

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Microbiología III



**TESIS DOCTORAL**

**Riesgos y beneficios del cultivo en España de maíz Bt (MON810)  
resistente a insectos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Arias Martín**

Directores

Gema Perez Farinós  
Belén Patiño Álvarez

**Madrid, 2016**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



**RIESGOS Y BENEFICIOS DEL CULTIVO EN ESPAÑA  
DE MAÍZ Bt (MON810) RESISTENTE A INSECTOS**



**TESIS DOCTORAL**

MARÍA ARIAS MARTÍN

MADRID, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



## RIESGOS Y BENEFICIOS DEL CULTIVO EN ESPAÑA DE MAÍZ Bt (MON810) RESISTENTE A INSECTOS

Tesis doctoral presentada por María Arias Martín  
para optar al grado de Doctora en Biología por  
la Universidad Complutense de Madrid  
MADRID, 2015

**Directoras:**

Dra. Gema Pérez Farinós

Científica Titular

Departamento de Biología Medioambiental

CIB. CSIC. Madrid

Dra. Belén Patiño Álvarez

Profesora Titular de Universidad

Departamento de Microbiología III

Universidad Complutense de Madrid





# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	I
<b>SUMMARY</b>	VII
<b>ABREVIATURAS</b>	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>1. 1. Plantas transgénicas resistentes a insectos</b>	<b>3</b>
1. 1. 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> y sus toxinas insecticidas	4
1. 1. 2. Modo de acción de las toxinas Cry	6
1. 1. 3. Aplicaciones de <i>B. thuringiensis</i>	7
<b>1. 2. El cultivo del maíz</b>	<b>9</b>
<b>1. 3. Los taladros del maíz</b>	<b>13</b>
1. 3. 1. <i>Sesamia nonagrioides</i> : descripción, biología y distribución geográfica	13
1. 3. 2. <i>Ostrinia nubilalis</i> : descripción, biología y distribución geográfica	14
1. 3. 3. Daños e importancia económica de los taladros del maíz	16
1. 3. 4. Control de los taladros del maíz	17
<b>1. 4. Las micotoxinas y el cultivo de maíz</b>	<b>19</b>
1. 4. 1. Hongos productores de micotoxinas y tipos de micotoxinas	19
1. 4. 2. Factores asociados a la proliferación de hongos micotoxígenos y a la producción de micotoxinas	22
1. 4. 3. Seguridad alimentaria y micotoxinas	23
1. 4. 4. Estrategias de prevención y control de la presencia de micotoxinas en el maíz	24
<b>1. 5. El maíz Bt en Europa</b>	<b>25</b>
<b>1. 6. Riesgos potenciales del maíz Bt sobre el medio ambiente</b>	<b>28</b>
1. 6. 1. Persistencia y capacidad invasora de las plantas GM en ambientes naturales o agrícolas, y flujo de genes a otras plantas cultivadas o silvestres	28

1. 6. 2. Desarrollo de resistencia de los taladros al maíz Bt	28
1. 6. 3. Efectos del maíz Bt sobre los artrópodos no-diana	30
1. 6. 4. Seguridad ambiental del maíz Bt. Normativa europea	34
<b>1. 8. Objetivos de la Tesis</b>	<b>36</b>
<b>2. EFECTOS DEL CULTIVO CONTINUADO DEL MAÍZ Bt SOBRE LOS ARTRÓPODOS NO-DIANA DE LA PARTE AÉREA DE LA PLANTA Y LOS MICROARTRÓPODOS EDÁFICOS</b>	<b>37</b>
<b>2. 1. Introducción</b>	<b>39</b>
<b>2. 2. Material y métodos</b>	<b>46</b>
2. 2. 1. Área de estudio y diseño experimental	46
2. 2. 2. Variables ambientales	47
2. 2. 3. Muestreo, extracción e identificación de artrópodos	48
2. 2. 3. 1. Artrópodos de la parte aérea de la planta	48
2. 2. 3. 2. Microartrópodos edáficos	50
2. 2. 4. Proteína Cry1Ab	51
2. 2. 5. Exposición de los artrópodos de la parte aérea de la planta a la toxina Cry1Ab	51
2. 2. 6. Exposición de los colémbolos a la toxina Cry1Ab	53
2. 2. 7. Extracción y cuantificación de la toxina Cry1Ab de la rizosfera	54
2. 2. 8. Actividad insecticida de la toxina Cry1Ab de la materia orgánica de la rizosfera	55
2. 2. 9. Análisis estadísticos	56
<b>2. 3. Resultados</b>	<b>59</b>
2. 3. 1. Variables ambientales	59
2. 3. 2. Efectos del maíz Bt sobre los artrópodos de la parte aérea de la planta	61
2. 3. 2. 1. Artrópodos capturados con trampas adhesivas	61
2. 3. 2. 2. Abundancia y dinámica de las poblaciones de artrópodos capturados en maíz Bt y no-Bt	64
2. 3. 2. 3. Relación entre el parasitoide <i>Anagrus</i> spp. y su huésped <i>Z. scutellaris</i> en el maíz	70
2. 3. 3. Efectos del maíz Bt sobre los microartrópodos edáficos	72

2. 3. 3. 1. Composición de la comunidad de microartrópodos edáficos	72
2. 3. 3. 2. Abundancia y dinámica de la población de ácaros del suelo en maíz Bt y no-Bt	74
2. 3. 3. 3. Abundancia, dinámica de la población y composición de especies de colémbolos en maíz Bt y no-Bt	77
2. 3. 4. Potencia estadística y diferencias detectables entre tratamientos	83
2. 3. 5. Exposición de los artrópodos no-diana a la toxina Cry1Ab	86
2. 3. 6. Detección de la toxina Cry1Ab en la rizosfera y evaluación de su actividad insecticida	87
<b>2. 4. Discusión</b>	<b>88</b>
2. 4. 1. Efecto del maíz Bt en los artrópodos de la parte aérea de la planta	88
2. 4. 2. Efecto del maíz Bt en los microartrópodos edáficos	92
2. 4. 3. Selección de artrópodos no-diana para la evaluación de riesgo ambiental del maíz Bt	96
<b>3. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICOTOXÍGENOS Y MICOTOXINAS EN CULTIVOS DE MAÍZ Bt Y CONVENCIONAL</b>	<b>101</b>
<hr/>	
<b>3. 1. Introducción</b>	<b>103</b>
<b>3. 2. Materiales y métodos</b>	<b>107</b>
3. 2. 1. Recogida y procesamiento de muestras	107
3. 2. 2. Variables ambientales	112
3. 2. 3. Identificación molecular de hongos productores de micotoxinas	113
3. 2. 4. Cuantificación de micotoxinas en el maíz Bt y no-Bt	115
3. 2. 4. 1. Análisis de fumonisinas (FB <sub>1</sub> y FB <sub>2</sub> )	115
3. 2. 4. 2. Análisis de deoxinivalenol (DON), T-2, HT-2, zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) y aflatoxinas (AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> )	117
3. 2. 5. Análisis estadísticos	120
<b>3. 3. Resultados</b>	<b>121</b>
3. 3. 1. Variables ambientales	121
3. 3. 2. Presencia de hongos micotoxígenos en mazorcas de maíz	124
3. 3. 3. Presencia de micotoxinas en mazorcas de maíz	128

3. 3. 4. Relación entre la presencia de hongos micotoxígenos y de fumonisinas en mazorcas de maíz	130
3. 3. 5. Hongos micotoxígenos en los taladros del maíz	131
3. 3. 6. Relación entre la presencia de hongos del género <i>Fusarium</i> en las mazorcas y en las larvas de los taladros	134
<b>3. 4. Discusión</b>	<b>135</b>
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>145</b>
<hr/>	
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>153</b>
<hr/>	
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>157</b>
<hr/>	
<b>ANEXOS</b>	<b>185</b>
<hr/>	

## RESUMEN

---

### **RIESGOS Y BENEFICIOS DEL CULTIVO EN ESPAÑA DE MAÍZ Bt (MON810) RESISTENTE A INSECTOS.**

El uso de plantas genéticamente modificadas (GM) resistentes a insectos que expresan toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* ofrece un control altamente efectivo sobre plagas de gran importancia económica. Actualmente, la única planta GM resistente a insectos que se cultiva comercialmente en Europa es el maíz MON810 que expresa la toxina Cry1Ab (maíz Bt), activa frente a los taladros del maíz *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) y *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae). Los daños de ambas especies son producidos por las larvas, que tienen un comportamiento endófito, es decir, penetran en el interior de la caña de la planta y se alimentan de su médula. Por este motivo, el maíz Bt es el método de control que se ha mostrado más eficaz en zonas con alta incidencia de dichas plagas. España es el único país de la UE que ha adoptado de forma significativa este cultivo, habiéndose sembrado en 2014 más de 130.000 ha, lo que representó el 30% del total de maíz.

