiva para que los descendientes heterocigotos no sobrevivan. Todos estos aspectos han sido estudiados de forma exhaustiva en *S. nonagrioides*, por ser la plaga diana de mayor importancia económica en nuestras condiciones y por no disponer de datos previos. Estudios similares se han realizado en otros países Europeos y en Estados Unidos con *O. nubilalis*, por su mayor importancia como plaga en estos países (Bourguet *et al.*, 2003; Leniaud *et al.*, 2006).

Figura 3.- La siembra de zonas de maíz convencional denominadas “refugios”, próximas a los campos de maíz Bt, posibilita que los escasos individuos resistentes (RR) que sobrevivan en el campo con maíz Bt puedan aparearse con los individuos susceptibles (SS), procedentes de los refugios, para dar descendientes (RS) sensibles.



Los estudios dirigidos a determinar la frecuencia de alelos de resistencia en poblaciones de campo de *S. nonagrioides* se han realizado mediante la técnica denominada “F₂ screen”. Por este procedimiento se pueden estimar las frecuencias de los alelos de resistencia de una población, exponiendo la generación F₂, descendiente de parentales capturados en campo, a una dosis discriminante de toxina. Estos estudios han

contado con la colaboración de los grupos del Dr. Andow (University of Minnesota) y la Dra. Savopoulou-Soultani (University of Thessaloniki), dentro del marco de un proyecto Europeo en el que se han abordado distintos aspectos relacionados con la resistencia. Los resultados muestran una frecuencia de alelos resistentes $< 8.6 \times 10^{-3}$ para las poblaciones españolas y $< 9.7 \times 10^{-3}$ para las griegas, valores compatibles con la estrategia de “dosis alta / refugio” (Andreadis *et al.*, 2007).

Otro aspecto muy importante para un correcto manejo de la resistencia es la determinación del flujo génico entre poblaciones de taladros. En este sentido, se han analizado la estructura genética de poblaciones de *S. nonagrioides* procedentes de España, Francia, Italia, Grecia y Turquía (De la Poza *et al.*, 2006, 2008). Los resultados obtenidos son indicativos de poblaciones genéticamente diferenciadas, con unos niveles moderados, pero significativos, de flujo génico entre poblaciones.

Asimismo, se han realizado estudios sobre las enzimas digestivas en *S. nonagrioides* y su interacción con la toxina Cry1Ab, expresada en el maíz Bt, por su papel fundamental en la activación proteolítica de la toxinas y porque pueden ser responsables de su degradación (Díaz-Mendoza, 2006; Díaz-Mendoza *et al.*, 2005, 2007). Estos estudios permitirán identificar potenciales mecanismos de resistencia mediados por proteasas que se pudieran desarrollar en poblaciones de campo.

2.3. Seguimiento de la evolución de resistencia de taladros al maíz Bt

La detección precoz de insectos resistentes en poblaciones naturales de taladros es de enorme utilidad para el manejo de la resistencia. Por consiguiente, el seguimiento de la resistencia debe realizarse de forma regular en aquellas zonas donde existe un mayor riesgo, de forma que ésta pueda detectarse cuanto antes y así poder aplicar de forma rápida las medidas de manejo oportunas. Por otra parte, es preciso contar con una metodología fiable y repetitiva que permita discriminar entre las variaciones interpoblacionales y la adquisición de resistencia moderada o baja, puesto que se han encontrado grandes diferencias en la susceptibilidad de poblaciones naturales en ambas especies de taladros.

Coincidiendo con el inicio del cultivo del maíz Bt en España en 1998, se puso en marcha el programa de seguimiento de la resistencia en taladros, como una parte del Convenio de Colaboración entre el MMA y el CIB-CSIC (Farinós *et al.*, 2001, 2004a). Los

objetivos establecidos en el mismo son: a) determinar las áreas agro-ecológicas de interés; b) establecer la susceptibilidad basal de las poblaciones de taladros en estas áreas; y c) realizar un seguimiento sistemático de la susceptibilidad para detectar la aparición de poblaciones resistentes.

2.3.1. Muestreos en áreas agro-ecológicas de interés

Se espera que la resistencia al maíz Bt se desarrolle más rápidamente en aquellas zonas donde la presión de selección sea mayor, lo que se corresponde con las zonas con mayor superficie sembrada de este cultivo. Considerando los niveles de infestación de las dos especies de taladros en las diferentes zonas maiceras y la evolución de las superficies sembradas con maíz Bt, se establecieron tres áreas agro-ecológicas de interés para el seguimiento de la resistencia: Suroeste (Andalucía y Extremadura), Centro (Castilla-La Mancha y Madrid) y Ebro (Aragón y Cataluña). La superficie sembrada con maíz Bt en estas zonas representa el 94% del total del maíz Bt en España en el año 2009. Además, se ha realizado, en determinados años, un seguimiento de poblaciones procedentes de Galicia, por tratarse de una de las zonas de España donde hasta la fecha no se ha cultivado maíz Bt.

El método de muestreo establecido consiste en recoger anualmente, en otoño, entre 300 y 500 larvas, procedentes de dos o tres campos comerciales distintos, en cada una de las áreas agro-ecológicas (Figura 4). La elección de los campos a muestrear ha variado dependiendo de las variedades transgénicas cultivadas. Cuando las poblaciones de taladros se recogían en campos de la variedad Compa CB (evento Bt176), que expresa concentraciones subletales de la toxina a partir de la maduración del grano, los muestreos se realizaban dentro del propio campo de maíz Bt. Sin embargo, cuando éstas proceden de campos cultivados con variedades procedentes del evento MON810, los muestreos se realizan en los refugios adyacentes a estos campos, ya que la alta expresión de la toxina durante todo el ciclo de la planta, impide la supervivencia de larvas dentro del propio campo.

En el momento de la recogida, si las larvas no se encuentran en diapausa (periodo de crecimiento o desarrollo suspendido) se les induce en el laboratorio para sincronizar su ciclo biológico y facilitar su manejo. Una vez pupan, se sexan y se disponen en ponederos donde emergen los adultos.

Figura 4.- Recogida de taladros en campos comerciales de maíz.



2.3.2. Bioensayos de susceptibilidad a la toxina Cry1Ab

Los bioensayos para determinar la evolución de la susceptibilidad de los taladros a la toxina han de ajustarse a una metodología consistente para que sean comparables entre años y entre laboratorios. Es necesario, pues, estandarizar la toxina, la forma de administración y la determinación de la mortalidad. Esto ha sido posible mediante el uso del protocolo elaborado conjuntamente con un grupo de expertos de la Unión Europea. Los bioensayos se realizan con larvas neonatas descendientes de las recogidas en campo, que son expuestas a la toxina mediante la técnica de tratamiento en superficie (Castañera *et al.*, 2004). Básicamente, la técnica consiste en dispensar la dieta semisintética usada para la cría de cada especie en bandejas de ensayo con 128 celdas (1 ml/celda) y tratar en superficie con la toxina Cry1Ab, utilizando entre 7 y 9 concentraciones. Sobre cada celda se deposita una larva neonata (<24 h) que se confina con una película de plástico adherente (Figura 5). Para cada dosis se utiliza un total de 3-4 repeticiones de 16-32 larvas tomadas al azar de cada una de las jaulas de oviposición, para garantizar la máxima variabilidad de las poblaciones recogidas. Las larvas se mantienen a $25 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ r.h., y oscuridad constante, evaluándose la mortalidad a los 7 días. Para cada población, los datos de mortalidad permiten determinar la susceptibilidad a la toxina (CL₅₀ y CL₉₀,

concentraciones de la toxina que matan al 50 y 90% de las larvas, respectivamente) mediante la realización de un análisis probit.

Figura 5.- Bandejas de 128 celdas utilizadas para los bioensayos de susceptibilidad a la toxina Cry1Ab. En cada celda se deposita una larva neonata (ver detalle) que se confina con una película de plástico transparente



2.3.3. Seguimiento de la susceptibilidad durante 10 años en poblaciones de campo

La susceptibilidad basal a la toxina Cry1Ab en poblaciones españolas de *S. nonagrioides* y *O. nubilalis* se estableció en 1998 y 1999, con poblaciones recogidas en campos sembrados con maíz no transgénico (González-Núñez *et al.*, 2000). Los resultados de este estudio mostraron que para las dos especies de taladros existían diferencias de susceptibilidad entre poblaciones procedentes de diferentes áreas geográficas (Suroeste, Centro, Ebro y Galicia). Estas diferencias deben atribuirse a variaciones naturales, puesto que estas poblaciones no habían estado previamente expuestas a insecticidas Bt y, además, todas ellas se recogieron en campos de maíz distantes de aquellos en los que se cultivó por primera vez maíz Bt en 1998.

Para el seguimiento de la resistencia, se han realizado muestreos anuales (1999-2009) de las dos especies de taladros en campos de maíz Bt en las áreas agro-ecológicas mencionadas (Suroeste, Centro y Ebro), con objeto de comparar la evolución de la susceptibilidad a la toxina a lo largo del tiempo y en relación al nivel basal de

susceptibilidad. Hasta la fecha no se ha obtenido un aumento significativo de la tolerancia de las poblaciones de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* a la toxina Cry1Ab en ninguna de las regiones muestreadas, aunque se han observado oscilaciones entre años en algunas de éstas (De la Poza, 2004; Farinós *et al.*, 2004b; Castañera *et al.*, 2005). Sin embargo, estas variaciones no indican cambios en la susceptibilidad de las poblaciones a lo largo del tiempo, por estar dentro del rango de las diferencias poblacionales dentro de un mismo año. Estos resultados demuestran la enorme importancia de utilizar toxinas cuya actividad permanezca estable en el tiempo, así como de disponer de poblaciones de referencia de laboratorio que nos permitan estandarizar los resultados obtenidos.

2.3.4. Selección de resistencia en condiciones de laboratorio

Un método para evaluar el potencial de una plaga para desarrollar resistencia es la selección de resistencia en laboratorio. La comparación de la susceptibilidad entre las poblaciones seleccionadas, después de varias generaciones de selección, y las de referencia no-seleccionadas permite evaluar anticipadamente el riesgo de aparición de resistencia. Las larvas de las poblaciones seleccionadas se alimentan en una dieta de cría sobre la que se dispensa una concentración de toxina Cry1Ab capaz de matar el 80% de los individuos (CL₈₀). Para cada generación de selección se utilizaron unas 2000 larvas neonatas de *O. nubilalis* y unas 1500 de *S. nonagrioides*. El proceso de selección se repite en cada generación, y la comparación de la CL₅₀ entre las poblaciones seleccionadas y de referencia se efectúa cada cuatro generaciones mediante análisis probit. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la tolerancia a la toxina después de tan solo ocho generaciones de selección (21 veces más tolerante en el caso de *S. nonagrioides* y 10 veces para *O. nubilalis*), lo que indica una respuesta a la presión selectiva en ambas especies de taladros (Farinós *et al.*, 2004b). Sin embargo, estos resultados no han supuesto una disminución de la efectividad del maíz Bt, puesto que ninguna de las larvas procedentes de las líneas seleccionadas fue capaz de completar su ciclo sobre plantas de maíz Bt. Además, cada dos generaciones las pupas procedentes de las poblaciones sometidas a selección y de las de referencia, son pesadas y sexadas para determinar los posibles costes biológicos asociados al proceso de selección para resistencia. No se han detectado cambios significativos en la proporción sexual o el peso de las pupas en ninguna de las dos especies.

2.4. Conclusiones

El convenio de colaboración entre el MMA y el CIB-CSIC ha permitido realizar un seguimiento de la aparición temprana de líneas de taladros resistentes en las zonas de cultivo de maíz Bt y ha contribuido a validar la estrategia de manejo de la resistencia adoptada de forma obligatoria en nuestras condiciones.

Las aportaciones más relevantes en relación al seguimiento de la resistencia son:

- a) Se ha desarrollado conjuntamente con grupos de trabajo europeos un método estándar habiéndose validado mediante la comparación de la evolución de la resistencia de los taladros a toxinas expresadas en la planta de maíz en distintas zonas agro-ecológicas de España y de la UE.
- b) La selección de resistencia en condiciones de laboratorio sugiere que las poblaciones de ambas especies de taladros tienen el potencial de desarrollar niveles moderados de tolerancia a la toxina Cry1Ab, aunque insuficiente para sobrevivir en maíz Bt.
- c) El seguimiento de la evolución de la resistencia en poblaciones de campo permite concluir que las poblaciones de taladros no han desarrollado resistencia a la toxina Cry1Ab después de 12 años de cultivo continuado del maíz Bt en grandes áreas, puesto que actualmente el maíz Bt representa el 20-22% de la superficie total de maíz cultivado en España.
- d) La existencia de un flujo génico limitado pero suficiente, junto con la baja frecuencia de alelos de resistencia encontrada en poblaciones de *Sesamia nonagrioides* es compatible con la aplicación de la estrategia de dosis alta / refugio.

No obstante, el cultivo a gran escala del maíz Bt implica un riesgo de aparición de resistencia, por lo que es obligado continuar con los trabajos de investigación contemplados en el programa de seguimiento en curso, realizados por el CIB-CSIC y financiados por el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (MARM).

2.5. Publicaciones Científicas

Andreadis S.S., Álvarez-Alfageme F., Sánchez-Ramos I., Stodola T.J., Andow D.A., Milonas P.G., Savopoulou-Soultani M., Castañera P. 2007. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 100: 195-201.

Bartsch D., Bigler F., Castañera P., Gathmann A., Gielkens M., Hartley S., Lheureux K., Renckens S., Schiemann J., Sweet J., Wihelm R. 2006. Concepts for general surveillance of Genetically Modified (GM) plants: The EFSA position. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Journal of Consumer Protection and Food Safety)*, Supplement 1: 15-20.

Bourguet, D., Chaufaux, J., Seguin, M., Buisson, C., Hinton, J.L., Stodola, T.J., Porter, P., Cronholm, G., Buschman, L.L., Andow, D.A. 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of *Ostrinia nubilalis*. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1225-1233.

Bravo, A., Soberón, M. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotechnology* 26: 573-579.

Castañera, P., Ortego, F. 2000. El maíz transgénico en España. *Mundo Científico* 20: 43-47.

Castañera P., Ortego F., Farinós G.P., Hernández-Crespo P., de la Poza M. 2004. Métodos de evaluación de los efectos potenciales del cultivo del maíz transgénico en insectos diana y en artrópodos depredadores. *Phytoma* 164: 25-28.

Castañera P., Farinós G.P., de la Poza M., Hernández-Crespo P., Ortego F. 2005. Estimación de la resistencia al maíz Bt de poblaciones españolas de taladros. *Phytoma* 173: 89-91.

De la Poza M. 2004. Maíz Bt: Seguimiento de la resistencia de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) y efectos en artrópodos depredadores. Universidad Politécnica de Madrid (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos).

De la Poza M., Farinós G.P., Ortego F., Hernández-Crespo P., Castañera P. 2006. Genetic structure of *Sesamia nonagrioides* populations: Implications for Bt-maize resistance management. *OILB/wprs Bulletin* 29 (5): 119-121.

De la Poza, M., Farinós, G.P., Beroiz, B., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., and Castañera, P. 2008. Genetic structure of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) populations in the Mediterranean area. *Environmental Entomology* 37: 1354-1360.

Díaz-Mendoza, M.M. 2006. Proteasas digestivas de tipo tripsina del taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae): caracterización e interacción con la proteína insecticida Cry1Ab. Universidad: Politécnica de Madrid (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos).

Díaz-Mendoza M., Ortego F., García de Lacoba M., Magaña C., de la Poza M., Farinós G.P., Castañera P., Hernández-Crespo P. 2005. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1005-1020.

Díaz-Mendoza M., Farinós G.P., Castañera P., Hernández-Crespo P., Ortego F. 2007. Proteolytic processing of native Cry1Ab toxin by midgut extracts and purified trypsins from the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Insect Physiology* 53: 428-435.

Farinós G.P., de la Poza M., Ortego F., Castañera P. 2001. Monitoring corn borers resistance to Bt-maize in Spain. Proceedings EU Workshop: Monitoring of Environmental Impacts of Genetically Modified Plants, Berlin, 9th and 10th November 2000. pp: 114-118. Miklau, M., Gaugitsch, H., and Heissenberger, A. (Eds.). German Federal Environmental Agency, Berlin, Germany.

Farinós G.P., de La Poza M., González-Núñez M., Hernández-Crespo P., Ortego, F., Castañera P. 2004a Research programme to monitor corn borers resistance to Bt-maize in Spain. *OILB/wprs Bulletin* 27 (3): 73-77.

Farinós G.P., de la Poza M., Hernández-Crespo P., Ortego F., Castañera P. 2004b. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after five years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110: 23-30.

González-Núñez M., Ortego F., Castañera P. 2000. Susceptibility of Spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Journal of Economic Entomology* 93: 459-463.

Leniaud, L., Audiot, P., Bourguet, D., Frerot, B., Genestier, G., Lee, S.F., Malausa, T., Le Pallec, A.H., Souqual, M.C., Ponsard, S. 2006. Genetic structure of European and Mediterranean maize borer populations on several wild and cultivated host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 120: 51-62.

Ortego, F., Pons, X., Albajes, R., and Castañera, P. 2009. European commercial genetically modified plantings and field trials. En: Environmental Impact of Genetically Modified Crops pp. 327-343. Ferry, N., and Gatehouse, A.M.R. (Eds.). CAB International.

Sanchis, V., Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 11-20.

Tabashnik, B., Van Rensburg, J.B.J., Carrière, Y. 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. *Journal of Economic Entomology* 102: 2011-2025.