La incorporación del maíz Bt a la agricultura ha suscitado una gran controversia en Europa debido, entre otros motivos, a los posibles efectos que la liberación a gran escala de estas plantas puede producir sobre el medio ambiente. A pesar que el maíz Bt controla de manera específica a los taladros, los artrópodos asociados temporal y/o espacialmente al agroecosistema hacia los que no va dirigido este control (artrópodos no-diana), pueden estar expuestos a la toxina, y por tanto verse afectados por la misma. Hasta el momento se han realizado numerosos estudios de campo y de laboratorio con artrópodos de distintos grupos funcionales presentes en el cultivo del maíz para evaluar la toxicidad de la proteína Cry1Ab sobre ellos, así como el nivel de exposición al que pueden estar sometidos. Sin embargo, a pesar de toda la información recabada, aún quedan aspectos relevantes por conocer acerca de los efectos del cultivo del maíz Bt sobre algunos artrópodos no-diana que se encuentran en las partes aéreas de la planta y sobre los microartrópodos que habitan en el suelo, así como de su exposición a la toxina insecticida en el campo. Como no es posible llevar a cabo evaluaciones de riesgo ambiental de plantas GM para todas las especies presentes en un agroecosistema, se ha propuesto la utilización de especies indicadoras, sensibles a cambios en el medio ambiente o importantes por su papel ecológico, que actuarían como representantes de una comunidad de artrópodos determinada. En general, la selección de estas especies se basa en diversos criterios como su función ecológica, distribución geográfica, la posible

exposición a la toxina, la facilidad para la identificación taxonómica en campo, el manejo en el laboratorio o la importancia económica.

El maíz es un cultivo particularmente propenso en el sur de Europa a sufrir infecciones por hongos de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*. Al colonizar la planta algunos de estos hongos pueden causar podredumbre de raíces, tallos y mazorcas, además de sintetizar metabolitos secundarios, entre los que se encuentran las micotoxinas, que son altamente tóxicas para los mamíferos. La acumulación de toxinas en los alimentos representa un riesgo para la salud de los seres humanos y los animales, además de producir pérdidas económicas en la industria agroalimentaria al disminuir la calidad de la materia prima. Debido al problema que supone la entrada de micotoxinas a la cadena alimentaria, la UE ha desarrollado normativas específicas, cada vez más restrictivas, que marcan los niveles máximos permitidos de estos metabolitos en diferentes productos alimenticios. La dificultad de eliminar las micotoxinas de forma eficaz sin afectar a las propiedades de la materia prima con un bajo coste, hace que una de las estrategias para controlar su aparición sea la prevención de la contaminación con hongos productores de las mismas. Las distintas especies fúngicas que aparecen en un cultivo pueden presentar perfiles toxígenos diferentes, por lo que la identificación de los hongos productores en un alimento puede ser útil para predecir qué toxinas podrían aparecer. Se ha descrito que la entrada de insectos en la planta, como los taladros del maíz, puede favorecer la contaminación con hongos micotoxígenos, al actuar como vectores de la enfermedad o al penetrar los hongos a través de las heridas producidas. Además, la proliferación de los hongos se ve favorecida por el estrés producido en la planta por el daño de los insectos. Por ello, la reducción de la concentración de micotoxinas en el maíz sería, en parte, posible con la toma de medidas para controlar las plagas de taladros, siendo una de ellas el cultivo de maíz Bt. En la última década se ha relacionado el menor ataque de taladros en el maíz Bt con una disminución en los niveles de micotoxinas. Sin embargo, la asociación entre el ataque de taladros y la aparición de infecciones fúngicas no siempre está tan clara. Además, en España, los datos epidemiológicos sobre los hongos micotoxígenos que contaminan el maíz son escasos.

Por todo lo expuesto, los objetivos generales de esta Tesis fueron: 1) evaluar los efectos del cultivo continuado de maíz MON810 sobre la comunidad de artrópodos de la parte aérea de la planta y los microartrópodos edáficos, analizando su nivel de exposición a la toxina e identificando los grupos más adecuados para ser utilizados en la evaluación de riesgo ambiental en condiciones agroclimáticas mediterráneas; y 2) estudiar las

diferencias en la contaminación con hongos micotoxígenos y en la producción de micotoxinas entre mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y maíz Bt, determinar si la presencia de los hongos micotoxígenos es un buen indicador de la contaminación con micotoxinas de las muestras y analizar el papel de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* como portadores de hongos productores de micotoxinas.

Durante tres años consecutivos (2009-2011) se estudiaron los artrópodos de la parte aérea de la planta y los microartrópodos del suelo, recogidos mediante trampas adhesivas amarillas y muestras de suelo, respectivamente, de parcelas de maíz Bt y no-Bt en un campo experimental situado en San Fernando de Henares (Madrid). De los primeros, los más abundantes fueron los cicadélidos (Hemiptera: Cicadellidae), delfácidos (Hemiptera: Delphacidae), mimáridos (Hymenoptera: Mymaridae), tricogramátidos (Hymenoptera: Trichogrammatidae), tisanópteros (Thysanoptera) y clorópidos (Diptera: Chloropidae). Más del 64% del total de las capturas estuvieron compuestas por el cicadélido *Zyginidia scutellaris* (Herrich-Schäffer) (herbívoro) y el mimárido *Anagrus* spp. (parasitoide), que presentan una estrecha relación entre ellos y con la planta de maíz. No se encontraron efectos negativos del cultivo del maíz Bt en la abundancia de estos grupos, aunque en la mayoría de los casos hubo diferencias entre los años. Se demostró por primera vez la exposición, en condiciones de campo, de dos cicadélidos, *Z. scutellaris* y *Empoasca* spp., a la proteína Cry1Ab que expresa el maíz MON810. De los microartrópodos edáficos capturados a partir de las muestras de suelo recogidas a lo largo de todo el año, ácaros y colémbolos representaron el 88% de todos los individuos capturados, siendo identificados hasta nivel de suborden y especie, respectivamente. La abundancia de ácaros y colémbolos y la frecuencia de aparición de las principales especies de colémbolos no dependió del tipo de maíz, excepto para la especie *Parisotoma notabilis* (Schäffer), más abundante y frecuente en las parcelas de maíz Bt. Sin embargo, diferencias significativas entre años fueron comunes en ambos grupos. Además, se encontraron valores más altos de riqueza y diversidad de especies de colémbolos en las parcelas de maíz Bt que en las no-Bt. La toxina Cry1Ab fue detectada por primera vez en colémbolos del género *Entomobrya* recogidos en campo, lo que demuestra su exposición a la toxina que expresa el maíz MON810. Asimismo, se evaluaron los niveles de Cry1Ab en una fracción de la materia orgánica (MO) de la rizosfera procedente de parcelas de maíz Bt, detectándose la toxina hasta tres meses después de la cosecha con valores que oscilaron entre 0,10 y 0,18 ng Cry1Ab/mg MO. Sin embargo, presentó una reducida toxicidad frente a la especie susceptible *O. nubilalis*, lo que indica que su concentración en forma activa en el suelo fue baja. A partir de los

resultados obtenidos, se propone al herbívoro *Z. scutellaris*, al parasitoide *Anagrus* spp., y a las comunidades de detritívoros de ácaros y colémbolos del suelo como taxones idóneos para ser utilizados como indicadores de los posibles efectos del maíz Bt en función de su exposición a la toxina Cry1Ab en condiciones de campo, su presencia habitual en cultivos de maíz, la asequibilidad que presentan para ser muestreados e identificados y su utilidad para detectar diferencias entre el maíz Bt y no-Bt analizando sus abundancias. Además, los parámetros riqueza y diversidad de especies de colémbolos fueron adecuados para detectar diferencias entre ambos tipos de maíz.

Durante dos campañas consecutivas se recogieron mazorcas de maíz no-Bt que tenían daño de taladro y de maíz Bt de diferentes campos comerciales situados en tres áreas maiceras de España (Extremadura, Albacete y Valle del Ebro). Se analizó la presencia en las mazorcas de 16 especies de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* mediante protocolos específicos de PCR, detectándose muestras contaminadas con *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, el agregado *A. niger* y *A. flavus*. Las especies de la sección *Liseola*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, fueron las únicas que mostraron una frecuencia mayor en las muestras de maíz no-Bt que en las de Bt. Por primera vez se han aislado hongos micotoxígenos, principalmente de estas tres especies de *Fusarium*, a partir de larvas de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* recogidas en campos comerciales de maíz. Las fumonisinas fueron las micotoxinas que con mayor frecuencia contaminaron las mazorcas, siendo la concentración de las mismas significativamente más alta en las mazorcas de maíz no-Bt que en las de maíz Bt. Esta mayor contaminación se ha relacionado con la presencia de los hongos productores de estas micotoxinas (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*). La alta presencia de *F. subglutinans* en las mazorcas no-Bt alerta de la posibilidad de contaminación del maíz con moniliformina y otras micotoxinas emergentes, recomendándose su vigilancia. La frecuencia de aparición del resto de hongos y toxinas estudiadas (DON, T-2, HT-2, ZEA, OTA y aflatoxinas) no pareció estar relacionada con el tipo de maíz, Bt o no-Bt.

Como conclusión, nuestros resultados revelan que el cultivo continuado de maíz Bt MON810 no afecta negativamente a los artrópodos de la parte aérea de la planta ni a los microartrópodos del suelo, a pesar de que se ha demostrado la exposición de especies pertenecientes a ambas comunidades a la toxina Cry1Ab en condiciones de campo. La selección de grupos indicadores de efectos de maíz Bt llevada a cabo (el herbívoro *Z. scutellaris*, el parasitoide *Anagrus* spp., y las comunidades de detritívoros de ácaros y

## Resumen

colémbolos del suelo) puede tener una aplicación en las evaluaciones de riesgo exigidas en Europa para las plantas GM que incorporen nuevos eventos y en los programas de seguimiento de los efectos del maíz Bt (MON810). Por otro lado, el maíz Bt, al no presentar ataque de taladros, ha demostrado ser muy eficaz en la reducción de micotoxinas en comparación con el maíz no-Bt. Éste estuvo fundamentalmente contaminado con fumonisinas, la toxina más frecuente en maizales españoles, debido a la mayor presencia de hongos de la sección *Liseola*, que incluye a los principales productores de las mismas. La presencia de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en plantas dañadas por los taladros *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* ha demostrado ser buen indicador de una probable contaminación con fumonisinas.



## SUMMARY

---

### **RISKS AND BENEFITS OF THE INSECT-RESISTANT Bt MAIZE (MON810) CULTIVATED IN SPAIN.**

The use of insect-resistant genetically modified (GM) crops which express insecticidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* is an effective method to control pests of major economic importance. Nowadays, the only insect-resistant GM plants commercially cultivated in the EU are those maize varieties derived from the event MON810, engineered to express the Cry1Ab insecticidal protein (Bt maize). This toxin efficiently control two key pests: the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae) and the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). Immature stages of both species have endophytic behaviour, being the main damage caused by the stalk tunneling of larger larvae. As a consequence, Bt maize has shown high efficacy to control these pests, especially in areas where they are in high densities. Among the EU, Spain is the member state with the highest adoption rate of Bt maize, presenting more than 130.000 hectares in 2014 (representing the 30% of the total maize cultivated in the country).

The extended use of Bt maize into agriculture has raised controversy in Europe, mainly due to the potential negative effects that the extended spread of these GM plants could cause to the environment. Despite Bt maize is highly specific to control these two corn borers, other arthropods associated with the GM plant that are not targeted (non-target arthropods) could be exposed and negatively affected by the toxin. So far, several laboratory and field studies have assessed the toxicity of the Cry1Ab protein against different functional guilds of non-target arthropods and their exposure to the toxin. Nevertheless, there are still certain groups and aspects associated with the cultivation of Bt maize that require more research, as the effects of Bt maize on non-target arthropods inhabiting the aerial parts of the maize and on the soil microarthropod communities, as well as their exposure to the insecticidal toxin in the field. Since not all the non-target arthropods can be tested, it has been proposed the selection of a representative subset of them (referred as surrogate species) for consideration in the risk assessment of GM plants. The species selection should be performed according to different selection criteria, such as: ecological function, geographical distribution, potential exposure to the toxin, economic relevance and feasibility to be taxonomically identified in the field and to perform bioassays in the laboratory.

In Southern Europe, maize is a crop highly prone to suffer infections by moulds of the genera *Fusarium* and *Aspergillus*. During plant colonization they can produce root,

## Summary

stem and cob rot, and in addition they can synthesize secondary metabolites, including mycotoxins, which are highly toxic for mammals. The accumulation of mycotoxins in food represents a serious risk for human and animal health and causes important economical losses in the agrofood industry, due to reductions in the quality of the agricultural raw materials. To avoid the concern related with the presence of mycotoxins in the food chain, the EU has developed a restrictive and specific normative that provide the highest levels of these secondary metabolites that can be present in feed and food. Due to the complexity of removing these mycotoxins from the food at a low cost, without affecting the properties of the food, the EU have developed strategies to prevent the contamination by the moulds that produce them. The different species of moulds infecting a specific crop could have different toxigenic profiles. Thus, their taxonomical identification in a particular matrix could be useful to predict the mycotoxins that might occur. It has been described that the presence of insects, such as the corn borers, in the plants could favor their contamination with mycotoxigenic moulds, acting the larvae as disease vectors or penetrating the moulds into the plant through the wounds produced by them. Besides, mould proliferation could be magnified by the stress produced in the plants after they have been damaged by insects. In this context, a reduction in the concentration of mycotoxins could be possible, at least in part, if the damage by these pests is controlled, being the use of Bt maize an important control method. This relationship has been observed in different studied carried out in the past decade. Nevertheless, the relation between the attack of corn borers and the presence of fungal infections is not very obvious. Moreover, in Spain the epidemiological data referring to the mycotoxigenic moulds that contaminate maize are scarce.

Based on the above, the general objectives of this Doctoral Thesis were: 1) To evaluate the effects of continuous cultivation of maize MON810 on the non-target soil microarthropods and on the community of arthropods present in the aerial part of the plant, assessing their exposure levels to the toxin, and identifying those taxa that fulfill the requirements to be employed as indicators in environmental risk assessments of Bt maize under Mediterranean agroecological conditions; and 2) to assess differences in levels of contamination with mycotoxigenic moulds and in the presence of mycotoxins, between cobs from Bt maize and insect damaged cobs from non-Bt maize, to determine whether the presence of the mycotoxigenic moulds is a good indicator of the contamination with mycotoxins and to analyze if the corn borers, *O. nubilalis* and *S. nonagrioides* act as vehicles of these moulds.

## Summary

Arthropods present in the aerial parts of the plants and the soil microarthropods were studied in an experimental farm-scale field in Madrid during three consecutive years (2009-2011), using yellow sticky traps and soil samples, respectively. Among the former, the most abundant insects were cicadellids (Hemiptera: Cicadellidae), delphacids (Hemiptera: Delphacidae), mymarids (Hymenoptera: Mymaridae), trichogrammatids (Hymenoptera: Trichogrammatidae), thrips (Thysanoptera) and chloropids (Diptera: Chloropidae). More than 64 % of the total captures were represented by the cicadellid *Zyginidia scutellaris* (herbivore) and the mymarid *Anagrus* spp. (parasitoid), closely related between them and with the maize plant. No negative effects of Bt maize were found on the abundance of these taxa, though differences among years were commonly present. We report for the first time the exposure to the protein Cry1Ab expressed in MON810-maize, in two cicadellids collected in the field, *Z. scutellaris* and *Empoasca* spp.

Mites and collembolans were the most abundant edaphic microarthropods collected from soil samples, representing together the 88% of the total specimens collected. They were identified to suborder and species level, respectively. Mites and collembolans abundances and the frequency of occurrence of collembolan species did not rely on the type of maize, except for *Parisotoma notabilis* (Schäffer), which was more abundant and frequent in Bt maize. However, significant differences in abundance among years were common in both groups. Noticeably, we found higher values of species richness and diversity of collembolans in Cry1Ab-expressing Bt maize than in non-Bt plots. Moreover, the toxin was detected for the first time in collembolans from the genus *Entomobrya* collected in the field, evidencing that these microarthropods are exposed to the toxin expressed in MON810-maize. At the same time, we have detected the presence of Cry1Ab toxin in a fraction of the decaying soil organic matter (OM) from the rhizosphere soil samples from Bt maize plots. The toxin was detected up to three months after maize harvest, with values ranging between 0.10 and 0.18 ng Cry1Ab/mg OM. When the insecticidal activity of the OM purified toxin was evaluated, low toxicity against *O. nubilalis* was found, indicating low concentration in an active form. From the results presented herein, we propose the herbivorous *Z. scutellaris*, the parasitoid *Anagrus* spp. and the communities of soil mites and collembolans as appropriate taxonomic groups to be employed as indicators of the possible effects of Bt maize. This selection is based on their exposure to the Cry1Ab toxin in the field, regular presence in maize fields, feasibility to be sampled and taxonomically identified and efficacy to detect differences between non-Bt and Bt maize

## Summary

after the analysis of their abundances. Also, the species richness and diversity indices have proven to be useful in the detection of differences between both types of maize.

During two consecutive seasons we have collected corncobs from non-Bt maize fields damaged by of corn borers and from Bt maize fields, in different fields located in three areas of Spain where maize is normally cultivated (Extremadura, Albacete y Valle del Ebro). The presence of 16 species of the genus *Fusarium* and *Aspergillus* was analyzed in the collected corncobs, by specific PCR protocols. Samples contaminated by *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *A. flavus* and the aggregate *A. niger* were detected. The species belonging to the section *Liseola*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, were the only that showed a higher frequency of occurrence in the samples from non-Bt maize. This is the first time that mycotoxigenic species, mainly from these three species of *Fusarium*, are isolated from larvae of the corn borers *O. nubilalis* and *S. nonagrioides* collected from commercial maize fields. Fumonisin were the mycotoxins more frequently found infecting the corncobs, being the damaged non-Bt ones significantly higher contaminated than corncobs from Bt maize. High levels of fumonisins have been related with the occurrence of corn borers in the corncob and with the presence of fungal species that produce these mycotoxins (*F. verticillioides* and *F. proliferatum*). The high frequency of occurrence presented by *F. subglutinans* in non-Bt corncobs rise alert about contamination of maize with moniliformin and other emerging mycotoxins. The frequency of occurrence of the rest of the moulds and mycotoxins (DON, T-2, HT-2, ZEA, OTA y aflatoxins) showed no relation with the type of maize cultivated.