En negrita aparecen las publicaciones del grupo CIB-CSIC, financiados en su totalidad o en parte por el Convenio de colaboración entre el entonces Ministerio de Medio Ambiente (actualmente MARM) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

3. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS POTENCIALES DEL MAÍZ Bt SOBRE LA FAUNA NO DIANA

Gema P. Farinós, Félix Ortego y Pedro Castañera

Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC
Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

3.1. Introducción

El maíz transgénico resistente a insectos (maíz Bt) cultivado en España expresa una toxina insecticida, Cry1Ab, procedente de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*. Esta toxina posee una alta especificidad hacia dos plagas de lepidópteros, *Sesamia nonagrioides* Lefebvre y *Ostrinia nubilalis* Hübner, que penetran en el tallo del maíz originando importantes pérdidas de rendimiento y a las que se denomina comúnmente taladros del maíz. Sin embargo, los cultivos no solo albergan a insectos plaga. Una diversa fauna de artrópodos habita también estos agroecosistemas, en los cuales se refugian, se reproducen y se alimentan. A los artrópodos que se alimentan de las plagas se les conoce con el nombre de enemigos naturales, denominación que engloba a depredadores y parasitoides. Los depredadores, tanto larvas como adultos, se alimentan de otras especies animales o presas, a las que matan para completar su desarrollo, y pueden encontrarse en muchos órdenes de insectos o incluso en otros grupos, como arañas y ácaros. Los parasitoides son insectos, generalmente himenópteros y dípteros, cuyos estados inmaduros se desarrollan en un solo huésped al que habitualmente matan antes de la emergencia del adulto. Esta biodiversidad asociada al cultivo cumple un importante papel, ya que contribuyen de forma significativa a mantener el equilibrio en el ecosistema agrícola, jugando, además, un importante papel en la regulación de las poblaciones de plagas (Kromp, 1999; Nyffeler y Sunderland, 2003).

Una de las primeras razones para el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a insectos plaga es reducir la dependencia actual de plaguicidas convencionales. Esto supondría una gran ventaja para la conservación de los enemigos naturales, ya que a la reducción del uso de insecticidas habría que añadir la especificidad de la toxina hacia las plagas a las que está destinada, lo cual debería traducirse en una mayor abundancia de la fauna asociada al cultivo (Castañera y Ortego, 2000). Sin embargo, la complejidad de las interacciones entre los distintos niveles tróficos de la cadena alimenticia (la planta, las plagas asociadas, sus enemigos naturales y otros artrópodos no diana) hace necesario

evaluar caso por caso los efectos potenciales directos o indirectos de los cultivos Bt y contar con un gran número de datos obtenidos en distintos agroecosistemas con una metodología semejante (Romeis *et al.*, 2006; Icoz y Stotzky, 2008; Perry *et al.*, 2010). Se han descrito tres vías principales mediante las cuales la fauna no diana puede entrar en contacto con la toxina insecticida que expresa el maíz Bt: ingiriendo la toxina directamente al alimentarse de polen o materia vegetal, alimentándose de insectos que han ingerido la toxina o por la liberación de las toxinas a través de los exudados de la raíz, acumulándose en el suelo hasta alcanzar niveles tóxicos para los organismos que viven en él (Saxena *et al.*, 1999; Groot y Dicke, 2002). Asimismo, los efectos del Bt sobre la fauna no diana pueden ser de dos tipos: a) directos, debidos a la toxicidad de la proteína insecticida adquirida directamente o a través de la presa y b) indirectos, al disminuir la cantidad o la calidad de las presas ingeridas. En este contexto se enmarca el Convenio de Colaboración suscrito en el año 2000 entre el entonces Ministerio de Medio Ambiente (MMA) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Como parte del plan de seguimiento, desde el año 2000 se han realizado estudios para determinar experimentalmente los posibles efectos adversos del cultivo del maíz Bt sobre la fauna de artrópodos depredadores que forman parte del cultivo (Ortego *et al.*, 2009).

Con el fin de determinar los posibles efectos a corto y medio plazo que puede tener el cultivo continuado del maíz Bt en España sobre los depredadores que coinciden espacial y temporalmente con el cultivo, se han llevado a cabo distintas aproximaciones mediante estudios de campo y de laboratorio. En primer lugar se ha realizado un estudio a gran escala en campos comerciales de maíz durante varios años con el propósito de obtener datos suficientes que nos permitan evaluar la fauna habitual presente en campos de maíz Bt con respecto al no Bt. Una vez conocidas las especies de artrópodos depredadores más representativas del cultivo se han analizado sus niveles de exposición a la toxina durante distintos estados fenológicos del cultivo. Por último, se han llevado a cabo experimentos en el laboratorio en condiciones controladas para estudiar los efectos potenciales de la toxina adquirida a través de la presa sobre dos de las especies de artrópodos depredadores más abundantes.

3.2. Métodos para cuantificar las poblaciones de artrópodos en el cultivo del maíz Bt

La elección del método más adecuado para estudiar los artrópodos presentes en el cultivo del maíz fue una de las primeras cuestiones que se plantearon al abordar el estudio

de los efectos del maíz Bt sobre la fauna no diana. El objetivo era conocer las poblaciones de artrópodos depredadores del cultivo de maíz, tanto especialistas como generalistas, de la planta y del suelo. Teniendo en cuenta las características del cultivo se estimó que la mejor forma de llevar a cabo este estudio era mediante el uso de trampas para los depredadores del suelo y del conteo directo de los artrópodos sobre la planta (Castañera *et al.*, 2004).

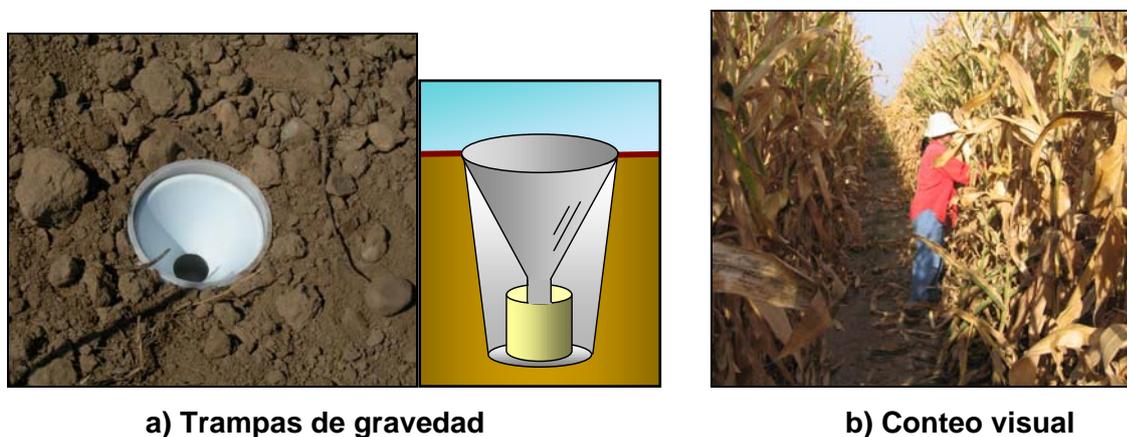
Las trampas de gravedad o caída (“pitfall”) consisten básicamente en un recipiente que se entierra, cuya abertura queda a ras de suelo, al que caen los artrópodos y del que no pueden salir (Figura 1a). Esta técnica de captura se halla ampliamente extendida en los estudios de ritmos de actividad estacionales, patrones de distribución espacial y comparación de abundancias relativas. Los datos procedentes de estas trampas se basan no solo en la densidad de la población, sino también en su actividad, así como en el comportamiento (en sentido amplio) de cada especie y su probabilidad de encontrar una trampa. Por ello, a la estima de abundancia relativa de una población obtenida con este método se la denomina “actividad-densidad”. Hasta el momento estas trampas son el método mejor conocido y más ampliamente utilizado en el estudio de poblaciones de artrópodos del suelo en los ecosistemas agrícolas (Duelli *et al.*, 1999).

El conteo visual de los artrópodos sobre las plantas es un método de muestreo absoluto mediante el cual se obtienen estimas precisas de la fauna existente sobre la planta. Para llevarlo a cabo es necesario elegir la unidad de muestreo adecuada a cada caso (árbol, rama, fruto, etc.). En el caso del maíz la unidad de muestreo era la planta completa. El muestreo se realiza observando detalladamente las hojas, el tallo, la inflorescencia masculina y las espatas que recubren la mazorca y anotando todos los artrópodos y su estado de desarrollo (adultos, pupas, ninfas o larvas) encontrados sobre cada planta (Figura 1b).

Con ambas metodologías se obtienen datos que permiten cuantificar la fauna y compararla en parcelas de cultivo con distintas características (Bt vs. no Bt). Sin embargo, el estudio de comunidades de insectos basado solo en la abundancia puede dar lugar a imprecisiones, ya que la abundancia de artrópodos se puede ver afectada por otros muchos factores. Por ello es necesario estudiar otros índices, tales como la riqueza y la diversidad de especies, que han demostrado ser eficaces para su uso en la evaluación de cambios en la estructura de comunidades de insectos. El estudio de estos parámetros sólo es posible en el caso de conocer las especies que integran cada uno de los grupos encontrados. De

este modo sólo se llevó a cabo con los grupos de artrópodos del suelo más abundantes de los maizales del centro peninsular: arañas, carábidos y estafilínidos (De la Poza, 2004).

Figura 1. Métodos de muestreo utilizados para determinar las especies de depredadores más abundantes en los maizales.



3.3. Estudios de campo para determinar los posibles efectos del maíz Bt sobre los artrópodos depredadores

El estudio de los efectos que las variedades transgénicas pueden tener sobre los depredadores presentes en el cultivo requiere estudios de campo para determinar los efectos a corto o medio plazo (Ortego *et al.*, 2009). Con este fin nuestro grupo (CIB, CSIC) realizó simultáneamente un estudio coordinado con el grupo del Dr. Ramón Albajes de la UdL-IRTA, en parcelas comerciales y en dos localidades con distintas características agroecológicas: uno en la zona Centro (Madrid) y otro situado en el Valle del Ebro (Lérida), siguiendo la misma metodología. Se establecieron tres tratamientos: maíz Bt (variedad Compa CB®) y la variedad isogénica Dracma®, con y sin el insecticida imidacloprid (Gaucho®) incorporado en su semilla. El estudio se llevó a cabo en parcelas de gran tamaño (≈ 0.6 ha) con tres repeticiones de cada tratamiento, dispuestas en bloques al azar. De esta forma se puede comparar el efecto de los tres sistemas de producción sobre la abundancia y diversidad de artrópodos (De la Poza *et al.*, 2005).

El ensayo de la zona Centro se realizó en un campo comercial en Estremera (Madrid), entre 2000 y 2002. Un ensayo similar se repitió en el año 2005 en los mismos campos con el fin de ver los efectos a medio plazo. Entre 2000 y 2002, la única variedad de maíz Bt cultivada en España fue Compa CB (evento Bt176), cuya concentración de toxina

disminuye progresivamente a partir de la maduración del grano y mantiene altas concentraciones en el polen, mientras que el estudio del año 2005 incluía variedades derivadas de los eventos Bt176 y MON810. Este último expresa la toxina a lo largo de todo el ciclo, pero su concentración en el polen es muy baja. Desde junio a septiembre se practicaron dos métodos de muestreo, trampas de caída y conteos visuales, para conocer la abundancia y diversidad de artrópodos no diana asociados al cultivo de maíz. Los artrópodos del suelo se capturaron en cinco trampas de caída instaladas en la diagonal de cada parcela, y los muestreos visuales se realizaron cada dos semanas en un total de 48 plantas por tratamiento.

Los carábidos y las arañas fueron los grupos de depredadores polífagos más abundantes encontrados en los suelos de maíz Bt y no Bt en los 3 años consecutivos de muestreo, representando el 44 y 39% del total de las capturas, respectivamente, seguidos por los estafilínidos con un 8% (Figura 2) (De la Poza *et al.*, 2005). Tres especies (*Poecilus cupreus*, *Pseudophonus rufipes* y *Pseudophonus griseus*) representaron el 93% del total de especímenes de carábidos capturados en las trampas de caída. Análogamente, seis especies constituyeron el 96% del total de las capturas de arañas, siendo *Pardosa occidentalis* la especie más abundante con el 86%. Sin embargo, en el caso de los estafilínidos no hubo una especie claramente dominante. Otros artrópodos capturados en este muestreo fueron miriápodos (Lithobiomorpha: Lithobiidae), tijeretas de la especie *Labidura riparia* (Dermaptera: Labiduridae) y opiliones (Opiliones: Phalangidae) (Farinós *et al.*, 2008a, 2008b).

En el muestreo visual sobre las plantas de maíz se capturaron artrópodos depredadores que se alimentan de otros depredadores o de herbívoros que consumen maíz. Fueron mayoritarios tres grupos de artrópodos: las arañas (Araneae), las chinches del género *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae), representadas por las especies *O. majusculus* y *O. laevigatus*, y el coccinélido *Stethorus punctillum* (Coleoptera: Coccinellidae) que representó el 45% de las capturas en el año 2002 (Figura 3) debido a los altos niveles de infestación de araña roja ese año. Otros depredadores encontrados en los muestreos fueron larvas de *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), adultos de *Coccinella septempunctata* y *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae), ninfas y adultos de *Nabis* sp. (Heteroptera: Nabidae), larvas de *Feltiella acarisuga* (Diptera: Cecidomyiidae) y larvas de *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae) (Farinós *et al.*, 2008a, 2008b).

No se observaron diferencias en la composición de la fauna entre las parcelas con maíz Bt o maíz no Bt entre los años 2000 y 2002. Asimismo, el análisis de fenología de

estos grupos reveló que no existían diferencias en las curvas de actividad-densidad entre parcelas con maíz Bt o con su línea isogénica. Además, distintos parámetros indicadores del estado de las poblaciones (fundamentalmente riqueza y diversidad de especies) mostraron que el maíz transgénico no afectó a los grupos y especies de artrópodos depredadores más importantes del cultivo (De la Poza *et al.*, 2005). Los resultados en 2005 mostraron una composición de la fauna similar a la encontrada en los tres años de muestreo anteriores. De igual forma, no se encontraron diferencias significativas en la riqueza de especies ni en las curvas de actividad-densidad de las principales especies entre las parcelas con maíz Bt y no Bt.

Figura 2. Artrópodos depredadores más abundantes capturados en las trampas de caída en Madrid entre 2000 y 2002.

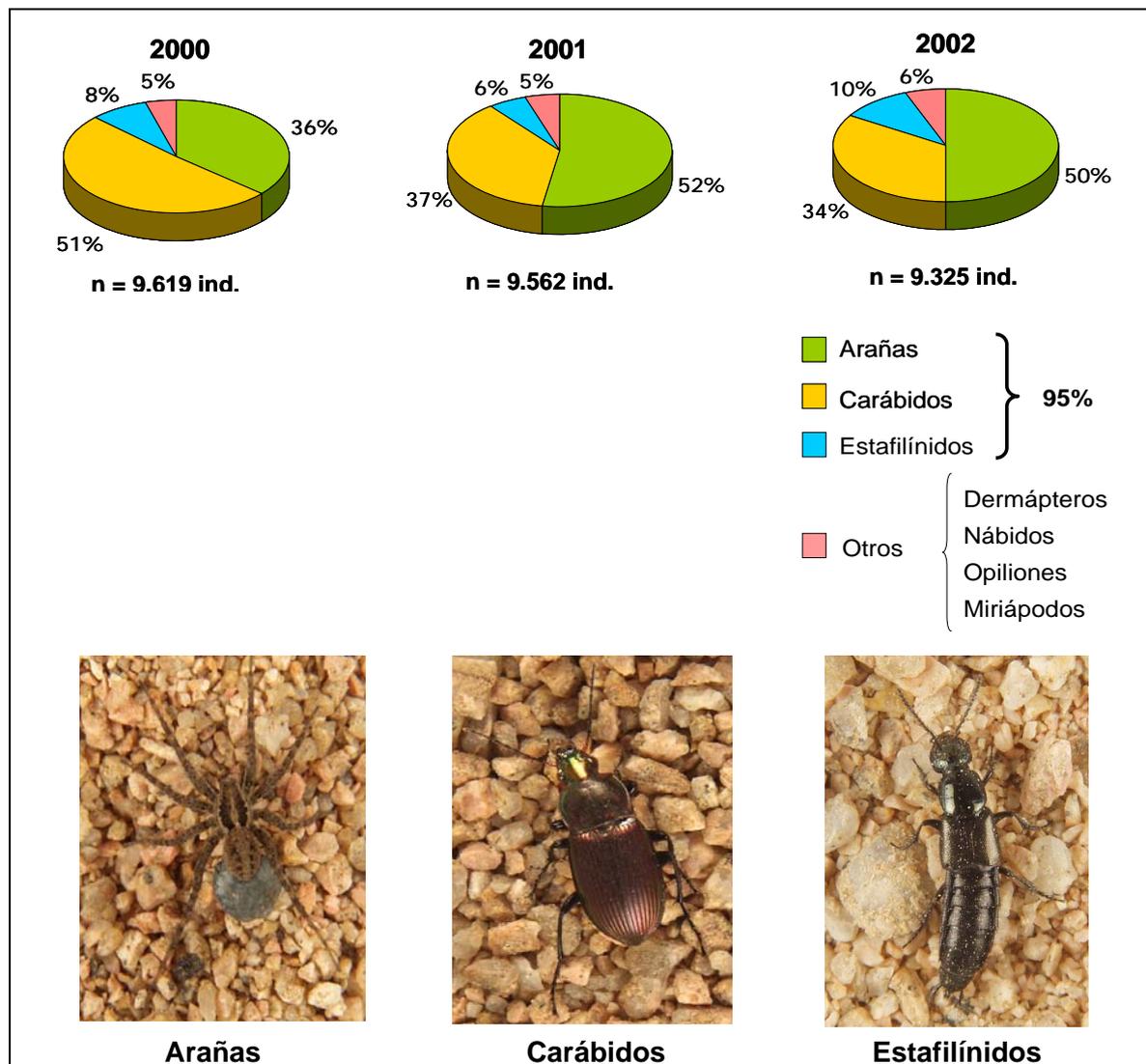
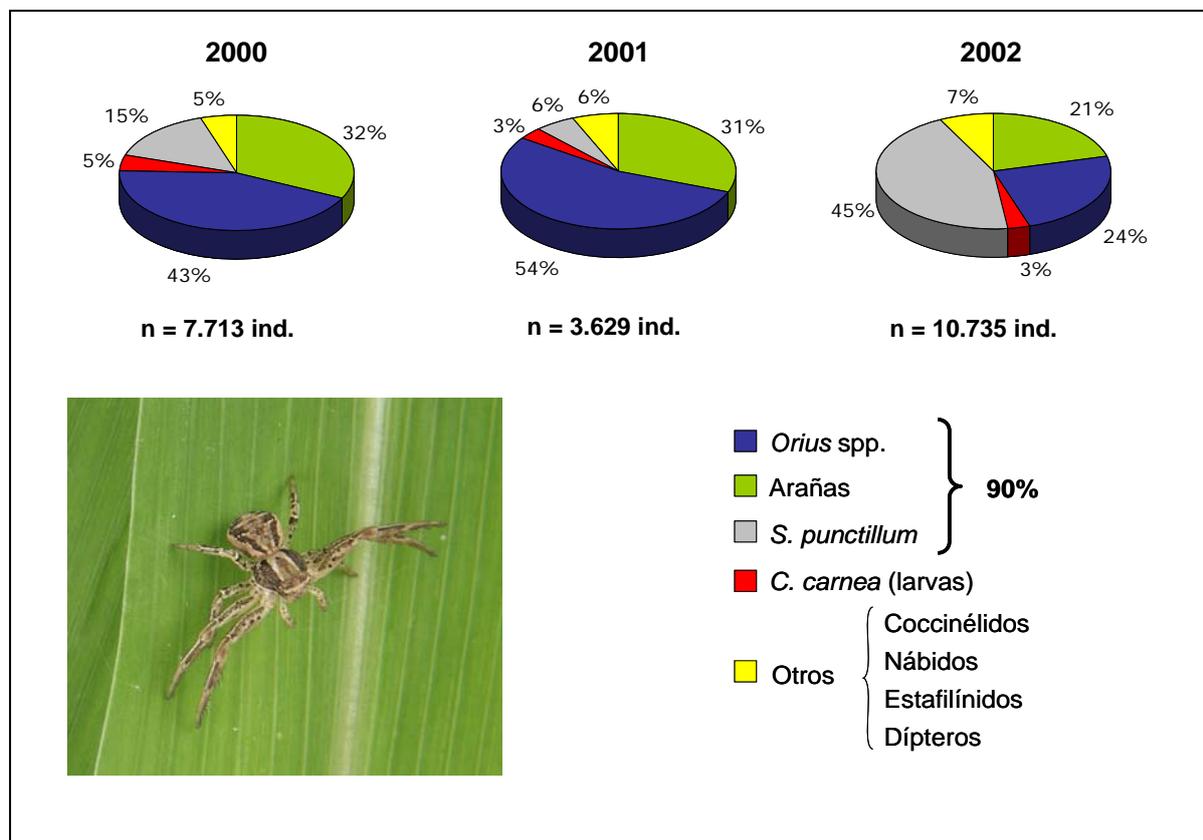


Figura 3. Artrópodos depredadores más abundantes detectados en el muestreo visual de Madrid entre 2000 y 2002.



Diversos autores han estimado la exposición de distintas especies de insectos depredadores a las toxinas Bt, detectándose la toxina Cry1Ab en especies depredadoras pertenecientes al orden Araneae y las familias Carabidae, Coccinellidae y Nabidae que habían sido recogidas en campos de maíz transgénico (Harwood *et al.*, 2005, 2007; Zwahlen y Andow, 2005). Sus resultados demostraban la transferencia de la toxina a través de la cadena trófica. Sin embargo, se desconocía el grado de exposición a la toxina de algunas de las especies de depredadores más representativas del cultivo en España. Por ello se capturaron las especies más abundantes del suelo y sobre la planta de maíz en un campo comercial de maíz transgénico en tres momentos diferentes del cultivo (antes, durante y después del momento de la polinización) y se calculó la cantidad de toxina insecticida que había en sus cuerpos. Los resultados obtenidos mostraron que la toxina expresada en el maíz Bt se podía detectar en especies de los tres grupos más abundantes

de depredadores del suelo: arañas, carábidos y estafilínidos, aunque la cantidad varió en función del momento del cultivo. De los depredadores capturados sobre la planta de maíz, la toxina se detectó en *S. punctillum*, la chinche *Orius* sp. y larvas de *C. carnea*. Sin embargo, en ningún caso se pudo detectar la toxina en los depredadores capturados en el suelo o en la planta de campos no transgénicos (Álvarez-Alfageme, 2007).

3.4. Ensayos de laboratorio con especies indicadoras

Estudios previos de laboratorio han sugerido que las toxinas Bt adquiridas a través de la presa pueden tener un efecto negativo sobre los enemigos naturales. Por este motivo se llevaron a cabo experimentos en el laboratorio con especies pertenecientes a distintos grupos funcionales que se pueden ver afectados al adquirir la toxina a través de la presa y que son muy abundantes en los maizales de la zona centro de España. Estos organismos constituyen una parte fundamental en la cadena trófica del cultivo, y al ser uno de los eslabones superiores pueden poner de manifiesto posibles perturbaciones que se produzcan en los inferiores.

Para llevar a cabo los estudios de laboratorio se escogieron tres especies de coleópteros. Las dos primeras fueron el carábido *P. cupreus*, depredador generalista que habita en el suelo y el coccinélido *S. punctillum*, depredador especialista de ácaros tetránquidos, que vive sobre la planta de maíz. Ambas especies tienen una alta exposición potencial a la toxina Cry1Ab expresada en el maíz Bt y son muy frecuentes en los maizales del centro de España (De la Poza *et al.*, 2005; Farinós *et al.*, 2008a). La tercera especie, *Atheta coriaria*, que se utiliza como agente de control biológico de larvas de dípteros, es el único estafilínido disponible de forma comercial. Esta especie pertenece a la subfamilia Aleocharinae, presente de forma habitual en distintos cultivos, entre los que se encuentra el maíz (Farinós *et al.*, 2008), y su manipulación en el laboratorio es relativamente sencilla. Estos requisitos la hacen apropiada para su utilización como especie bioindicadora. La forma más habitual que tendrían estas especies de entrar en contacto con la toxina Cry1Ab es mediante la ingestión de presas que se alimentan directamente del maíz Bt, y sus efectos pueden ser directos, debidos a la toxicidad de las proteínas Bt, o indirectos, causados por una disminución de la cantidad o de la calidad nutritiva de las presas de las que se alimentan, cuando éstas son susceptibles a la acción de las toxinas Bt. Los experimentos se realizaron en condiciones que contemplan “el peor escenario posible”, es decir, sometiendo a los depredadores a una exposición continua a la toxina Cry1Ab y superior a la esperada en condiciones de campo (Álvarez-Alfageme, 2007).

La toxina Cry1Ab se detectó tanto en las larvas del depredador generalista *P. cupreus* como en sus presas, pero el maíz Bt no tuvo ningún efecto significativo, en comparación con el control, sobre la mortalidad y tiempo de desarrollo de larvas y pupas del carábido alimentadas con larvas del lepidóptero *Spodoptera littoralis* mantenidas en maíz Bt (Álvarez-Alfageme *et al.*, 2009). En el caso del depredador especialista *S. punctillum*, la toxina se detectó en su presa, *Tetranychus urticae*, en cantidades superiores a las detectadas en la propia planta de maíz Bt. Además, se ha comprobado que la toxina llega al tubo digestivo del depredador manteniendo todo su potencial insecticida. Sin embargo, no se ha visto ningún efecto negativo sobre su biología (Álvarez-Alfageme *et al.*, 2008). La exposición del estafilínido *A. coriaria* a la toxina Cry1Ab vía *T. urticae* tampoco tuvo un efecto negativo sobre su biología y fisiología digestiva. Además, la concentración de la toxina en el cuerpo de los adultos de *A. coriaria* descendió exponencialmente tras su exposición a la presa alimentada con maíz Bt (García *et al.*, 2010). Estos resultados muestran que hay una transferencia de la toxina a través de la cadena trófica, pero en ninguno de los tres depredadores estudiados se ha observado que ésta tenga un efecto perjudicial.

3.5. Conclusiones

Los estudios del plan de seguimiento realizado en España en campos comerciales de maíz han permitido determinar en un escenario real los efectos a corto y medio plazo que puede tener el cultivo continuado del maíz Bt sobre la fauna auxiliar que coincide espacial y temporalmente con el cultivo, y aportan los conocimientos necesarios para una toma de decisiones basada en datos científicos:

- a) Las especies de depredadores que podrían servir como bioindicadoras en los programas de seguimiento del maíz Bt son: i) los generalistas *Orius* spp. y el especialista *S. punctillum* en la parte aérea; ii) los carábidos generalistas *P. cupreus*, *P. rufipes* y *P. griseus*, y la araña *P. occidentalis* en la fauna del suelo; y iii) alguna especie de estafilínido.
- b) No hemos detectado efectos negativos sobre la abundancia, riqueza y diversidad de artrópodos depredadores de las parcelas con maíz Bt en la zona Centro, a pesar de que la toxina insecticida se detecta en la mayoría de las especies que han estado expuestas a ella.

- c) Los estudios de laboratorio, realizados en el peor escenario posible (exposición continua a toxina Cry1Ab a dosis superiores a la expresada en maíz Bt) con dos depredadores generalistas presente en el suelo, *P. cupreus* y *A. coriaria*, y un especialista de la parte aérea, *S. punctillum*, indican que el maíz Bt no tiene efectos negativos en la supervivencia y desarrollo de estas especies.

En líneas generales, estos resultados coinciden con los encontrados en Lérida, así como con los obtenidos en ensayos realizados en países de Europa central, lo que sugiere que el maíz Bt puede ser compatible con los enemigos naturales presentes en diferentes zonas agroecológicas de Europa. No obstante, se considera necesario realizar ensayos a largo plazo para poder descartar posible efectos acumulativos de exposición a la toxina insecticida, estudios que están en curso dentro del Convenio CIB-CSIC y financiados con el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (MARM).

3.6. Publicaciones Científicas

Álvarez-Alfageme, F. 2007. Efectos potenciales del maíz transgénico (maíz Bt) sobre los depredadores *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae) y *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.

Álvarez-Alfageme, F., Ferry, N., Castañera, P., Ortego, F., and Gatehouse, A.M.R. 2008. Prey mediated effects of Bt maize on fitness and digestive physiology of the red spider mite predator *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). *Transgenic Research* 17: 943-954.

Álvarez-Alfageme, F., Ortego, F., and Castañera, P. 2009. Bt maize fed-prey mediated effect on fitness and digestive physiology of the ground predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Journal of Insect Physiology* 55: 143-149.

Castañera P., Ortego F. 2000. ¿Cuales son los efectos de las plantas transgénicas resistentes a plagas de insectos en el medio ambiente? ¿Matan a los insectos beneficiosos? Biotecnología en Pocas Palabras 1. Plantas Transgénicas (Preguntas y Respuestas). Sociedad Española de Biotecnología. 47 pp. Artes Gráficas G3 S.A.

Castañera P., Ortego F., Farinós G.P., Hernández-Crespo P., de la Poza M. 2004. Métodos de evaluación de los efectos potenciales del cultivo del maíz transgénico en insectos diana y en artrópodos depredadores. *Phytoma* 164: 25-28.

De la Poza M. 2004. Maíz Bt: Seguimiento de la resistencia de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) y efectos en artrópodos depredadores. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos).

De la Poza, M., Pons, X., Farinós, G.P., López, C., Ortego, F., Eizaguirre, M., Castañera, P., Albajes, R. 2005. Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protection* 24: 677-684.

Duelli, P., Obrist, M.K., Schmatz, D.R. 1999. Biodiversity evaluation in agricultural landscapes: above-ground insects. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 33-64.

Farinós, G.P., De la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P. 2008a. Diversity and seasonal phenology of aboveground arthropods in conventional and transgenic maize crops in Central Spain. *Biological Control* 44: 362-371.

Farinós, G.P., De la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P. 2008b. Diversity and temporal phenology of spiders ground beetles and rove beetles in conventional and transgenic maize of Central Spain. *IOBC/wprs Bulletin* 33: 75-78.

García, M., Ortego, F., Castañera, P. & Farinós, G.P. 2010. Effects of the exposure to the toxin Cry1Ab through Bt-maize fed prey on the performance and digestive physiology of the predatory rove beetle *Atheta coriaria*. *Biological Control* 55: 225-233.

Groot, A.T., Dicke, M. 2002. Insect-resistant transgenic plants in a multitrophic context. *Plant Journal* 31: 387-406.

Harwood, J.D., Wallin, W.G., Obrycki, J.J., 2005. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Molecular Ecology* 14: 2815-2823.

Harwood, J.D., Samson, R.A., Obrycki, J.J. 2007. Temporal detection of Cry1Ab-endotoxins in coccinellid predators from fields of *Bacillus thuringiensis* corn. *Bulletin of Entomological Research* 97: 643-648.

Icoz, I., Stotzky, G. 2008. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 559-586.

Kromp, B. 1999. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74: 187-228.

Nyffeler, M., Sunderland, K.D. 2003. Composition, abundance and pest control potential of spider communities in agroecosystems: a comparison of European and US studies. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 2013: 1-34.

Ortego, F., Pons, X., Albajes, R., and Castañera, P. 2009. European commercial genetically modified plantings and field trials. En: Environmental Impact of Genetically Modified Crops pp. 327-343. Ferry, N., and Gatehouse, A.M.R. (Eds.). CAB International.

Perry, J.N., Devos, Y., Arpaia, S., Bartsch, D., Gathmann, A., Hails, R.S., Kiss, J., Lheureux, K., Manachini, B., Mestdagh, S., Neemann, G., Ortego, F., Schiemann J., Sweet, J.B. 2010. A mathematical model of exposure of non-target Lepidoptera to Bt-maize pollen expressing Cry1Ab within Europe. *Proceedings of the Royal Society B* (en prensa).

Romeis, J., Meissle, M., Bigler, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.

Saxena, D., Flores, S., Stotzky, G. 1999. Insecticidal toxin in rood exudates from Bt corn. *Nature* 402: 480.

Zwahlen, C., Andow, D., 2005. Field evidence for the exposure of ground beetles to Cry1Ab from transgenic corn. *Environmental Biosafety Research* 4: 113-117.

En negrita aparecen las publicaciones del grupo CIB-CSIC, financiados en su totalidad o en parte por el Convenio de colaboración entre el entonces Ministerio de Medio Ambiente (actualmente MARM) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

4. EVALUACIÓN DE LOS POTENCIALES EFECTOS DEL MAÍZ MODIFICADOS GENÉTICAMENTE SOBRE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO.

Gema Val, Silvia Marín y Rafael P. Mellado

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC

Darwin 3, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid

4.1. Transferencia de genes de maíz Bt a la rizosfera de la planta y tipificación molecular de rizosfera

El objetivo general es explorar procedimientos que permitan evaluar la presencia de material genético de posible riesgo ambiental en suelos donde se cultiven maíces transgénicos como paso previo a la evaluación de la transferencia de ese material genético desde maíces transgénicos a la flora microbiológica de esos suelos, a la vez que se evalúa la posibilidad de implementar la trazabilidad molecular de esos suelos, con el fin de estudiar la utilidad de esos procedimientos para su eventual incorporación en un protocolo de seguimiento específico.

El gen que determina la resistencia a ampicilina, codificando una beta-lactamasa, ha sido utilizado como marcador en los procesos de ingeniería genética para la creación de las variedades transgénicas del maíz Bt176. Se ha puesto a punto un sistema de detección que permite determinar específicamente la presencia de ese gen en suelos, así como la de secuencias de ADN promotoras de transcripción (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) que controlan la expresión de los genes que confieren nuevas características a los maíces transgénicos. Los resultados obtenidos hasta ahora, aunque siempre hay que considerarlos provisionales, se han extendido por un periodo que ha comprendido tres ciclos de siembra y cosecha. No se ha detectado presencia alguna de secuencias de ADN específicas ni del gen de beta-lactamasa ni del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor habiéndose utilizado en los correspondientes ensayos un exceso de como mínimo 200 veces de ADN sobre el límite de detección experimental.

Los resultados obtenidos han permitido el diseño de sondas de ADN específicas de bacterias Gram positivas de posible utilidad para la trazabilidad molecular de suelos.