In summary, we can conclude that the continuous cultivation of MON810 maize did not negatively affect the arthropods present in the aerial parts of the plants and the soil microarthropods studied herein, despite the exposure to the Cry1Ab toxin was proved in field specimens belonging to both groups. The selection of key groups, to be used as indicators to detect negative effects of Bt maize proposed here (the herbivorous *Z. scutellaris*, the parasitoid *Anagrus* spp., and the detritivore communities of soil mites and collembolans), represents a practical tool to be implemented in risk assessment evaluation of GM plants, demanded by Europe for new events and for the post-market monitoring of Bt-maize (MON810). Moreover, due to the efficient control that Bt maize exert on corn borers, it represents an effective method to reduced the levels of mycotoxins in comparison with non-Bt maize. The isogenic maize damaged by corn borers was principally contaminated with fumonisins, which is related with the elevated presence of moulds of the section *Liseola*, main producers of these mycotoxins. The

## Summary

presence of the mycotoxigenic moulds *F. verticillioides* and *F. proliferatum* in plants damaged by the corn borers, *O. nubilalis* and *S. nonagrioides* has demonstrated to be a good indicator of contamination with fumonisins.



## ABREVIATURAS

---

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>), en esta Tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

ACM: análisis de correspondencias múltiples

ANOVA: análisis de la varianza

DON: deoxinivalenol

EEG: ecuaciones de estimación generalizada

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

ERMA: evaluación de riesgo medioambiental

UE: Unión Europea

g. l.: grados de libertad

GM: genéticamente modificado

ha: hectáreas

HT-2: toxina HT-2

IC: intervalos de confianza

LOD: límite de detección

MO: materia orgánica recuperada del suelo de la rizosfera después de descartar las fracciones >0,84 y <0,20 mm.

MON: moniliformina

NIV: nivalenol

OTA: ocratoxina A

RS = rizosfera < 0,84 mm

T-2: toxina T-2

ZEA: zearalenona



# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL



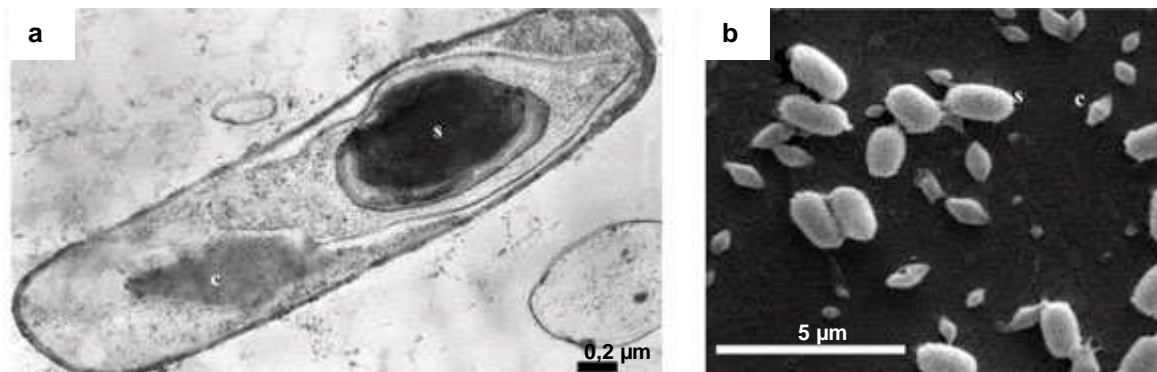
## 1.1. PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A INSECTOS

En la actualidad, las estrategias para luchar contra las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas están orientadas hacia un enfoque conocido como control integrado, el cual promueve “*la aplicación racional de una combinación de medidas biológicas, químicas, biotecnológicas y culturales, de modo que la utilización de productos fitosanitarios químicos se limite al mínimo necesario para mantener la población de la plaga en niveles inferiores a los que producirían daños o pérdidas inaceptables desde un punto de vista económico*” (Comisión Europea, 2001a). De este modo, los métodos de control de plagas buscan una disminución de la cantidad de productos químicos liberados al medio ambiente y la utilización de productos más selectivos hacia las especies plaga (Comisión Europea, 2009). En este contexto, con los avances en la ingeniería genética surgieron las técnicas de transformación de plantas, consiguiéndose diseñar plantas genéticamente modificadas (GM) resistentes a insectos mediante la incorporación al genoma de algunas plantas de genes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner que codifican proteínas insecticidas (Fraley *et al.*, 1983), conociéndose a éstas genéricamente como plantas Bt (Sanchis y Bourguet, 2008). Las primeras plantas Bt resistentes a insectos se obtuvieron en 1987 transfiriéndose genes a plantas de tabaco y tomate (Barton *et al.*, 1987; Fischhoff *et al.*, 1987). Posteriormente se han transferido genes de toxinas de *B. thuringiensis* a otras plantas, entre las que se encuentra el maíz (maíz Bt), para conferirles resistencia a determinadas plagas de insectos (Jouanin *et al.*, 1998; Koziel *et al.*, 1993).

Los cultivos Bt se consideran una herramienta adecuada dentro de las estrategias llevadas a cabo en un control integrado, ya que se consigue una protección específica frente a determinadas plagas, además de una reducción de la utilización de productos insecticidas, debido a que la expresión de la toxina se produce generalmente de manera constante a altas dosis durante la mayor parte del desarrollo de la planta (Brookes, 2009). Esta disminución supone un ahorro en los costes del cultivo, ya que se disminuyen los gastos en combustibles fósiles necesarios para su aplicación y se reduce su impacto sobre el medio ambiente y sobre la salud humana, especialmente de los agricultores que aplican los insecticidas (Sanahuja *et al.*, 2011; Gómez-Barbero *et al.*, 2008).

### 1.1.1. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva y aerobia, que se puede encontrar en distintos nichos ecológicos, aunque el suelo es el hábitat donde se localiza con más frecuencia (Schnepf *et al.*, 1998). Fue aislada por primera vez en 1901 en Japón como el agente causal de una enfermedad en los gusanos de seda (*Bombix mori* L.), pero hasta 1911 no adquirió su denominación actual tras ser aislada por Berliner como un patógeno de la polilla de la harina *Ephesia kuehniella* Zeller, siendo este investigador el primero que sugirió que podría ser utilizada para controlar poblaciones de insectos. En condiciones adversas produce endosporas, generando durante este proceso un cuerpo paraesporal conocido como cristal (**Figura 1.1**). Estas inclusiones cristalinas están compuestas por proteínas con propiedades insecticidas denominadas  $\delta$ -endotoxinas, las cuales se clasifican en proteínas Cry (de "crystal") y Cyt (de "cytolytic") (Bravo *et al.*, 2011). Aunque entre ellas no comparten homología de secuencias ni de estructura tridimensional, ambas toxinas actúan de igual modo destruyendo las membranas de las células epiteliales del intestino del insecto. Además, se ha descrito que las proteínas Cyt tienen la capacidad de potenciar la actividad tóxica de las proteínas Cry (Bravo *et al.*, 2007).



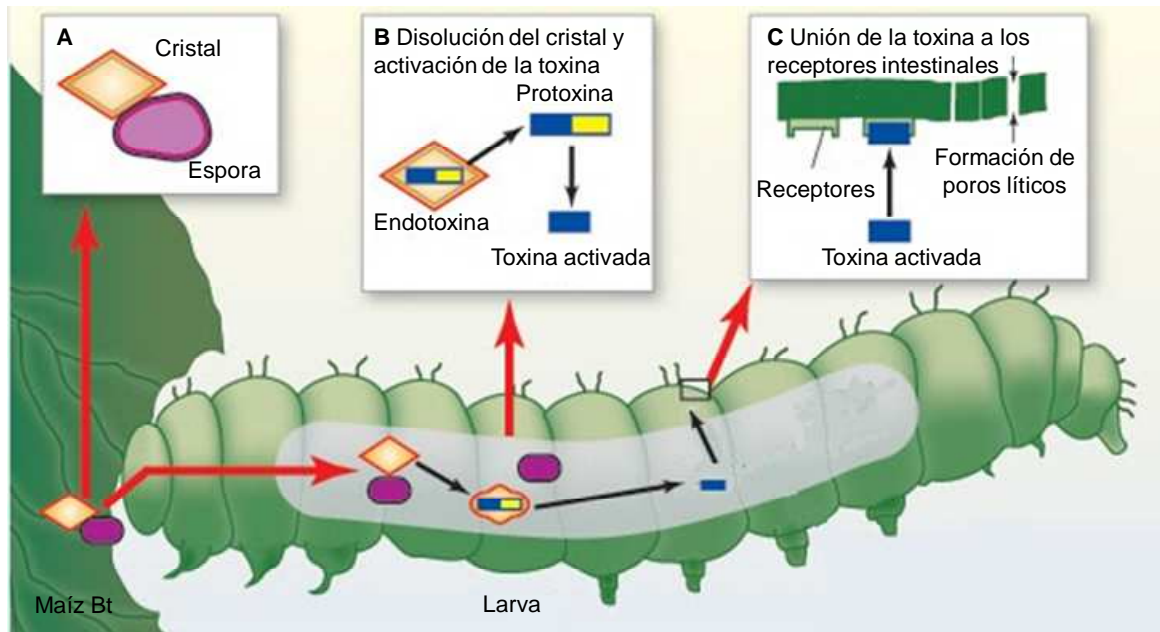
**Figura 1.1.** Imagen de *B. thuringiensis* tomada con microscopio electrónico. a) sección ultra-fina de una célula en esporulación bajo microscopía electrónica de transmisión, distinguiéndose el cristal bipiramidal (c) y la espora (s); b) imagen de las esporas (s) y los cristales (c) con un microscopio electrónico de barrido. Tomadas de Sauka *et al.* (2010).