4.1.1. Bacterias cultivables en rizosferas de maíz transgénico y no transgénico.

De un campo donde se cultivaba maíz transgénico se extrajo ADN de rizosferas en que no se había utilizado para el cultivo en los últimos años, de suelo adherido a cepellones de maíz transgénico COMPA (Bt 176) y suelo adherido a cepellones de maíz DRACMA en Abril, Julio y Noviembre de 2001, en Abril, Julio y Noviembre de 2002 y en Abril, Julio y Noviembre de 2003, de fechas correspondientes a las fases de cosecha de 2001, 2002 y 2003 (Noviembre), aproximadamente al mes y medio de siembra (Abril) y floración (Julio) del maíz.

La presencia de bacterias resistentes a ampicilina se comprobó en todas las muestras de rizosferas por crecimiento de diluciones seriadas de las muestras en placas de agar suplementado con infusión de cerebro-corazón (BHI) en presencia de 20 µg/ml del fungicida anfotericina B para minimizar el crecimiento de hongos contaminantes. Las colonias resultantes se replicaron en placas en el mismo medio de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de ampicilina (5 µg/ml, 20µg/ml y 100 µg/ml). En todos los casos se pudo apreciar la presencia de un 70-80% de microorganismos cultivables resistentes a la concentración más baja del antibiótico, descendiendo el número de bacterias resistentes a aproximadamente un 50% en las dos concentraciones más elevadas del antibiótico. No se observaron diferencias entre rizosferas de maíz transgénico y de maíz no transgénico. Resultados parecidos se han obtenido en otros estudios independientes basados en bacterias cultivables (Badosa, E. *et al.*, 2004).

De las bacterias cuyo hábitat natural es el suelo, son las que carecen de membrana externa, algunas bacterias Gram positivas, las que pueden, de forma natural adquirir un estado fisiológico, conocido como “de competencia” que les permite incorporar ADN exógeno, sin necesidad de la existencia de transportadores estructurales (p.e. conjugación), lo que convierte a este tipo de bacterias en testigos idóneos para encontrar la posible transferencia de un gen previamente no existente en su genoma. No se han detectado bacterias viables Gram-positivas resistentes al antibiótico.

4.1.2. Diseño, validación y especificidad de cebadores para el gen de beta-lactamasa

Para el diseño de parejas de oligonucleótidos cebadores específicos para beta-lactamasa, que confiere la resistencia al antibiótico ampicilina, se construyeron árboles

filogenéticos, para identificar las beta-lactamasas evolutivamente más próximas a la codificada por el gen presente en las construcciones que se habían utilizado para la obtención del maíz transgénico (Fig.1). Cincuenta y ocho secuencias representativas se agruparon en seis grupos diferentes de acuerdo a los porcentajes de identidad relativos (Fig.1). Las secuencias para beta-lactamasas más homólogas a la del gen presente en el plásmido pUC19 (TEM-beta-lactamasa), que ha sido el utilizado en la construcción de las variedades de maíz transgénico, se encuentran agrupadas en el Grupo 1, son secuencias prácticamente idénticas, principalmente porque provienen de aislados hospitalarios que contienen todos el mismo gen. Los cebadores se diseñaron en base a diferencias teóricas de esas secuencias con las agrupadas en el Grupo 2, el más próximo evolutivamente, y lógicamente más alejadas evolutivamente de las secuencias contenidas en el resto de los Grupos.

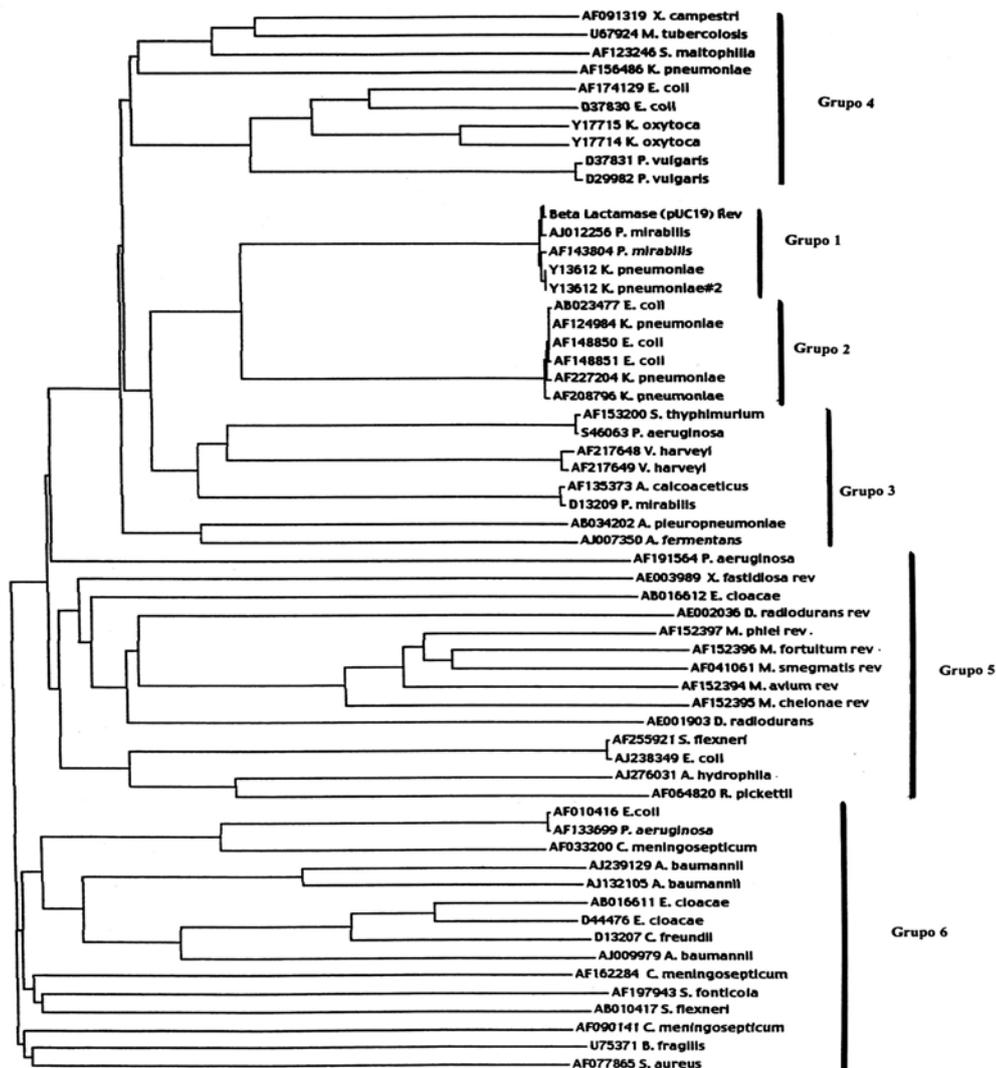


Figura 1. Árbol filogenético obtenido a partir de los alineamientos de cincuenta y ocho secuencias representativas de beta-lactamasas.

Las cuatro parejas de cebadores posibles (1F-3R, 1F-4R, 2F-3R y 2F-4R) se utilizaron en reacciones en cadena de la DNA-polimerasa (PCR) para la amplificación del gen para beta-lactamasa contenido en el plásmido pUC19, que se utilizó como molde en la reacción. Como control se realizaron las correspondientes reacciones en ausencia de molde.

La figura 2 muestra la amplificación de los fragmentos de ADN esperados en cada caso. La especificidad de las cuatro parejas de cebadores se comprobó en reacciones separadas, utilizando como molde ADN de pUC19 y de los genomas de las bacterias *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus cereus* y *Streptomyces lividans*, todas ellas bacterias cuyo hábitat natural es el suelo y que están alejadas evolutivamente de *Escherichia coli*. La figura 2 muestra que mientras que las parejas de cebadores 1F-3R y 1F-4R, no daban lugar a la amplificación inespecífica con los genomas de bacterias del género *Bacillus*, sólo la pareja 1F-3R es capaz de amplificar específicamente el gen de beta-lactamasa presente en el plásmido pUC19.

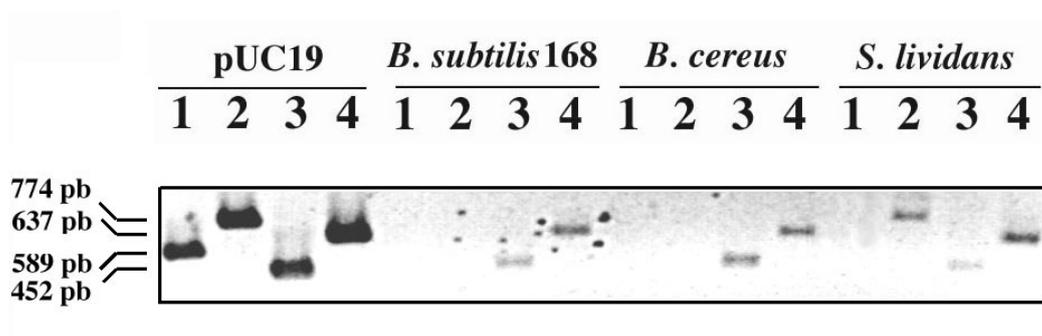


Figura 2. Amplificación por PCR del gen de beta-lactamasa por las cuatro parejas de cebadores. Sólo la pareja 1F-3R (1) es específica para las secuencias contenidas en el plásmido pUC19, produciéndose amplificaciones inespecíficas con las otras tres parejas de cebadores cuando se utiliza ADN genómico de las bacterias *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* o *Streptomyces lividans*.

4.1.3. Presencia del gen de la beta-lactamasa y del promotor 35S: Sensibilidad de detección

La capacidad de amplificación de la pareja de cebadores 1F-3R se determinó en presencia de diluciones crecientes de ADN molde del plásmido pUC19, conteniendo desde

100 pg a 10 fg de ADN en condiciones donde se permitía la ocurrencia de dos rondas de amplificación secuencial de reacción en cadena de la polimerasa (PCR secuencial). La mínima cantidad de DNA molde necesaria para la detección de material amplificado resultó ser de 1 pg, disminuyendo a 100 fg cuando 0.1 µl de la solución conteniendo el producto amplificado se utilizaron como molde para una segunda ronda de amplificación (Fig.3), que siempre se realizaba con el ADN molde en presencia de 400 ng de ADN proveniente de suelo de uso agrícola: En ningún caso se pudo detectar la presencia de secuencias codificantes de beta-lactamasa por encima del límite de detección así determinado que se puede estimar en una molécula del gen para beta-lactamasa en 7,7 µg de rizosfera.

La pareja de cebadores 35SP-F y 35SP-R se diseñó y utilizó para su utilización en la amplificación por PCR de secuencias conteniendo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor que controla la expresión de las secuencias génicas que confieren nuevas propiedades a las variedades DRACMA y COMPA de maíz.

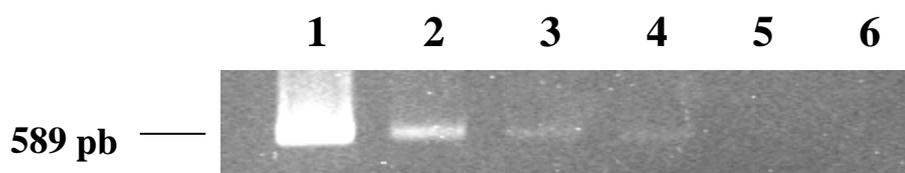


Figura 3. Amplificación mediante PCR escalonada (19 ciclos en la primera ronda de amplificación y 15 ciclos en la segunda ronda de amplificación) utilizando como molde 400ng de ADN extraído de suelo sin cultivo mezclado con 100 pg de pUC19 (1), 10 pg de pUC19 (2), 1 pg de pUC19 (3), 100 fg de pUC19 (4), 400 ng de ADN de suelo sin cultivo (5) y en ausencia de molde (6). El tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos se indica en el lado izquierdo.

La capacidad de amplificación de la pareja de cebadores 35S-F y 35S-R se determinó en presencia de diluciones crecientes (conteniendo desde 1pg a 10 ag) de ADN molde del plásmido pBI221. La mínima cantidad de DNA molde necesaria para la detección de material amplificado resultó ser de 100 fg, disminuyendo a 10 fg cuando 0.1 µl de la solución conteniendo el producto amplificado se utilizaron como molde para una segunda ronda de amplificación (Fig.4), que siempre se realizaba con el ADN molde en presencia de 400 ng de ADN proveniente de suelo de uso agrícola. En ningún caso se pudo detectar la

presencia de secuencias conteniendo el promotor 35S por encima del límite de detección así determinado, que se puede estimar en una molécula de las secuencias que contienen el promotor 35S por en 0,5 µg de rizosfera.

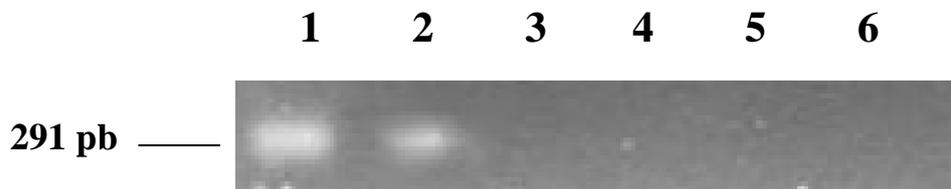


Figura 4. Amplificación mediante PCR escalonada (19 ciclos en la primera ronda de amplificación y 15 ciclos en la segunda ronda de amplificación) utilizando como molde 400ng de ADN extraído de suelo sin cultivo mezclado con 100 fg de pBI211 (1) 10 fg de pBI211 (2), 1fg de pBI211 (3), 0,1 fg de pBI211(4), 400 ng de ADN de suelo sin cultivo (5) y en ausencia de molde (6). El tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos se indica en el lado izquierdo.

4.2. Efecto estimulador de las bacterias del suelo Gram positivas en el crecimiento de plantas

Los microorganismos que forman parte de la rizosfera son importantes para el crecimiento de la planta. La composición química de los suelos afecta a las poblaciones de microorganismos que forman parte de la rizosfera, al punto de que alteraciones en la composición del suelo pueden causar cambios importantes en la microflora de las rizosferas. Las comunidades microbiológicas presentes en la rizosfera fluctúan con el desarrollo de la planta y con la reutilización de suelos agrícolas.

Entre las bacterias Gram positivas naturalmente presentes en la rizosfera, las del género *Bacillus* y *Streptomyces* son, normalmente aceptadas como representativas, habiéndose utilizado comercialmente como inoculantes que favorecen el crecimiento de plantas (maíz entre ellas) y que en algún caso son aislados de rizosferas naturales (Wipat and Hardwood, 1999). En nuestro laboratorio hemos escogido la estirpe *Bacillus subtilis* 168 como estirpe modelo, ya que su genoma ha sido secuenciado completamente (Kunst *et al.*, 1997) y se ha realizado un análisis funcional del mismo por dos consorcios europeos

en los que nuestro laboratorio ha participado (Kunst *et al.*, 1997; Kabayashi *et al.*, 2003). Se ha puesto a punto un sistema modelo para estudiar la interacción de *Bacillus subtilis* con semillas pregerminadas de trigo (cereal) y alfalfa (leguminosa), dos cosechas de cultivo abierto, de crecimiento relativamente rápido y abordable en condiciones de laboratorio (incubadores, invernadero) y de amplia utilización en alimentación humana y/o animal, como cosechas modelo, habiéndose obtenido resultados similares con ambos tipos de plantas (Mellado, 2003). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5, donde se puede apreciar claramente el efecto beneficioso de *Bacillus subtilis* 168 en el crecimiento del trigo y en el de la alfalfa y, en este caso, tanto cuando las semillas se incuban con la bacteria salvaje, como cuando se hace con un mutante en uno de los posibles genes de la bacteria que podrían estar implicados en el proceso (Fig. 5). Las bacterias llegan a interactuar con la semilla como se puede observar cuando el experimento se realiza con *Bacillus subtilis* que expresa en gen de la proteína fluorescente verde, que permite visualizar en el microscopio de fluorescencia como las bacterias se sitúan en la periferia de la semilla sobreponiendo su fluorescencia a la verde natural de la planta (Fig.6).



Figura 5. Plantas de trigo (izquierda) y de alfalfa (derecha) crecidas en presencia de *B.subtilis* 168 (+ w), de *B.subtilis* 168 (*yjeA*) (+m) o en ausencia de la bacteria (-). La mejora del crecimiento se puede observar tanto en la parte aérea como en la radicular, si bien en el caso de alfalfa, es menos manifiesta en plantas inoculadas con la bacteria mutante que en las inoculadas con la bacteria salvaje.