Las  $\delta$ -endotoxinas se clasificaron en un principio según su especificidad (Höfte y Whiteley, 1989), pero a medida que se fueron descubriendo nuevas toxinas se propuso una nueva nomenclatura, basada en las relaciones filogenéticas establecidas según la similitud de secuencias. Con este criterio, primero se separaron en dos familias (Cyt y Cry), y posteriormente dentro de cada familia se clasificaron en cuatro categorías jerárquicas (indicadas con un número, una letra mayúscula, una letra minúscula y otro número) que se establecen en función del porcentaje de identidad que comparten (Crickmore *et al.*, 1998). Las proteínas Cry presentan una alta especificidad e inocuidad frente a vertebrados (Bravo y Soberón, 2008), mientras que las Cyt tienen un mecanismo de acción menos específico, observándose *in vitro* que resultan tóxicas hacia una amplia gama de células de insectos y de mamíferos (Gill y Hornung, 1987; Thomas y Ellar, 1983). Además de las  $\delta$ -endotoxinas producidas durante la fase de esporulación, algunas cepas de esta bacteria pueden producir otras toxinas durante la fase vegetativa:  $\beta$ -exotoxinas, enterotoxinas, exoenzimas, hemolisinas y proteínas Vip. De estas toxinas, solo las proteínas Vip se utilizan comercialmente en algunas plantas Bt, ya que el resto resultan tóxicas hacia una amplia gama de células de insectos y mamíferos (Gill y Hornung, 1987), no aconsejándose su utilización (WHO, 1999).

La investigación con *B. thuringiensis* debido, entre otras razones, a la especificidad de las toxinas Cry frente a dianas determinadas ha seguido avanzando, descubriéndose continuamente nuevas toxinas específicas para el control de insectos. Hasta el momento se han descubierto más de 750 toxinas Cry diferentes (Crickmore, 2015), aunque solo algunas son activas frente a determinadas especies de insectos, principalmente lepidópteros, dípteros y coleópteros (Lucena *et al.*, 2014; van Frankenhuyzen, 2009; Bravo *et al.*, 2007). Las proteínas Cry han sido las más utilizadas para el diseño de plantas Bt, concretamente las pertenecientes a la familia Cry1 que son activas mayoritariamente contra lepidópteros, y Cry3 frente a coleópteros (Koziel *et al.*, 1993). Mediante la inserción en el genoma vegetal de uno o más genes se construyen los eventos de transformación, a partir de los cuales se regenerará la planta transgénica y mediante técnicas clásicas de cruzamiento se seleccionaran las características que darán lugar a las distintas variedades comerciales.

### 1.1.2. Modo de acción de las toxinas Cry

Las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis* actúan por ingestión (**Figura 1.2**), tras la cual las inclusiones cristalinas que las contienen se disuelven en el intestino medio de algunos insectos (Bravo *et al.*, 2011). Como resultado de este proceso de solubilización, son liberadas al lumen intestinal unas proteínas aún inactivas (protoxinas). Se distinguen dos grupos de protoxinas en función de su tamaño; un grupo que comprende protoxinas de 130-140 kDa, como la proteína Cry1, y otro grupo que incluye protoxinas de 70-75 kDa, como las proteínas Cry2A y Cry3A. Estas protoxinas necesitan ser cortadas por las enzimas presentes en el intestino medio de los insectos para pasar a la forma activa. Las protoxinas de entre 130-140 kDa pierden alrededor de 500 aminoácidos del extremo C-terminal y unos 20-50 aminoácidos del extremo N-terminal, mientras que las protoxinas de entre 70-75 kDa pierden unos 20-50 aminoácidos, principalmente del extremo N-terminal (Bravo *et al.*, 2011). Tras la activación, la proteína atraviesa la membrana peritrófica y puede entonces unirse de forma específica a receptores que se encuentran en la membrana de las células epiteliales del aparato digestivo del insecto, siendo esta unión la que determina la especificidad de la acción de las proteínas Cry. Algunos posibles receptores que han sido identificados son glicoproteínas tipo cadherina, aminopeptidasas N (APN) o fosfatasas alcalinas (ALP) (Bravo *et al.*, 2011). La unión de la toxina a los receptores origina, por un mecanismo aún no conocido con exactitud, la formación de un poro lítico poco selectivo, que permite la salida de solutos de las células, lo que provoca su lisis por ósmosis (Vachon *et al.*, 2012; González-Cabrera *et al.*, 2006). Existen varios modelos que intentan explicar los mecanismos de acción que desencadenan finalmente la muerte del insecto. Uno de los modelos propone que la proteína una vez activada pasa por una serie de uniones secuenciales con diferentes receptores, primero de baja afinidad con las APN y con las ALP, para pasar a una unión de alta afinidad con la cadherina (Gómez *et al.*, 2006). Esta última unión produce que la proteína se agregue formando un oligómero que se inserta a la membrana y forma finalmente un poro provocando la lisis osmótica (Bravo *et al.*, 2011). Un segundo modelo postula que la proteína se une a un receptor primario (cadherina), desencadenando una cascada de señales intracelulares que provocan la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006). Se puede considerar que el mecanismo de acción de todas las proteínas Cry es muy similar, debido posiblemente a que estas proteínas tienen una estructura tridimensional muy conservada (Bravo *et al.*, 2007).



**Figura 1.2.** Mecanismo de acción de las proteínas Cry en el tubo digestivo de una larva de lepidóptero (imagen modificada de <http://www.coroflot.com/sholto/science-diagrams>).

Las toxinas Cry de *B. thuringiensis* no son tóxicas para los mamíferos (Bravo y Soberón, 2008) debido, por una parte, a que el pH de su aparato digestivo es demasiado bajo, por lo que no se produce la solubilización de los cristales que contienen las toxinas y, por otra, a que carecen de receptores específicos para las  $\delta$ -endotoxinas (Schnepf *et al.*, 1998).

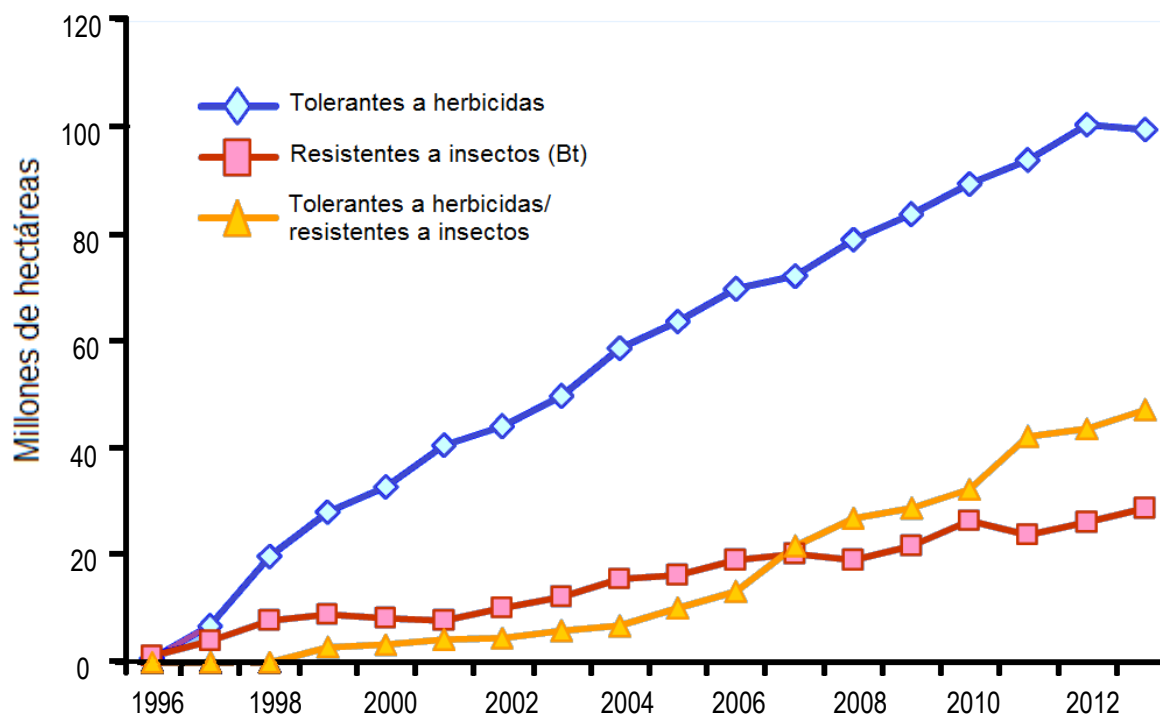
### 1.1.3. Aplicaciones de *B. thuringiensis*

La bacteria *B. thuringiensis* fue uno de los primeros agentes de origen biológico que se utilizó como insecticida comercial de uso tópico. Los formulados insecticidas basados en esta bacteria se componían principalmente de esporas que incluían varias toxinas Bt, iniciándose su venta en Francia en 1938. Actualmente el 90% de los bioinsecticidas que se comercializan están basados en Bt, debiendo su éxito a ser más selectivos que los insecticidas químicos de amplio espectro (Sanchis y Bourguet, 2009). A pesar de estas ventajas, estos formulados presentan problemas como una baja estabilidad en condiciones de campo debido su rápida degradación frente a la luz UV, además de la incapacidad de llegar a todos los tejidos de la planta, no teniendo una actividad sistémica

(Sanahuja *et al.*, 2011). Con el diseño de las plantas Bt mediante la transferencia de los genes que codifican las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* ambos problemas fueron solucionados.

En 1996 se aprobó en EE.UU. el cultivo de las primeras plantas GM resistentes a insectos: maíz que expresaba la toxina Cry1Ab, algodón que expresaba Cry1Ac y patata que expresaba Cry3A (Sanahuja *et al.*, 2011). A medida que las investigaciones fueron avanzando, se diseñaron plantas Bt que combinaban dos proteínas Cry diferentes, activas frente a la misma plaga, con el objetivo de retrasar la aparición de resistencia (Tabashnik *et al.*, 2013), las cuales comenzaron a cultivarse en el año 2002. Además, se ha desarrollado una nueva generación de plantas Bt capaces de expresar una combinación de diferentes toxinas activas frente a un amplio espectro de plagas diana (Bravo *et al.*, 2011), siendo un ejemplo de esto la variedad de maíz SmartStax comercializada en EE.UU., que expresa 8 toxinas insecticidas tanto Cry como Vip, teniendo como dianas a 6 plagas de insectos diferentes. Con el fin de mejorar las cualidades agronómicas, se han diseñado plantas que combinan ser resistentes a insectos además de presentar tolerancia a herbicidas. El cultivo de este tipo de variedades comenzó en 1998 y desde entonces han tenido una gran aceptación, superando desde 2008 en superficie sembrada a las variedades que únicamente presentan resistencia a insectos (**Figura 1.3**).

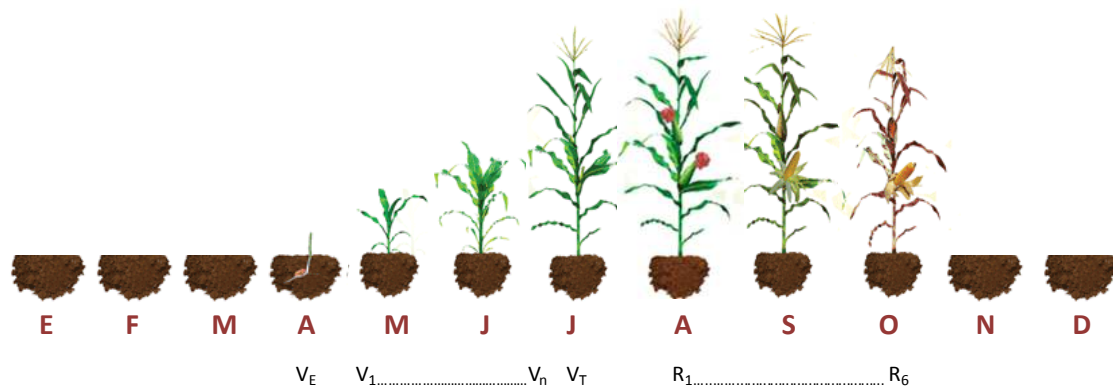
La adopción de las plantas transgénicas resistentes a insectos para su cultivo ha seguido una evolución diferente dentro de cada país, aunque a nivel mundial la superficie ha ido en aumento a lo largo de los años (**Figura 1.3**). En 2013, los únicos cultivos Bt que se sembraron de forma significativa fueron el maíz y el algodón, representando el 42,8% del total de hectáreas de cultivos GM que se cultivaron en ese año, lo que equivalió a un incremento de aproximadamente del 10,6% respecto al año anterior (James, 2013), siendo los países con mayor superficie de cultivos Bt, EE.UU. y Argentina. En el contexto mundial, la superficie de cultivos Bt en la UE es pequeña (GMO Compass, 2015), estando actualmente en Europa solo autorizado el cultivo de maíz Bt (MON810) que expresa la toxina Cry1Ab (apartado 1.5).



**Figura 1.3.** Superficie mundial cultivada de plantas GM tolerantes a herbicidas y/o resistentes a insectos desde 1999 hasta 2013. Modificado de ISAAA (2013).

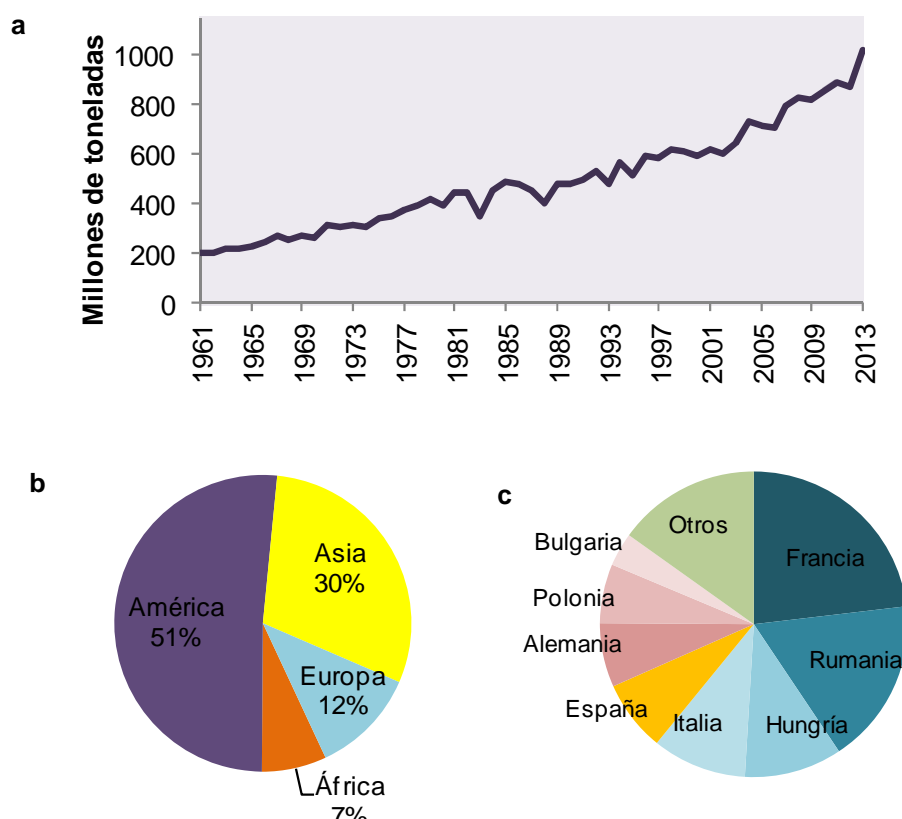
## 1.2. EL CULTIVO DEL MAÍZ

El maíz (*Zea mays*, L.) es una planta monoica de la familia de las Poaceas originaria de América, considerada como uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Aunque se comenzó a cultivar en zonas tropicales y subtropicales, actualmente se distribuye por una gran diversidad de ambientes. Durante su cultivo se distinguen dos fases principales de desarrollo de la planta: fase vegetativa y fase reproductiva (Abendroth *et al.*, 2011). En la fase vegetativa tiene lugar el crecimiento de la planta y el desarrollo de las hojas, culminando con la aparición de la flor masculina; la fase reproductiva comienza con la aparición de la inflorescencia femenina y en ella tiene lugar la madurez fisiológica de la mazorca (**Figura 1.4**).



**Figura 1.4.** Cultivo de maíz grano a lo largo de un año en un clima mediterráneo. Las letras rojas corresponden a los doce meses del año. [V: fase vegetativa ( $V_E$ : emergencia;  $V_1$ - $V_n$ : Crecimiento vegetativo;  $V_T$ : Floración masculina)] [R: fase reproductiva ( $R_1$ : Floración femenina;  $R_2$ - $R_6$ : Desarrollo y maduración de la mazorca)].

Desde el año 2001 el cultivo de maíz es el más importante entre los cereales a nivel mundial por su producción, llegando a alcanzar en 2013 más de 1.000 millones de toneladas. En 2013 ocupó el segundo puesto por detrás de la cebada en área de siembra, con alrededor de 184 millones de hectáreas sembradas en 119 países, siendo los principales países productores EE.UU. y China. Dentro de los 28 estados miembros de la Unión Europea (UE), el área de cultivo alcanzó en 2013 los 9,6 millones de hectáreas, teniendo un rendimiento total de más de 65 millones de toneladas. España fue el quinto país con mayor producción de los países de la Unión con casi 5 millones toneladas, por detrás de Francia, Rumania, Hungría e Italia (FAOSTAT, 2014) (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5.** Producción del cultivo de maíz en millones de toneladas. a) Producción mundial (1961-2013); b) Distribución de la producción en cada continente en el año 2013; c) Distribución de la producción en la UE en el año 2013 (FAOSTAT, 2014).

La producción de grano es la razón principal del cultivo del maíz, aunque todas las partes de la planta son utilizadas para diversos fines. El principal uso del maíz es como alimento animal y humano, tanto de forma directa como procesada (harinas, aceites, bebidas, etc.), aunque también es utilizado en la industria energética para la producción de bioetanol.