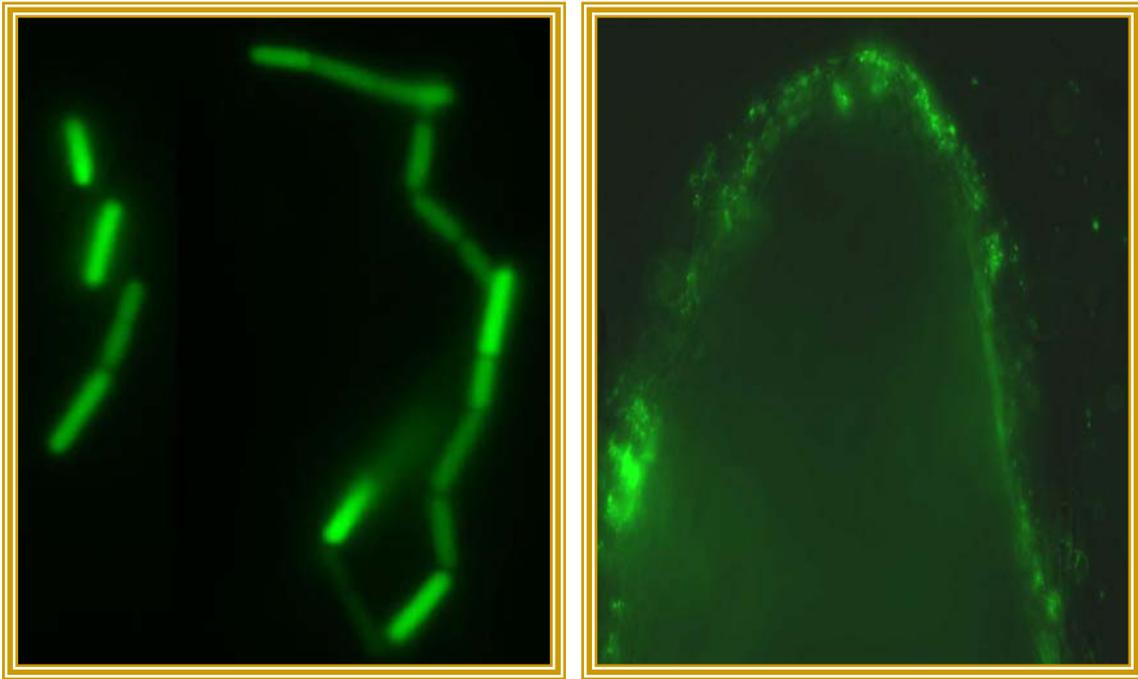


Figura 6. *Bacillus subtilis* expresando el gen de la proteína fluorescente verde (izquierda) se incubó con la semilla de alfalfa y la preparación se examina en el microscopio de fluorescencia (derecha).

4.3. Caracterización microbiológica de la rizosfera: Trazabilidad molecular de rizosferas.

El apartado anterior claramente demuestra que la asociación de los microorganismos presentes en la rizosfera con las plantas existe y que esa presencia puede tener efectos beneficiosos para el crecimiento de las mismas. Tan sólo un reducido número de los microorganismos presentes en el suelo es cultivable en el laboratorio (Torsvik *et al.*, 1990), de forma que la gran parte de los microorganismos presentes en las rizosferas son desconocidos.

La sensibilidad obtenida en la estimación de la presencia del gen de beta-lactamasa o de las secuencias del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en la rizosfera de maíces transgénicos, ha permitido el abordaje de la caracterización a nivel molecular de los componentes de la rizosfera mediante el diseño de sondas (cebadores) de oligonucleótidos apropiadas que permitiesen la amplificación por la reacción en cadena de la ADN polimerasa de secuencias de ADN pertenecientes a microorganismos del suelo sin necesidad de cultivarlos en el laboratorio.

Las secuencias de rADN 16S de 74 bacterias diferentes se obtuvieron de las bases de datos y se utilizaron para el diseño de sondas oligonucleotídicas de posible utilidad en la trazabilidad molecular de suelos. Se han diseñado así parejas de cebadores específicas para al menos 9 géneros conocidos, otras tantas parejas de cebadores específicas para al menos 40 especies conocidas y su capacidad para amplificar secuencias específicas de las preparaciones de ADN de los diferentes suelos fue evaluada. Las sondas diseñadas fueron previamente validadas utilizando para ello ADN de algunas de las 41 especies bacterianas diferentes obtenidas de la *American Type Culture Collection* o pertenecientes a la colección del laboratorio.

La figura 7 ilustra la capacidad de las parejas de cebadores SMC1-SMC2, SMC 3-SMC4 y SMC5-SMC6 para amplificar fragmentos de ADN de tamaños definidos. Sin embargo, los resultados no permitieron aumentar la sensibilidad de detección ya obtenida.

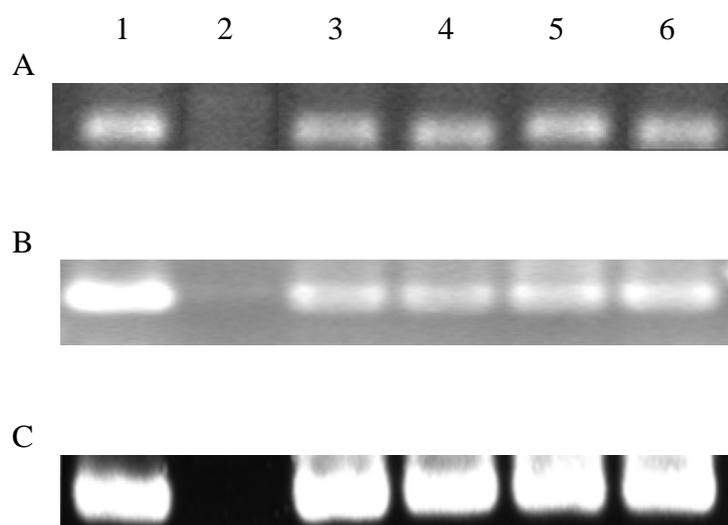


Figura 7. Amplificación mediante PCR utilizando, en cada caso, como molde 400 ng. de ADN extraído de *Streptomyces lividans* (1), control negativo en ausencia de ADN (2), ADN extraído de suelo donde se ha cultivado de la variedad COMPA (3), la variedad DRACMA (4) o sin cultivar de dos localizaciones diferentes (5, 6) y como cebadores las parejas de oligonucleótidos SMC1-SMC2 (A), SMC3-SMC4 (B) y SMC5-SMC6 (C).

4.4. Trazabilidad molecular de rizosferas: Hacia la determinación de un paisaje genómico

4.4.1. Introducción

El objetivo general de los trabajos hasta ahora descritos en este capítulo ha sido explorar procedimientos que permitan evaluar la presencia de material genético de posible riesgo ambiental en suelos donde se cultiven maíces transgénicos como paso previo a la evaluación de la transferencia de ese material genético desde maíces transgénicos a la flora microbiológica de esos suelos, a la vez que se evalúa la posibilidad de implementar la trazabilidad molecular de esos suelos, con el fin de estudiar la utilidad de esos procedimientos para su eventual incorporación en un protocolo de seguimiento específico.

Los análisis realizados utilizando la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) con protocolos de trabajo específicos diseñados, permiten concluir que la presencia de secuencias de ADN codificantes del gen de beta-lactamasa se encuentra por debajo de los niveles de detección. La misma conclusión es aplicable a las secuencias de ADN conteniendo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. El ADN del suelo empleado en las reacciones de amplificación se encuentra en un exceso aproximado de 259 (beta-lactamasa) y 4000 (promotor 35S) veces sobre los correspondientes niveles de detección, de forma que una secuencia codificante del gen de beta-lactamasa podría detectarse si estuviera presente en 7.7 µg (0.77 µg ocasionalmente) de tierra y una secuencia codificante del promotor S35 del virus del mosaico de la coliflor sería detectable en tan sólo 0.5 µg de tierra.

Adicionalmente, en el año 2004, se inició el diseño, validación y estudio de especificidad de cebadores que puedan permitir una la trazabilidad molecular de los suelos donde se cultiven organismos modificados genéticamente. La comparación de secuencias de rADN 16S de 74 bacterias diferentes del suelo ha permitido el diseño de parejas de cebadores que han mostrado ser útiles para la amplificación específica de fragmentos de ADN directamente de muestras del suelo, aunque no aumentaron la sensibilidad de detección.

La utilización de micromatrices de ADN de genomas completos de rizobacterias disponibles comercialmente ha permitido el diseño de nuevas estrategias y metodologías así como el desarrollo de protocolos de análisis que permitan avanzar en la caracterización molecular de las rizosferas de plantas genéticamente modificadas.

4.4.2. Utilización de micromatrices de ADN de genomas bacterianos completos

La aplicación de técnicas basadas en el uso de ácidos nucleicos ha mostrado ser una herramienta muy útil en el avance de la caracterización de los microorganismos presentes en hábitats naturales (Ammann *et al.*, 1995). Desde el punto de vista biológico el suelo es un medio ambiental particularmente complejo y variable. Los estreptomicetos son unas de las bacterias del suelo más numerosas y ubicuas, productores de complejos enzimáticos de enzimas extracelulares que interaccionan con la planta (Hodgson, 2000). Cepas de *Bacillus subtilis* se han detectado en las rizosferas como productoras de factores estimulantes del crecimiento de plantas (Mellado, 2003) y existen comercialmente inoculantes de semillas que contienen cepas de *Bacillus* para favorecer el crecimiento de las semillas una vez germinadas.

Hemos adaptado micromatrices comercialmente disponibles de genomas completos de *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* adaptando los mismos y evaluando su uso para la monitorización de comunidades de rizobacterias de maíz transgénico productor de la toxina Bt. Cultivares de COMPA CB, de dos variedades de MON 810 y de sus correspondientes líneas isogénicas en tres localizaciones diferentes, Cabañas del Ebro (Zaragoza), Malpica de Tajo (Toledo) y Yunquera de Henares (Guadalajara), fueron recolectadas a diferentes estados del crecimiento y sus rizosferas analizadas. Los experimentos realizados con Bt176 (Zaragoza) lo fueron durante 2005. Desde 2006 el cultivo del maíz Bt176 dejó de estar permitido en la UE. Las muestras del cultivar de MON810 de Toledo fueron recogidas en 2005 y las de Guadalajara en 2006.

4.4.2.1. Sensibilidad de detección

El mismo número de moléculas de ADN genómico de *Bacillus subtilis* fueron marcadas en reacciones independientes con un fluoróforos diferentes, conteniendo una de ellas concentraciones crecientes de un gen específico (*csn*). Las diferentes mezclas se hibridaron con las micromatrices conteniendo el genoma completo de *Bacillus subtilis* y el grado de detección del número de copias del gen *csn* determinado en cada caso. La figura 8A muestra que la presencia de sólo 5 copias del gen *csn* permite su detección sin ambigüedad sobre el fondo de hibridación homóloga; una sensibilidad que no difiere en esencia de la que puede ofrecer la reacción en cadena de la ADN polimerasa en tiempo real (RT-PCR; Fig. 8B).

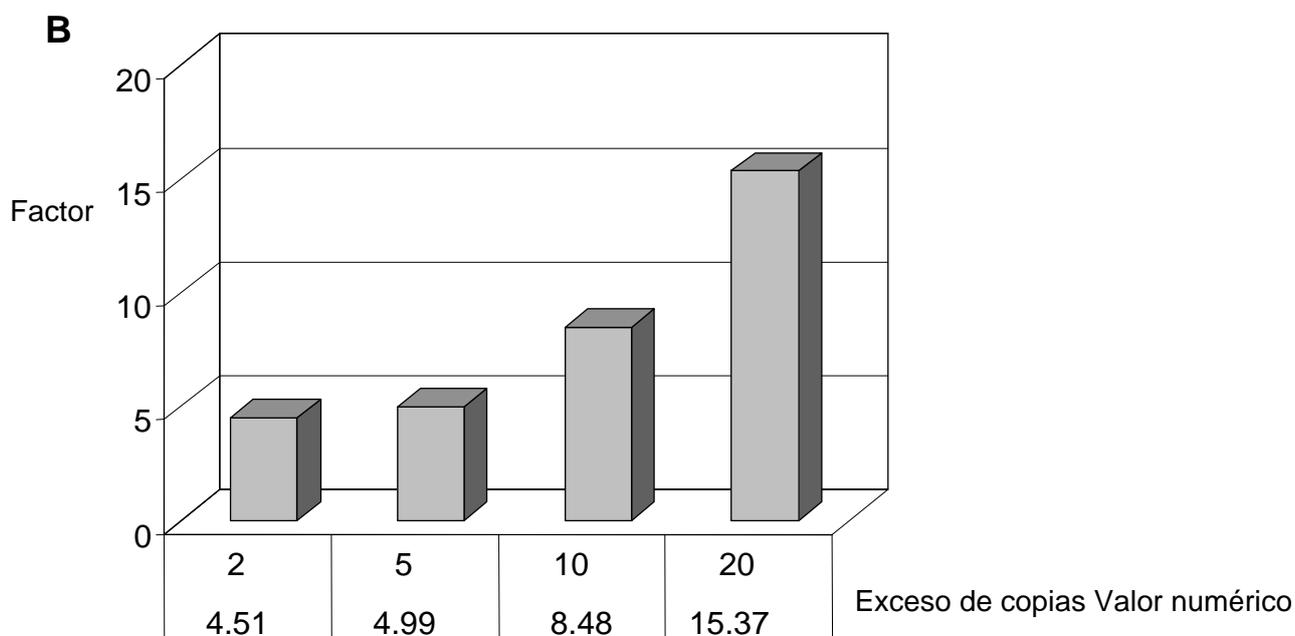
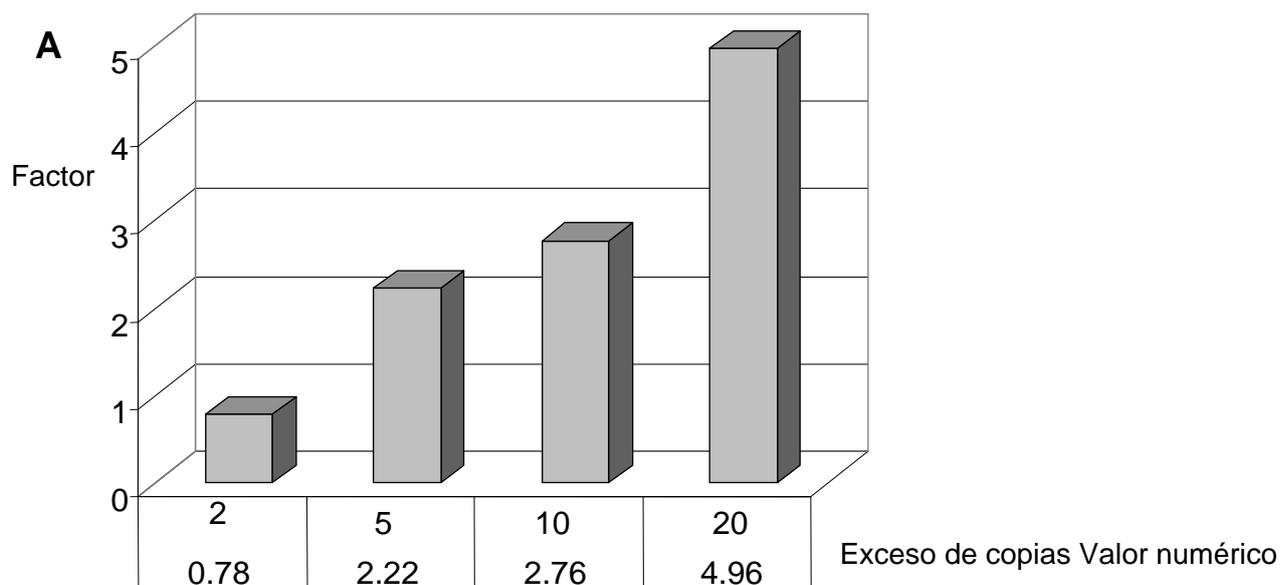


Figura 8. Sensibilidad de detección. (A) Detección diferencial del gen *csn* de *B. subtilis* hibridando en un exceso de 2, 5, 10 and 20 copias sobre la copia única presente en el genoma de *B. subtilis* usando micromatrices de ADN de genoma completo de *B. subtilis*. (B) Amplificación diferencial por PCR en tiempo real cuando el gen *csn* y el genoma de *B. subtilis* se mezclaron en las mismas proporciones que en (A). Los valores numéricos del factor de cambio se indican en cada caso.

4.4.2.2. Efecto de la toxina Bt en las rizobacterias del maíz

Las micromatrices de ADN conteniendo los genomas completos de *S. coelicolor* y *B. subtilis* se utilizaron en análisis de hibridación diferenciales de ADN extraído de las rizosferas de maíz transgénico y no transgénico de los distintos cultivares, marcados con diferentes fluoróforos, en experimentos realizados por triplicado. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las hibridaciones de ADN de rizosferas transgénicas y no transgénicas (Fig. 9) lo que sugiere que la toxina Bt liberada en los exudados de la raíz del maíz transgénico o resultante de la descomposición de tejido de la planta o de ambos, no afecta a las bacterias presentes en esa rizosfera.

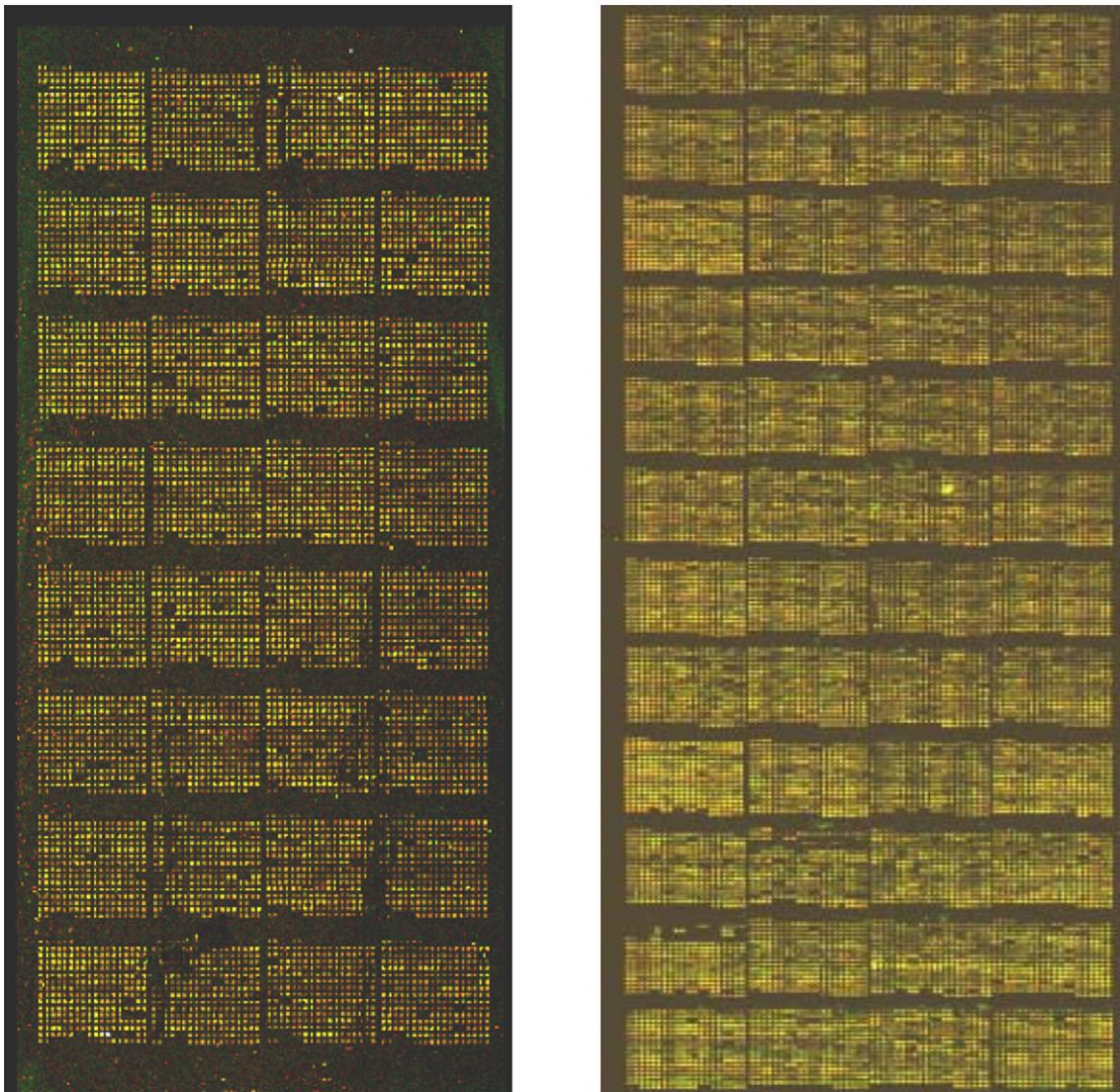


Figura 9. Efecto de la toxina Bt en las rizobacterias del maíz. Hibridación de ADN procedente de rizosferas de plantas transgénicas y no transgénicas con el ADN genómico completo contenido en las micromatrices de *Bacillus subtilis* (izquierda) o *Streptomyces coelicolor* (derecha). No se detectaron diferencias significativas en ningún caso.

4.4.2.3. Huella molecular de rizosferas

Las micromatrices de ADN de genoma completo de *S. coelicolor* y *B. subtilis* contienen sondas específicas para las correspondientes 7.515 y 3.986 secuencias codificantes respectivas. La hibridación de ADN extraído de rizosferas marcado fluorescentemente con el correspondiente ADN genómico igualmente marcado con otro fluoróforo produjo resultados diferenciales según el campo de procedencia y el tipo de micromatriz utilizada en los análisis, *B. subtilis* (Fig. 10) o *S. coelicolor* (Fig. 11) tomando como valor significativo un cambio de 2 veces en sentido positivo o negativo en la detección de la correspondiente hibridación para cada gen en particular. Los resultados diferenciales obtenidos se confirmaron cuando el ADN utilizado en los análisis provenía de muestras de la correspondientes rizosferas enriquecidas en las bacterias cultivables de las mismas (Tablas 2 y 3).

El bajo número de coincidencias en los genes detectados provenientes de muestras extraídas directamente de la rizosfera o de muestras enriquecidas en el laboratorio (tercera columna de las Tablas 1 y 2), denota que los resultados diferenciales son debidos en buena parte a rizobacterias no cultivables. Las diferencias en número total de genes detectados en las diferentes localizaciones se deben a la distinta composición química de los suelos. Así, el contenidos en carbono de los campos de Guadalajara y Toledo son más parecidos entre sí (2.13%, 2.22%, respectivamente) que el de Zaragoza (4.88%), al igual que en los contenidos de hidrógeno, 0.48%, 0.50% y 0.67% y de nitrógeno, 0.14%, 0.10% y 0.18% correspondientes a los campos de Guadalajara, Toledo y Zaragoza, respectivamente. De tal manera que el número de genes compartidos por las distintas rizosferas es considerablemente mayor entre las localizaciones de Guadalajara y Toledo que entre cualquiera de ellas y la de Zaragoza (Tablas 3 y 4).

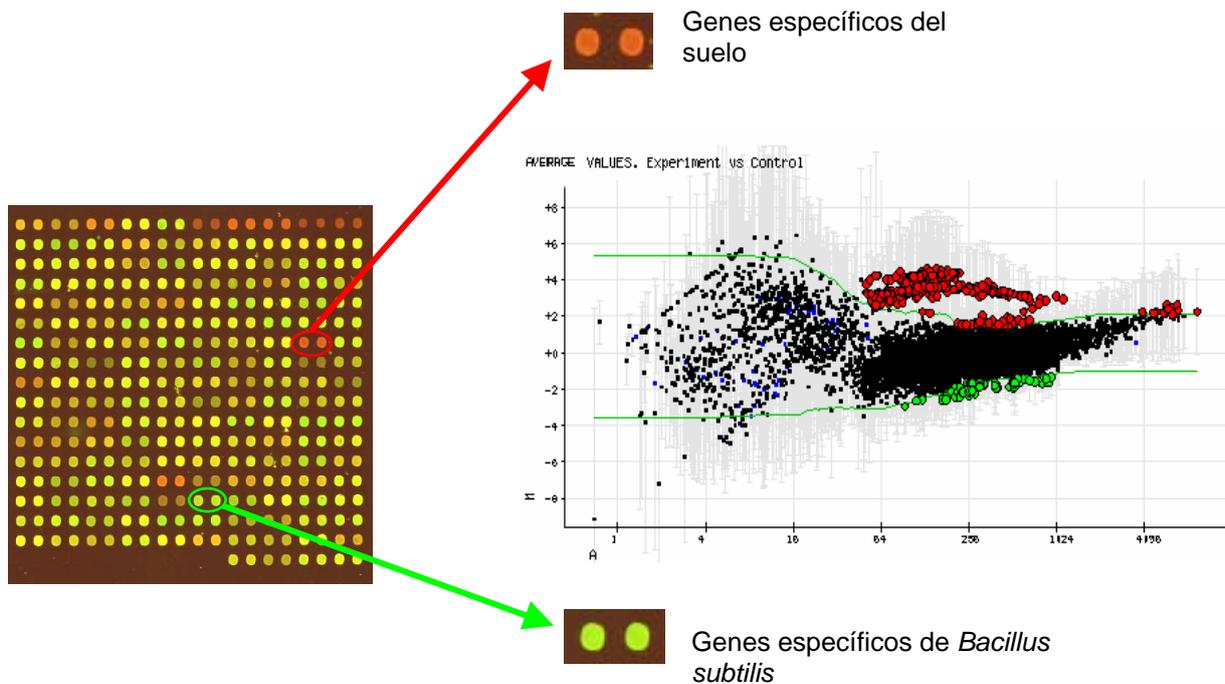


Figura 10. Hibridación diferencial utilizando micromatrices de genoma completo de *Bacillus subtilis*. Las sondas de *B. subtilis* presentes en la micromatriz que son desplazadas en la hibridación por las secuencias de ADN del suelo se revelan en color rojo. Las sondas no desplazadas en color verde. Sondas que hibridan con secuencias de ADN del suelo y con secuencias de ADN de *B. subtilis* determinan la aparición de color amarillo.

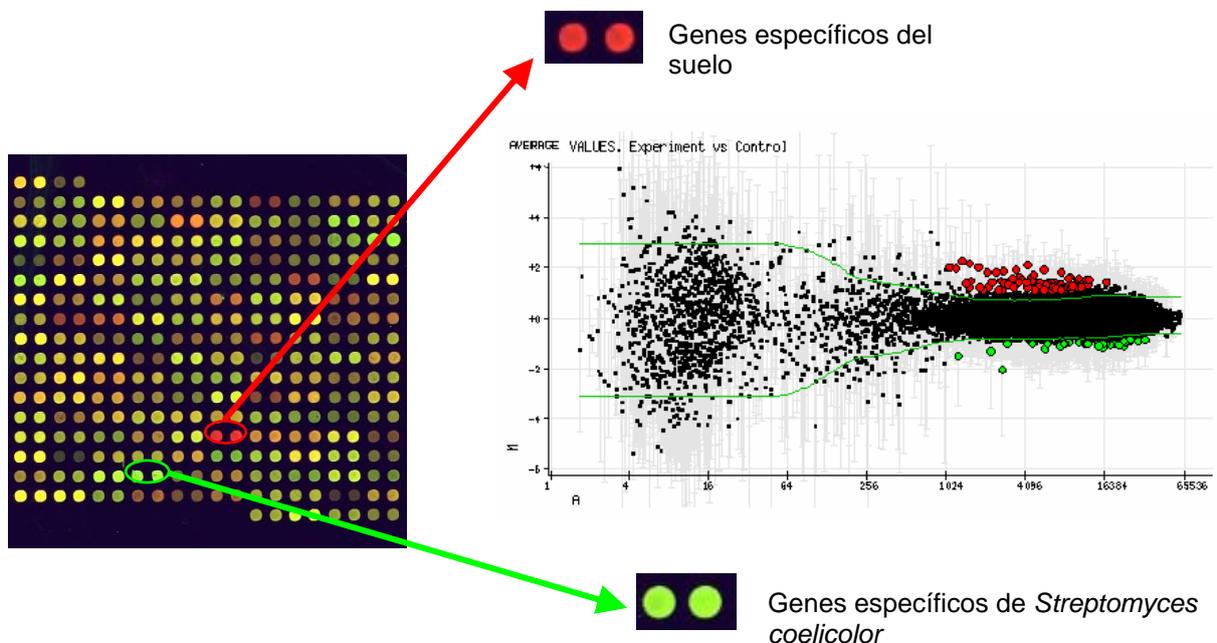


Figura 11. Hibridación diferencial utilizando micromatrices de genoma completo de *Streptomyces coelicolor*. Las sondas de *S. coelicolor* presentes en la micromatriz que son

desplazadas en la hibridación por las secuencias de ADN del suelo se revelan en color rojo. Las sondas no desplazadas en color verde. Sondas que hibridan con secuencias de ADN del suelo y con secuencias de ADN de *S.coelicolor* determinan la aparición de color amarillo.

Tabla 1. Hibridación diferencial de ADN de rizobacterias de las tres localizaciones con ADN genómico de *B. subtilis* usando micromatrices de genoma completo de ADN de *B. subtilis*.

Localización	Factor de cambio	ADN rizobacterias	ADN enriquecido	Coincidencias
Guadalajara	superior a 2	98	287	31
	Inferior a -2	232	504	83
Zaragoza	superior a 2	7	37	0
	Inferior a -2	7	3	1
Toledo	superior a 2	184	879	163
	Inferior a -2	603	955	564

Número de genes observado hibridando diferencialmente cuando preparaciones de ADN de rizobacterias o de rizobacterias cultivadas (enriquecido) se hibridaron con ADN genómico de *B. subtilis* en cada una de las localizaciones indicadas. El número de genes coincidentes se indica en la última columna.

Tabla 2. Hibridación diferencial de ADN de rizobacterias de las tres localizaciones con ADN genómico de *S. coelicolor* usando micromatrices de genoma completo de ADN de *S. coelicolor*.

Localización	Factor de cambio	ADN rizobacterias	ADN enriquecido	Coincidencias
Guadalajara	superior a 2	7	332	5
	Inferior a -2	5	437	2
Zaragoza	superior a 2	8	217	0
	Inferior a -2	2	106	0
Toledo	superior a 2	87	318	43
	Inferior a -2	56	305	23

Número de genes observado hibridando diferencialmente cuando preparaciones de ADN de rizobacterias o de rizobacterias cultivadas (enriquecido) se hibridaron con ADN

genómico de *S. coelicolor* en cada una de las localizaciones indicadas. El número de genes coincidentes se indica en la última columna.

Tabla 3. Número de genes comunes en las diferentes localizaciones utilizando micromatrices de ADN de genoma completo de *B. subtilis*.

ADN Factor de cambio	ADN rizobacterias		ADN enriquecido	
	superior a 2	Inferior a -2	superior a 2	Inferior a -2
Localización				
G+Z+T	0	1	2	1
G+Z	0	1	9	2
G+T	20	106	228	459
Z+T	0	3	4	1

Coincidencias en las localizaciones de Guadalajara, Zaragoza y Toledo (G+Z+T), Guadalajara y Zaragoza (G+Z), Guadalajara y Toledo (G+T) y Zaragoza y Toledo (Z+T) cuando preparaciones de ADN de rizobacterias o de rizobacterias cultivadas (enriquecido) se hibridaron con ADN genómico de *B. subtilis* en cada una de las localizaciones indicadas.

Tabla 4. Número de genes comunes en las diferentes localizaciones utilizando micromatrices de ADN de genoma completo de *S. coelicolor*

ADN Factor de cambio	ADN rizobacterias		ADN enriquecido	
	superior a 2	Inferior a -2	superior a 2	Inferior a -2
Localización				
G+Z+T	1	0	47	25
G+Z	0	0	74	43
G+T	2	2	182	186
Z+T	3	0	65	32

Coincidencias en las localizaciones de Guadalajara, Zaragoza y Toledo (G+Z+T), Guadalajara y Zaragoza (G+Z), Guadalajara y Toledo (G+T) y Zaragoza y Toledo (Z+T) cuando preparaciones de ADN de rizobacterias o de rizobacterias cultivadas (enriquecido) se hibridaron con ADN genómico de *S. coelicolor* en cada una de las localizaciones

4.5. Conclusiones

La utilización de micromatrices de ADN de genoma completo de rizobacterias permite detectar la presencia de secuencias de ADN en muestras del suelo relacionadas con los cerca de 4.000 u 8.000 genes presentes en las respectivas micromatrices de *B. subtilis* y *S. coelicolor*, de los que los genes para el RNA ribosómico y de transferencia han sido excluidos, con una sensibilidad razonable sobre el fondo de hibridación (Val *et al.*, 2009). El uso combinado de micromatrices de genoma completo de éstos y otros microorganismos del suelo bien caracterizados cuando estén comercialmente disponibles debería proporcionar un método sensible de monitorización molecular de rizosferas. La técnica de micromatrices de genoma completo presenta algunas ventajas sobre otros métodos disponibles. Así, no está sujeta a los sesgos sistemáticos de los métodos que utilizan la reacción en cadena de la ADN polimerasa con sondas para la detección exclusiva de secuencias de genes codificantes de ARN ribosómico, no requiere un secuenciador de ADN y puede ser fácilmente adaptada para su uso en cualquier laboratorio que pueda tener acceso a un rastreador de micromatrices, cuyo uso está cada vez más extendido para estudios de expresión génica en muchos organismos modelo. La extensión del uso de micromatrices de genoma completo a otros cultivos además del maíz, demostrará la utilidad de esta técnica para monitorizar el impacto de la gestión de suelos agrícolas a largo plazo.

4. 6. Publicaciones Científicas

Amann R.I, Ludwig W, Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143- 169.

Badosa, E., Moreno, C. and Montesinos, E. 2004. Lack of detection of ampicillin resistance gene transfer from Bt176 transgenic corn to culturable bacteria under field's conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 169-178.

Hodgson, D. A. 2000. Primary metabolism and its control in *Streptomyces* a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 42, 47-238.

Kobayashi K., Ehrlich S.D., Albertini A., Amati G., Andersen K.K., Arnaud M., Asai K., Ashikaga S., Aymerich S., Bessieres P., Boland F., Brignell S. C., Bron S., Bunai K., Chapuis J., Christiansen L.C., Danchin A., Débarbouillé M., Dervyn E., Deuerling E., Devine K., Devine, S.K. , Dreesen, O., Errington J., Fillinger S. , Foster S.J., Fujita Y., Galizzi A., Gardan R., Eschevins, C. Fukushima T.,

Haga K., Harwood C. R., Hecker M., Hosoya D., Hullo M.F., Kakeshita H., Karamata D., Kasahara Y., Kawamura F., Koga K., Koski, P., Imamura D., Ishimaru M., Ishikawa S., Ishio I., Le Coq D., Mason A., Meima R., Mellado R.P., Moir A., Moriya S., Nagakawa E., Nanamiya H., Nakai S., Nygaard, P., Ogura M., Ohanan T., O'Reilly, M., O'Rourke M., Pragai Z., Rapoport G., Rawlins, J.P., Rivas, L.A. Sadaie A., Sadaie Y., Sarvas M., Sato T., Saxild H.H., Scanlan E., Schumann W., Seegers J.F.M.L., Sekiguchi J., Sekowska A., Séror S., Simon M., Stragier P., Takamatsu H , Tanaka T., Takeuchi M., Thomaides, H.B., Vagner V., van Dijl JM., Watabe K., Wipat A., Yamamoto H., Yamamoto M., Yamamoto Y., Yamane K., Yata K., Yoshida K.1 Yoshikawa H., Zuber U. and Ogasawara, N. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4678-4683.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini A., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M-G., Bessieres P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S.-K., Codani, J.-J., Connerton, I. F. , Coward, E., Cummings, N. J., Daniel, R. A. , Denizot, F., Devine, K. M., Düsterhöft, A.S. D. Ehrlich, Emmerson, P. T., Entian, K. D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y. , Fuma, S. , Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.-Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E. J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B. J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C. R., Hénaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.-F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.-M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauël, C., Médigue, C., Medina, N., Mellado, R. P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.-H., Parro, V., Pohl, T. M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A. M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Serror, P., Shin, B.-S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.-F., Zumstein, E., Yoshikawa H. and Danchin, A. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.