La domesticación y expansión del maíz estuvieron acompañadas de la aparición de plagas y enfermedades que afectan al rendimiento y calidad de grano, siendo las primeras una de las principales causas de pérdidas económicas. Las plagas más destructivas en Europa son los taladros del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) y *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae), junto con el gusano de la raíz (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, Coleoptera: Chrysomelidae), originario del norte de América, pero que actualmente se está extendiendo por los países

de centroeuropa (Meissle *et al.*, 2011; Mason *et al.*, 1996). Otras plagas de artrópodos descritas en Europa de menor importancia o de localización más regional incluyen noctuidos como *Agrotis* spp., *Helicoverpa armigera* (Hübner) y *Mythimna unipuncta* (Haworth), coleópteros tales como el gusano de alambre (*Agriotes* spp., Elateridae), el gorgojo del maíz (*Tanymecus dilaticollis* Gyllenhal., Curculionidae) y gusanos blancos (*Melolontha melolontha* Linnaeus, Scarabaeidae), diferentes especies de moscas y mosquitos incluyendo a *Oscinella frit* L., (Chloropidae), *Geomyzas* spp. (Opomyzidae) y *Tipula* spp. (Tipulidae), pulgones (*Rhopalosiphum maidis*, Fitch, Hemiptera: Aphididae), cicadélidos (*Zyginidia scutellaris* (Herrich-Schäffer), Hemiptera: Cicadellidae), trips como *Aeolothrips* spp. (Thysanoptera: Aeolothripidae) y *Frankliniella tenuicornis* Uzel (Thysanoptera: Thripidae) y ácaros (*Tetranychus urticae* Koch, Acari: Tetranychidae) (Meissle *et al.*, 2010).

Además, en el maíz aparecen un gran número de hongos, bacterias y virus patógenos que actúan como agentes causantes de diversas enfermedades que afectan al rendimiento y calidad del cultivo en Europa. Las enfermedades causadas por hongos son las de mayor importancia desde un punto de vista económico debido a su frecuencia de aparición y daño, concretamente aquellas causadas por un conjunto de especies del género *Fusarium* (Meissle *et al.*, 2010) que producen podredumbre de la raíz, el tallo y la mazorca (Dorn *et al.*, 2011). Otras especies de hongos que causan pérdidas importantes en el maíz son las del género *Aspergillus*, que proliferan principalmente durante el periodo de postcosecha (Abbas *et al.*, 2009). Determinadas especies de ambos géneros, además de actuar como agentes patógenos de la planta, también pueden producir una mezcla heterogénea de toxinas (micotoxinas), las cuales provocan efectos tóxicos en mamíferos (Bennett y Klich, 2003). Existen otros hongos que no producen micotoxinas pero que causan enfermedades de importancia económica en Europa, como *Pythium* spp., que afectan a la raíz y al tallo, *Helminthosporium* spp. y *Puccinia sorghi* Schw., que son agentes de diversas enfermedades de la hoja, *Acremonium* spp., que causan necrosis vascular y *Sphacelotheca* spp. y *Ustilago maydis* Corda, que producen un desarrollo anormal de la espiga (Meissle *et al.*, 2010).

### 1.3. LOS TALADROS DEL MAÍZ

#### 1.3.1. *Sesamia nonagrioides*: descripción, biología y distribución geográfica

*Sesamia nonagrioides*, conocida comúnmente como taladro mediterráneo del maíz (Arroyo, 1995), fue descrita por primera vez en 1824 en Sicilia, siendo una de las plagas más dañinas del maíz en los países del área mediterránea. Los adultos tienen comportamiento nocturno y su envergadura oscila entre los 2,5 y 4 cm y (**Figura 1.6**). Las alas anteriores son de color tostado con unas estrías grisáceas y el margen externo pardo, y las alas posteriores son de color blanco sucio. Las antenas son pectinadas en el macho y filiformes en la hembra. Las hembras emiten feromonas sexuales para atraer a los machos y tras la cópula, depositan la puesta en bandas más o menos alargadas, introduciendo el abdomen entre la vaina de la hoja y la caña (López *et al.*, 2003). A los cinco o seis días salen de los huevos unas pequeñas orugas de color rosáceo con los estigmas muy oscuros que comienzan a excavar galerías hacia el interior de la planta desde el primer estadio. Durante el desarrollo larvario habitualmente realizan 5 mudas (López *et al.*, 2001), pudiendo llegar a alcanzar en su último estadio de 3,5 a 4 cm (Anglade, 1972). Al cabo de aproximadamente un mes, las larvas pupan dentro de la caña y tras unos 10 días emergen los adultos de la siguiente generación.

El número de generaciones al año depende de la zona climática, la latitud y la temperatura. En los países del área circunmediterránea las poblaciones localizadas en latitudes más al norte tienen un menor número de generaciones (Eizaguirre y Fantinou, 2012). Por ejemplo, en Grecia se ha señalado la existencia de tres generaciones y una cuarta parcial, mientras que en la Península Ibérica esta especie completa dos generaciones, teniendo una tercera de forma parcial (Velasco *et al.*, 2007; López *et al.*, 2001), que tiene lugar dependiendo de que las larvas en el último estadio entren en diapausa para pasar el invierno o pupen, dando lugar a una nueva generación. La inducción de la diapausa está asociada a fotoperiodos cortos y bajas temperaturas y permite a la larva sobrevivir ante condiciones climáticas adversas aletargando su metabolismo (Eizaguirre *et al.*, 1994). Cuando las larvas entran en estado de diapausa pasan el invierno en el interior de las cañas de maíz que quedan en el campo tras la cosecha, hasta la primavera siguiente que es cuando pupan y emergen los adultos.

Fue citada por primera vez en la Península Ibérica en 1913 en Portugal (Mendes, 1913), aunque las primeras evidencia de esta especie actuando como plaga del maíz datan de 1902 en España (Delgado de Torres, 1929). Aunque *S. nonagrioides* ha sido descrita

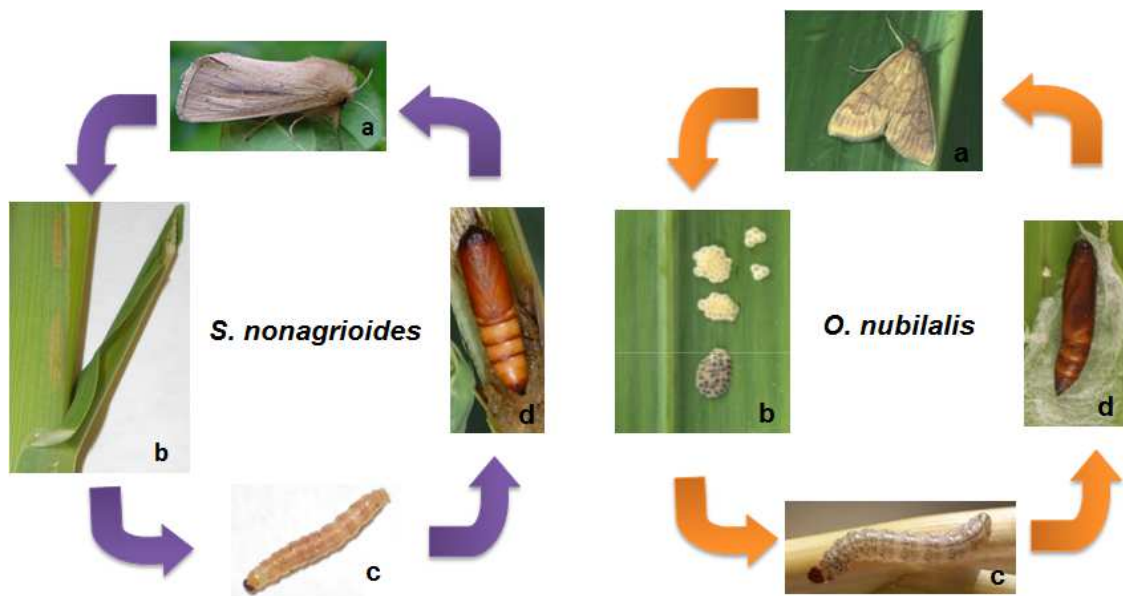
como una especie oligófaga, su rango de huéspedes es poco conocido, ya que el número de estudios sobre esta especie limitado al ser una plaga restringida a los países del área mediterránea. Su presencia ha sido citada en diversos cultivos de la familia Poaceae como sorgo, mijo, arroz, trigo, avena o cebada, además de poder encontrarse en gramíneas silvestres como *Phragmites* spp., *Arundo* spp. y *Setaria* spp (Eizaguirre y Fantinou, 2012; Galichet, 1982). *Sesamia nonagrioides* es la única especie del género que está presente actualmente en Europa, junto con *S. cretica* Lederer, cuyas poblaciones aumentan ocasionalmente, posiblemente por insectos procedentes de Egipto (Moyal *et al.*, 2002), aunque debido a esta temporalidad no se considera un taladro de importancia económica en los países europeos. Según un artículo reciente, actualmente *S. nonagrioides* presenta una distribución fragmentada con tres poblacionales aisladas: una en África Oriental, otra en África Occidental y otra en el Paleártico (Moyal *et al.*, 2011).

### **1.3.2. *Ostrinia nubilalis*: descripción, biología y distribución geográfica**

*Ostrinia nubilalis* es conocida como taladro o barrenador europeo del maíz y constituye una de las plagas de mayor importancia económica en este cultivo en Europa y América. Los adultos son más pequeños (entre 2 y 2,5 cm de envergadura) que los de *S. nonagrioides*, teniendo también comportamiento nocturno (Bailey *et al.*, 2007). Son buenos voladores, capaces de dispersarse decenas de kilómetros durante su etapa como adulto (Showers *et al.*, 2001). Las hembras presentan las alas anteriores de color ocre con bandas irregulares onduladas más oscuras, y las alas posteriores tienen un color pardo-amarillento. Los machos son de menor tamaño y algo más oscuros. A diferencia de *S. nonagrioides*, esta especie deposita la puesta sobre las hojas, concretamente en el envés para evitar su exposición al sol y a la lluvia (Anglade, 1972). Estas puestas suelen estar formadas por grupos de aproximadamente unos treinta huevos (Suverkropp *et al.*, 2008). Las larvas presentan manchas más oscuras en cada segmento lo que les hace ser de un color pardo claro con una banda oscura en el dorso (**Figura 1.6**). Las larvas no penetran en el tallo hasta el tercer estadio, y una vez dentro se alimentan de la médula del maíz excavando galerías en el tallo (Mason *et al.*, 1996).