Mellado, R. P. 2003. *Bacillus subtilis* from soil to the laboratory and back. *Recent Research Developments in Microbiology* 7, 1-11.

Torsvik, V., Goksoyr, J. and Daae, F.L. (1990). High diversity DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 782-787.

Val, G., Marín, S. and Mellado, R.P. 2009. A sensitive method to monitor *Bacillus*

***subtilis* and *Streptomyces coelicolor*-related bacteria in maize rhizobacterial communities: The use of genome-wide microarrays. *Microbial Ecology* 58,108-115.**

Wipat A. and Harwood, C.R. 1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 1-9.

En negrita aparecen las publicaciones del grupo CNB-CSIC, financiadas en su totalidad por el Convenio de colaboración entre el entonces Ministerio de Medio Ambiente (actualmente MARM) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

5. ENSAYOS DE CAMPO CON CULTIVOS TRANSGÉNICOS TOLERANTES A HERBICIDAS EN PROCESO DE APROBACIÓN: EVALUACIÓN DE LOS POTENCIALES EFECTOS DE LOS HERBICIDAS SOBRE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO.

Jorge Barriuso, Silvia Marín y Rafael P. Mellado

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC.

Darwin 3, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid

5.1 Introducción

Las rizosferas contienen diversas comunidades microbianas que son responsables de procesos metabólicos que afectan directamente al crecimiento y a la viabilidad de las plantas, dependiendo de los componentes nutricionales particulares presentes en los suelos naturales. Una práctica agrícola corriente es el uso de compuestos químicos agresivos (herbicidas) para impedir el crecimiento de indeseables malas hierbas en los cultivos. La comunidad bacteriana del suelo es un importante elemento que afecta a la calidad del suelo, y, por lo tanto, la presencia del herbicida en el suelo agrícola y su potencial efecto es de particular relevancia. Las comunidades rizobacterianas pueden potencialmente verse afectadas por la presencia de herbicidas rutinariamente utilizados en cultivos extensivos y, en particular, cuando se utilizan herbicidas sistémicos de amplio espectro, como es el caso del glifosato (2-(fosfometil) glicina) utilizado para combatir la proliferación de malas hierbas en cultivos de maíz genéticamente modificado para ser tolerante a este herbicida.

Las técnicas basadas en ácidos nucleicos han demostrado ser herramientas muy útiles para avanzar en la caracterización de microorganismos en su hábitat natural (Amann *et al.*, 1995). Entre ellas, la amplificación por la reacción en cadena de la ADN-polimerasa (PCR) de genes que determinan la síntesis del ARN ribosómico (rADN) directamente de muestras del suelo, combinada con electroforesis en geles desnaturalizantes en gradiente (DGGE) y determinación de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (TRFLP) se han utilizado extensivamente para estudiar cambios en la diversidad de las comunidades microbianas (Anderson and Cairney, 2004). Las técnicas basadas en hibridación de micromatrices de ADN de genoma completo se han utilizado con éxito para el análisis de comunidades microbianas (Val *et al.*, 2009, ver capítulo 4). Adicionalmente, se ha utilizado la pirosecuenciación masiva de regiones hipervariables de subunidades de genes que determinan la síntesis de rARN para estudiar la composición y diversidad de

comunidades microbianas presentes en diversas localizaciones, entre ellas bosques y suelos naturales (Roesch *et al.*, 2007).

Para determinar el efecto potencial que el uso de glifosato (Roundup®Plus; 360 g/l de glifosato) aplicado en post-emergencia, pueda tener en el cultivo de la línea de maíz NK603 (que es tolerante a este herbicida por contener el gen la bacteria del suelo *Agrobacterium* sp. que determina la síntesis del enzima EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa) en comparación con un herbicida potencialmente más agresivo, aplicado en pre-emergencia, como Harness®GTZ (450 g/l acetolcor, 214 g/l terbutilazina;) al que el maíz es resistente de forma natural, hemos analizado las comunidades rizobacterianas por secuenciación de rADN que determina de la síntesis de rARN 16S de tamaño completo, por hibridación de micromatrices de ADN de genoma completo de *Streptomyces coelicolor* y por pirosecuenciación masiva y paralela de la región hipervariable V6 del rADN.

5.2 Estimación somera del efecto de los herbicidas

Se construyeron genotecas de pequeño tamaño (45 clones) del rADN que determina, la síntesis de rARN 16S de tamaño completo de rizosferas de maíz NK603 tolerante a glifosato, tratado con glifosato, tratado con GTZ o sin tratar con herbicida. El rADN se extrajo a tiempo final de crecimiento, justo antes de la recolección. El herbicida GTZ se aplicó dos días después de siembra y el glifosato se aplicó aproximadamente dos meses después. Los campos tratados y el campo sin tratar se dividieron en nueve subparcelas de las que se colectaron tres muestras en cada tiempo de extracción, de forma que para la extracción de ADN en cada caso se agruparon cantidades iguales de las veintisiete muestras extraídas. El ADN obtenido se amplificó con oligonucleótidos cebadores parcialmente degenerados que permitieron amplificar por triplicado fragmentos de ADN de aproximadamente 1.5 kb de longitud que contenían las secuencias codificantes del rRNA 16S de tamaño completo. Las genotecas reconstruyeron insertando el ADN amplificado en el plásmido pGEM-T® para su propagación en *Escherichia coli*. Las bacterias conteniendo los plásmidos recombinantes se lisaron, el ADN del plásmido de extrajo y los fragmentos de ADN insertados se secuenciaron en un secuenciador automático ABI-PRISM® 3700.

La figura 1 muestra una distribución taxonómica de los *fila* más relevantes de cada suelo. Las rizobacterias más abundantes parecen ser *Actinobacteria* y *Proteobacteria* en el suelo no tratado con herbicida (68%). La cantidad relativa de *Proteobacteria* presente en la rizosfera de maíz no tratado (47%) no parece disminuir en las rizosferas de maíz tratado

con glifosato (53%) o con GTZ (52%), sin embargo, la cantidad relativa de *Actinobacteria* disminuye en el maíz tratado con glifosato o con GTZ, donde desciende del 21% al 4% en ambos casos.

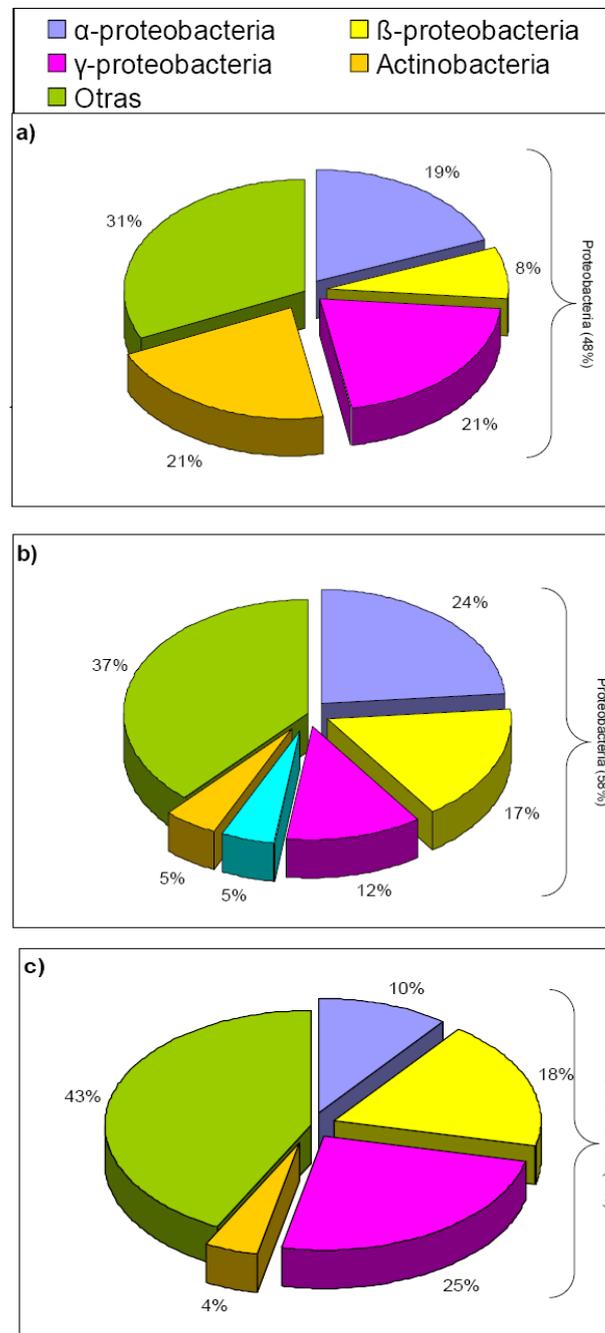


Figura 1. Distribución taxonómica de los fila más relevantes de los tres suelos. Los porcentajes de *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Actinobacteria* están indicados. El porcentaje total de *Proteobacteria* de cada suelo se indica en el margen derecho.

5.3. Huella molecular de rizosferas

Las actinobacterias parecen estar particularmente afectadas por el tratamiento con cualquiera de los dos herbicidas, por ello se han utilizado micromatrices de ADN de genoma completo de *Streptomyces coelicolor* (una actinobacteria del suelo) para evaluar la capacidad de las muestras de ADN, extraídas de las rizosferas de los suelos tratados con los herbicidas y del suelo no tratado a tiempo final de crecimiento de la planta, para desplazar al ADN cromosómico de *S. coelicolor* en la hibridación utilizando las micromatrices de genoma completo. La Tabla 1 resume los resultados de hibridación obtenidos para los tres suelos.

Tabla 1. Número de genes coincidentes en los diferentes suelos utilizando micromatrices de genoma completo de *Streptomyces coelicolor*.

Factor de cambio	superior a 2.5	inferior a -2.5
Total no tratado	337	775
Total tratado con glifosato	871	1071
Total tratado con GTZ	736	1068
No tratado+Glifosato+GTZ	126	550
No tratado+Glifosato	77	70
No tratado+GTZ	42	82
Glifosato+GTZ	185	219
No tratado sólo	92	73
Glifosato sólo	483	232
GTZ sólo	383	217

Se indica el número de genes que hibridan diferencialmente y las coincidencias de hibridación observadas cuando el ADN de las rizobacterias se hibridó con el ADN genómico de *S. coelicolor*.

El patrón de hibridación fue ampliamente coincidente entre suelos tratados y no tratados (37.38% y 70.96% por encima o por debajo de los valores definidos como factores de cambio superior o inferior, respectivamente). Las coincidencias aumentan gradualmente cuando los suelos se comparan de dos en dos, de forma que 60.23% de genes por encima del factor de cambio superior y 80.0% de genes por debajo del factor de cambio inferior coincidían entre el suelo sin tratar y el suelo tratado con glifosato, mientras que 49.85% y 81.54% eran los valores correspondientes de coincidencia entre el suelo sin tratar y el suelo

tratado con GTZ.

Además, el tratamiento con herbicida provoca cambios en el patrón de hibridación, donde juegos de genes aparecen o desaparecen según el herbicida con que se haya tratado. Un número significativamente mayor de genes mostró hibridación diferencial por encima o por debajo de los valores definidos como factores de cambio superior o inferior en los suelos tratados con los diferentes herbicidas en comparación con el suelo no tratado, lo que refleja y refuerza el hallazgo de que el tratamiento con herbicidas modifica aparentemente la composición de actinobacterias en este suelo, como se deduce de la secuenciación de las genotecas de genes para el rARN 16S (ver 5.2).

5.4. Pirosecuenciación de la región V6 del rARN 16S

Para caracterizar mejor el efecto de los herbicidas en las comunidades rizobacterianas del maíz, El ADN extraído de suelo no tratado, de suelo tratado con glifosato o de suelo tratado con GTZ y que codifica la región V6 del rARN, se amplificó y se secuenció por pirosecuenciación. Las secuencias obtenidas tuvieron un tamaño medio de 101 nucleótidos y se agruparon utilizando el programa MEGAN y la taxonomía NCBI para generar árboles taxonómicos. El ADN se extrajo de los suelos una semana después de la aplicación de glifosato (primer tiempo de muestreo) y a tiempo final de crecimiento (tiempo de muestreo final).

La parte superior de la figura 2 muestra los árboles taxonómicos resultantes de la secuenciación de la región V6 del rADN 16S de cada suelo en el primer tiempo de muestreo y la parte inferior de la figura 2 muestra los árboles correspondientes al tiempo final de muestreo. De las 3467 secuencias analizadas del suelo no tratado en el primer tiempo de muestreo, 551 (15.8%) no fueron asignadas, 549 (15.8%) pertenecen a *Proteobacteria*, 842 (24.8%) son *Actinobacteria* y 1529 (44.12%) pertenecen a otros taxa. Esta distribución se conserva parcialmente en las 5025 secuencias analizadas del suelo tratado con glifosato, donde la cantidad de *Proteobacteria* parece aumentar ligeramente (17.07%), aunque el número relativo de *Actinobacteria* disminuye apreciablemente (17.01%) y 12.47% de las secuencias no pudieron asignarse a ningún grupo taxonómico. Las *Proteobacteria* disminuyen ligeramente en el suelo tratado con GTZ (13.16%), donde las *Actinobacteria* disminuyen dramáticamente (9.5%), permaneciendo 8.9% de las secuencias sin asignar. En el tiempo de muestreo final, las *Proteobacteria* representan 18.19% de la composición rizobacteriana reflejada en las 1814 secuencias analizadas del

suelo no tratado y las *Actinobacteria* aumentan hasta un 31.25%, con un 6.45% de secuencias no asignadas. Estos valores fueron similares en el suelo tratado con glifosato (20.43% *Proteobacteria* y 27.39% *Actinobacteria*) con 8.12% de secuencias no asignadas, pero difieren marcadamente de los valores del suelo tratado con GTZ, donde *Proteobacteria* representan 34.07% de la población rizobacteriana y el porcentaje de *Actinobacteria* desciende hasta 16.12% con un 5% de secuencias sin asignar. Estos resultados son en líneas generales similares a los obtenidos cuando se secuenció el rADN 16S de tamaño completo de los tres suelos en el muestreo a tiempo final (ver 5. 2).

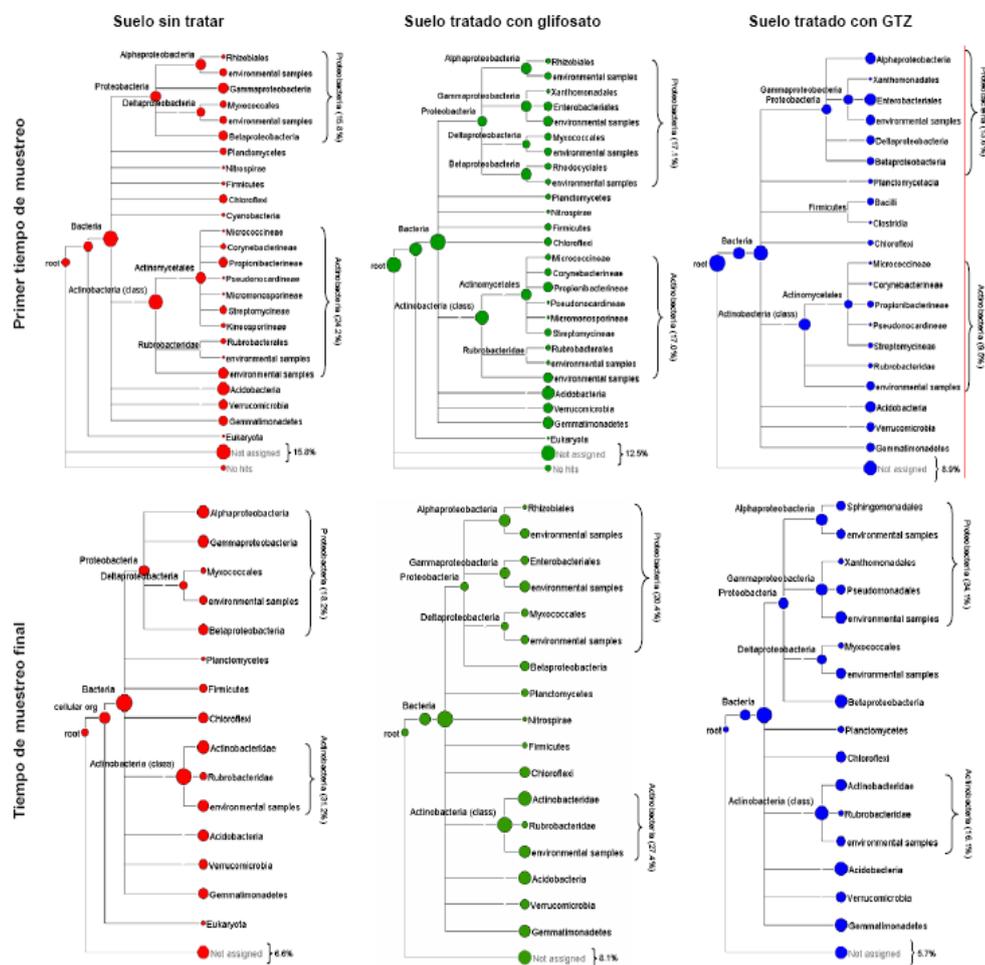


Figura 2. Árboles taxonómicos resultantes de la pirosecuenciación de la región V6 del rADN 16S en cada suelo en el primer tiempo de extracción (parte superior) y en el tiempo de extracción final (parte inferior). Los porcentajes relativos de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y taxa no asignados se indican entre paréntesis. *Eukariota* indica rARN 16S de cloroplastos. El tamaño de los círculos refleja la cantidad relativa de taxa asignados a cada nodo particular.

La composición rizobacteriana general cambió en todos los suelos desde el primer tiempo de muestreo al tiempo de muestreo final, lo que probablemente refleja los cambios debidos al crecimiento de la planta, junto con una recuperación gradual del tratamiento con el herbicida, recuperación que es aparentemente menos efectiva en el suelo tratado con GTZ que en el suelo tratado con glifosato.

La comparación del análisis a nivel de especie del árbol taxonómico generado para el suelo sin tratar con los generados para los suelos tratados con glifosato o con GTZ revela una composición de *Proteobacteria* y *Actinobacteria* distinta en los diferentes suelos (Fig.3). Así, en las muestras recolectadas en el primer tiempo de muestreo, *Alphaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* eran más abundantes en el suelo no tratado que en el suelo tratado con glifosato, mientras que *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* eran más abundantes en el suelo tratado con glifosato (Fig.3 parte superior). *Actinobacteria* eran siempre más prominentes en el suelo no tratado que en suelo tratado con herbicidas. En las muestras recolectadas en el último tiempo de muestreo, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* parecen estar presentes en cantidades casi iguales en el suelo no tratado y en el suelo tratado con glifosato, siendo *Gammaproteobacteria* más abundante en el suelo tratado con el herbicida (Fig.3 parte inferior). Esta distribución está en marcado contraste con la que resulta de la comparación del suelo no tratado y el suelo tratado con GTZ, donde todos los tipos de *Proteobacteria* son más abundantes en el suelo tratado con el herbicida (Fig.3, parte inferior). Aunque la distribución de *Actinobacteria* parece similar en el suelo no tratado y en el suelo tratado con glifosato, algunos taxa de *Actinobacteria* aparecen exclusivamente en el suelo no tratado. La cantidad de *Actinobacteria* presente en el suelo no tratado supera considerablemente la cantidad presente en el suelo tratado con GTZ y, de nuevo, varios taxa aparecen exclusivamente representados en el suelo no tratado.

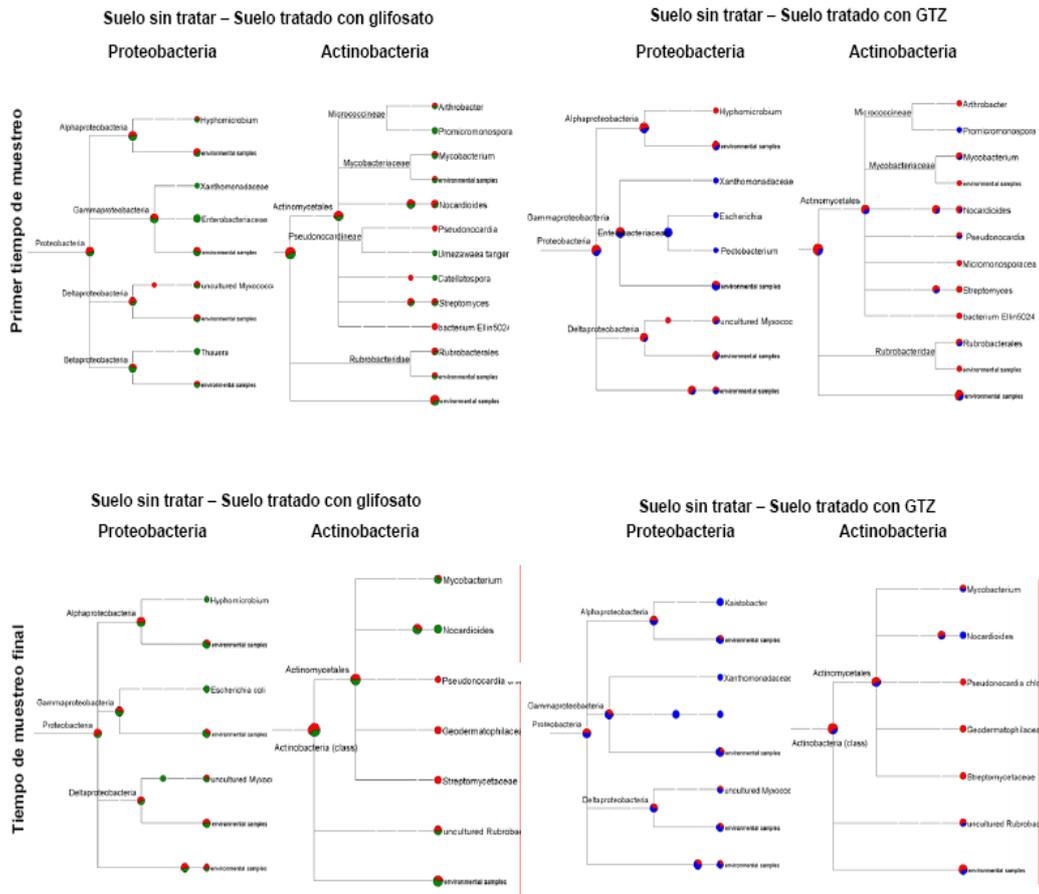


Figura 3. Análisis a nivel de especie de los árboles taxonómicos generados comparando suelo no tratado con suelos tratados con herbicidas. La parte superior muestra los resultados obtenidos en el primer tiempo de muestreo y la parte inferior los resultados obtenidos en el tiempo de muestreo final. Los colores en cada nodo reflejan la proporción relativa de taxa asignados a cada nodo. Los círculos rojos representan suelo no tratado, los círculos verdes, suelo tratado con glifosato y los círculos azules, suelo tratado con GTZ.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos cuando la riqueza de especies se determinó utilizando los estimadores ACE y Chao1 (Tabla 2), donde la reducción en riqueza de especies en el suelo tratado con GTZ en el primer tiempo de muestreo parece más evidente y la recuperación relativa parece aún más pobre.

Tabla 2. Estimaciones de riqueza de especies basadas en la similitud de unidades taxonómicas operacionales (OTUs)

Muestra	Nº sec.	OTUs	Distancia de agrupamiento								
			3%		5%		10%				
			Ace	Chao	OTUs	Ace	Chao1	OTUs	Ace	Chao1	
Una semana después del tratamiento con glifosato											
No tratado	3467	1802	3989.26	3656.6	0	1520	2941.87	2731.72	1074	1666.90	1610.07
Glifosato	5025	2100	4526.63	4060.62		1749	3126.25	2858.37	1201	1691.76	1666.03
GTZ	3843	1291	2575.61	2168.75		999	474.38	1363.02	580	646.23	639.58
Estado final de crecimiento de la planta											
No tratado	1814	1196	3897.21	3408.66		1048	2640.40	2314.12	817	1509.31	1319.69
Glifosato	1796	1116	3222.74	3417.91		943	2141.86	2213.58	692	1168.89	1234.65
GTZ	1526	952	2521.66	2365.30		823	1809.24	1700.30	634	1078.15	1003.50

Las estimaciones de riqueza de especies se determinaron usando el programa DOTUR. Las secuencias obtenidas por pirosecuenciación del suelo no tratado se compararon con las del suelo tratado con glifosato y el suelo tratado con GTZ.

Los análisis de rarefacción de las distintas muestras para OTUs con diferencias que no excedían el 3%, 5% o 10%, mostraron pendientes que indican la necesidad de muestreo adicional para poder determinar toda la biodiversidad potencial de las comunidades rizobacterianas, incluso cuando distancias relativamente grandes (5% o 10%) se utilizan para definir grupos de similitud. La figura 4 muestra las curvas de rarefacción correspondientes a las muestras de suelo no tratado en el primer tiempo de muestreo. Las curvas del resto de muestras presentan pendientes similares (no mostrado).

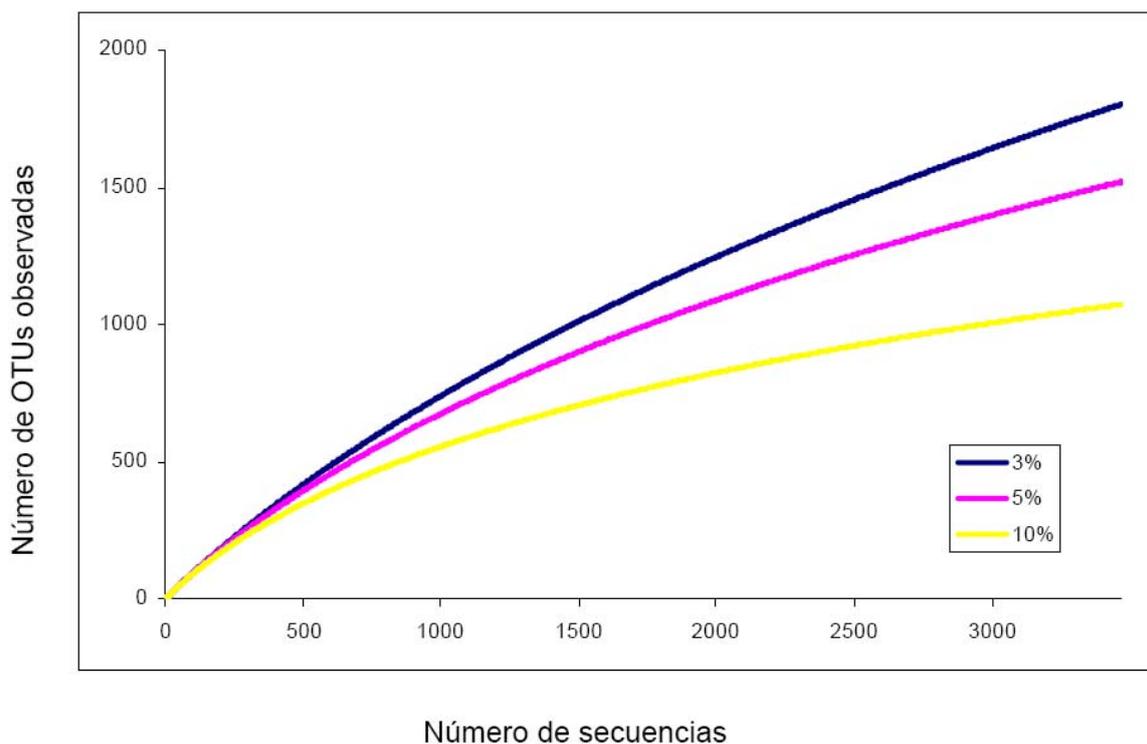


Figura 4. Análisis de rarefacción de las muestras del suelo no tratado en el primer tiempo del muestreo (una semana después de la adición de glifosato). Se muestra la rarefacción para OTUs con disimilitudes que no exceden 3%, 5% o 10%.

5.5 Conclusiones

En conjunto los resultados obtenidos muestran claramente que los tratamientos con herbicidas afectan a las comunidades bacterianas presentes en la rizosfera del maíz. También indican con claridad que el glifosato es considerablemente menos agresivo que GTZ en las condiciones experimentales utilizadas. Las enzimas EPSPS de la clase I de plantas y bacterias son sensibles a glifosato (Funke *et al.*, 2006; Funke *et al.*, 2009), de forma que la potencial presión selectiva temporalmente causada por la adición del herbicida puede provocar un descenso temporal en los niveles de algunas especies bacterianas; niveles que pueden recobrase cuando el herbicida resulta inactivado de forma natural. Así, al final del crecimiento de la planta, la comunidad de rizobacterias del maíz tolerante a glifosato muestra una casi total recuperación del efecto negativo que tuvo la adición del herbicida poco después de la emergencia de la planta, a juzgar por la comparación con la composición rizobacteriana del maíz no tratado con ningún herbicida. Este nivel de baja agresividad del glifosato se ha descrito también para otras plantas además de maíz

(Lupwayi *et al.*, 2007; Mijangos *et al.*, 2009) y seguramente es debido a su fuerte capacidad de unión al suelo (mayor coeficiente de distribución suelo/solución que el de los componentes activos presentes en GTZ), lo que determina un grado de penetrabilidad bajo para el herbicida. La adición de GTZ en preemergencia tiene un efecto negativo en la composición de *Actinobacteria*, efecto negativo que no parece corregirse en el tiempo final de muestreo, donde la cantidad relativa de *Proteobacteria* aumenta como si se compensase la reducción de *Actinobacteria*. La reducción de *Actinobacteria* puede ser relevante, ya que el papel de los actinomicetos como promotores del crecimiento de plantas y antagonistas del crecimiento de hongos patógenos está bien establecido (El-Tarabily and Sivasithamparamb, 2006). Las alteraciones detectadas no significan necesariamente que la capacidad del suelo agrícola como tal haya disminuido, simplemente pueden reflejar que debido a la presión ambiental ejercida por el herbicida, las comunidades bacterianas han reaccionado dinámicamente y se han ajustado ellas mismas a la nueva situación ambiental, desarrollándose de acuerdo a esa situación en cada caso y, eventualmente compensando las potenciales deficiencias.

Los resultados obtenidos muestran además que las tres aproximaciones experimentales utilizadas: clonaje y secuenciación de genes completos para el rARN 16S, hibridación de micromatrices de ADN de genoma completo y pirosecuenciación masiva de la región variable V6 del rARN 16S pueden, con diferentes grados de exactitud y coste, permitir la detección de efectos medioambientales derivados del uso de herbicidas en diferentes cultivares (Barriuso *et al.*, 2010). De forma que estas técnicas pueden fácilmente formar parte de programas de monitorización (planes de seguimiento) para determinar el riesgo medioambiental asociado al cultivo extensivo de plantas tolerantes a herbicidas y otras plantas transformadas genéticamente durante periodos de tiempo prolongados.

Debido a la naturaleza de los resultados obtenidos, se ha considerado necesario extender los mismos a otras especies vegetales, transformadas genéticamente, tolerantes al herbicida glifosato, así como realizar estudios a largo plazo para evaluar posibles efectos acumulativos en las comunidades de rizobacterias por exposición a éste u otros herbicidas. Algunos de estos estudios están siendo actualmente realizados dentro de la Encomienda de Gestión CNB-CSIC, financiada por el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (MARM).

5.6. Publicaciones científicas

Amann R.I., Ludwig W, Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143- 169.

Anderson I.C., Cairney J.W.G. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6, 769-779.

Barriuso, J., Marín S. and Mellado R.P: (2010) Effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobial communities: a comparison with pre-emergency applied herbicide consisting of acetochlor and terbuthylazine. *Environmental Microbiology* 12, 1021-1030.

El-Tarabily K.A. and Sivasithamparamb K. (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1505–1520.

Funke T., Han H., Healy-Fried M.L., Fisher M. and Schoenbrunn E. (2006) Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13010-13015.

Funke T., Yang Y., Han H., Healy-Fried M.L., Olesen, S., Becker, A. and Schoenbrunn E. (2009) Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr⁹⁷- Ile and Pro¹⁰¹-Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 9854-9860.

Lupwayi N.Z., Hanson K.G, Harker K.N., Clayton G.W., Blackshaw R.E., O'Donovan J.T., *et al.* (2007) Soil microbial biomass, functional diversity and enzyme activity in glyphosate-resistant wheat–canola rotations under low-disturbance direct seeding and conventional tillage. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1418–1427.

Mijangos I., Becerril J.M., Albizu I., Epelde L., and Garbisu C. (2009) Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 505–513.

Roesch L.F.W., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., HAdwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A.O., Farmerie W. and Triplett E.W. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrast soil microbial diversity. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 1, 283-290.

Val, G., Marín, S. and Mellado, R.P. (2009) A sensitive method to monitor *Bacillus subtilis* and *Streptomyces coelicolor*-related bacteria in maize rhizobacterial communities: The use of genome-wide microarrays. *Microbial Ecology* 58, 108-115.

En negrita aparecen las publicaciones del grupo CNB-CSIC, financiadas en su totalidad por Convenio de colaboración entre el entonces Ministerio de Medio Ambiente (actualmente MARM) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas o por la Encomienda de Gestión entre el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

6. CONCLUSIONES DE LOS PLANES

Los resultados de estos estudios realizados bajo los planes de seguimiento del maíz Bt resistente a insectos lepidópteros y promovidos por el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (MARM), y una vez transcurridos doce años desde el inicio de su cultivo comercial en España, indican que no se han detectado efectos negativos sobre los artrópodos no diana ni sobre los microorganismos del suelo. Tampoco se ha evidenciado un incremento en el nivel de resistencia del taladro del maíz a la toxina Bt.

Por lo que respecta a los estudios realizados hasta el momento con el maíz tolerante a glifosato, los resultados muestran con claridad que los herbicidas afectan a las comunidades bacterianas presentes en la rizosfera del maíz y que el glifosato es considerablemente menos agresivo que los herbicidas con los que se comparó.

Los resultados alcanzados, financiados en su totalidad o en parte por el MARM, han dado lugar a 31 publicaciones científicas, 2 capítulos en libros, 5 artículos de divulgación, 3 tesis doctorales, 25 presentaciones en congresos nacionales e internacionales y 33 ponencias invitadas, así como apoyo técnico en la evaluación de riesgo de los OMG.

7. AGRADECIMIENTOS

Algunos de estos estudios se han realizado en colaboración con otros grupos de investigación gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación y la Comisión Europea. Asimismo, nuestro agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que con su dedicación y colaboración han contribuido en estos estudios.