*Ostrinia nubilalis* es polivoltina al igual que *S. nonagrioides*, pudiendo completar en la Península Ibérica de dos a tres generaciones por año (Velasco *et al.*, 2007). Su ciclo biológico es muy similar al de *S. nonagrioides*, entrando igualmente en diapausa durante

el invierno y emergiendo los adultos a comienzos de la primavera (Cordero *et al.*, 1998). Es una especie polífaga, siendo capaz de alimentarse de gran diversidad de plantas, conociéndose más de 200 especies de plantas huéspedes, tanto silvestres como cultivadas (Lewis, 1975), entre las que se encuentran gramíneas (sorgo, arroz, cebada, mijo), solanáceas (pimiento, tomate), compuestas (dalia, crisantemo), crucíferas (col), etc. Aunque es un herbívoro generalista, tiene preferencia por ciertas especies en función de los recursos que aporte la planta o sus compuestos tóxicos, viviendo preferiblemente a expensas del maíz en su zona de distribución. Es una especie nativa de Europa, habiendo sido citada por primera vez como plaga de maíz en 1884 en Francia (Guennelon y Audemard, 1960) y en 1894 en España (Delgado de Torres, 1929). La primera referencia de esta plaga en EE.UU. data de 1917, posiblemente introducida a través de restos vegetales (Balachowsky y Mesnil, 1935), expandiéndose rápidamente por todo el país. Su distribución actual abarca Europa, norte de África y norte de América (CABI, 2007).

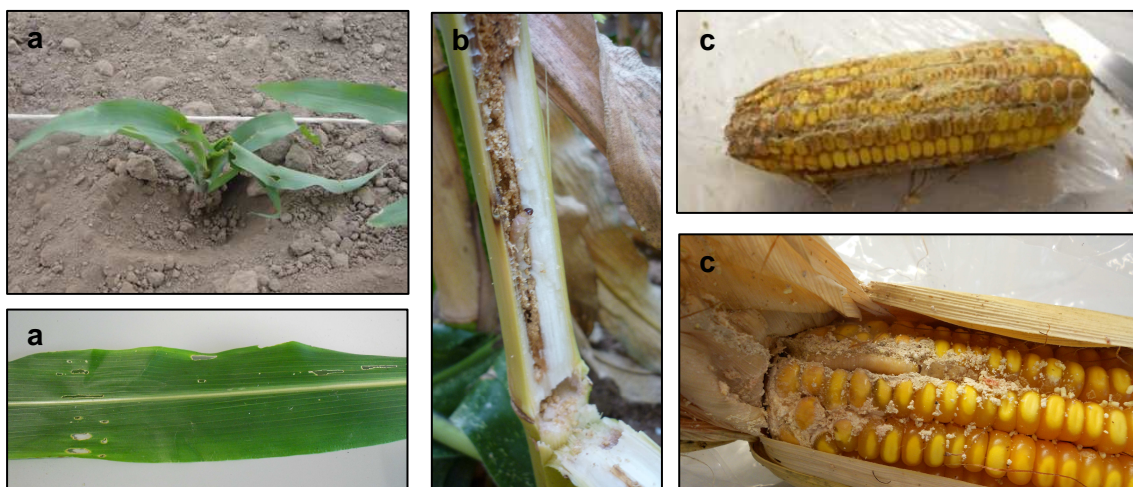


**Figura 1.6.** Ciclos biológicos de *S. nonagrioides* y *O. nubilalis*. Adulto (a), huevos (b), larva (c) y pupa (d).

### 1.3.3. Daños e importancia económica de los taladros del maíz

Los taladros del maíz causan daños en estado larvario. Las larvas de ambas especies tienen comportamiento endófito, es decir, penetran en el interior de la caña y se alimentan de su médula, por lo que producen daños similares (Velasco *et al.*, 2002), que dependen del estado fenológico en el que se encuentre la planta (Malvar *et al.*, 2002) (**Figura 1.7**). Normalmente, la primera generación de los taladros coincide con la fase más temprana del cultivo del maíz. En este caso las larvas se alimentan de las hojas y pueden provocar la muerte de la planta si destruyen el meristemo apical (Velasco *et al.*, 2002). El ataque de esta primera generación no suele producir muchos daños debido a que el número de individuos que sobreviven al invierno es reducido, dando lugar a una progenie poco numerosa. La segunda generación suele ser mucho más abundante debido a sus altas tasas de reproducción, coincidiendo habitualmente con plantas que ya han completado su fase vegetativa. Las larvas excavan galerías y se alimentan del interior de la caña, causando pérdidas de rendimiento debidas a la disminución en la disponibilidad de asimilados de la planta por la interrupción del flujo de los haces vasculares del tallo, lo cual puede afectar al crecimiento de la planta, y provocar la maduración incompleta de la mazorca (Mason *et al.*, 1996). Estos daños causan además debilitamiento de la estructura de la planta, por lo que tendrán más probabilidades de sufrir caídas ante posibles adversidades climáticas como viento o lluvia, incrementándose más las pérdidas ya que estas plantas no pueden ser cosechadas. Además, las larvas de ambas especies, aunque principalmente de *O. nubilalis*, pueden pasar a la inflorescencia masculina y a la mazorca causando daños (Bode y Calvin, 1990). Por otro lado, los orificios de acceso de los taladros a la planta suponen un punto de entrada de posibles agentes patógenos causantes de diversas enfermedades, facilitando además su propagación por la planta.

Se ha estimado que entre 2,25 y 4 millones de hectáreas de maíz se ven directamente afectadas al año por el ataque de los taladros en Europa (Brookes, 2009), lo que causa unas pérdidas medias anuales de rendimiento que pueden oscilar entre el 5 y el 30% (Meissle *et al.*, 2010) en Europa y entre el 5 y el 7% en España (Brookes, 2002).



**Figura 1.7.** Daños producidos por los taladros del maíz en hojas (a), caña (b) y en mazorcas (c).

#### 1.3.4. Control de los taladros del maíz

El control de los taladros del maíz se ha abordado con diferentes estrategias, aunque en general solo se emprenden medidas en aquellas zonas donde el cultivo sufre altos niveles de infestación (Vasileiadis *et al.*, 2011). En algunos casos se emplea el control químico mediante la aplicación foliar de insecticidas de amplio espectro como piretroides y organofosforados, aunque se ha percibido poco eficaz en Europa. Esto es principalmente debido a que por el comportamiento endófito de las larvas, las propias cañas actúan como barrera de protección, solo siendo efectivos durante un tiempo limitado (entre la eclosión de los huevos y la entrada de las larvas en la caña) (Brookes, 2007). En el caso particular de *O. nubilalis*, su control biológico mediante el uso de himenópteros parasitoides del género *Trichogramma* que parasitan sus huevos se utiliza en Francia en 150.000 ha cada año (Meissle *et al.*, 2010). La dificultad de este método radica en que para que sea efectivo es necesario que exista una coincidencia temporal entre los parasitoides y los huevos del taladro. Otro método biológico también empleado es la utilización de bioinsecticidas Bt, aunque presenta los problemas descritos anteriormente (apartado 1.1.3) como la inestabilidad en el campo. En la mayoría de las regiones europeas se toman medidas culturales como el arado o la destrucción de las cañas después de la cosecha para conseguir reducir el número de larvas invernantes

(Meissle *et al.*, 2011). Además, la plantación de otras plantas huésped en las zonas colindantes al cultivo, pueden prevenir la entrada de los taladros al campo de maíz para la puesta de los huevos (Stamps *et al.*, 2007).

En la actualidad, los métodos de control basados en el desarrollo de plantas resistentes a los taladros son los que han mostrado mayor eficacia. Por un lado, mediante métodos de mejora genética convencional, se han conseguido seleccionar líneas resistentes con características determinadas relacionadas con la longitud de la planta o la dificultad de rotura del tallo, que les confiere cierta resistencia frente al ataque de los taladros (Butrón *et al.*, 2014; Samayoa *et al.*, 2014). Pero el método que se ha mostrado más efectivo en zonas con alta incidencia de la plaga en Europa es el maíz que expresa la toxina Cry1Ab, específica para el control de los taladros (maíz Bt) (Gómez-Barbero *et al.*, 2008). La expresión de las toxinas Bt en el maíz se cita a menudo en la literatura como constitutiva, es decir, que se produce en todos los tejidos en todas las fases de desarrollo. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que cada evento de transformación tiene un perfil de expresión distinto en cada parte de la planta y en cada fase de su desarrollo, lo que podría afectar al control de los taladros (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1.** Concentración de la toxina Cry1Ab (ng/mg) en cada tejido, en distintos eventos de transformación de maíz.

Evento	Grano	Hoja	Polen	Caña	Raíz	Fuente
<b>Evento 176</b>	n.a.	3,04 <sup>b</sup>	4,32 <sup>b</sup>	n.a.	<0,04 <sup>b</sup>	USDA(1994)
	0,05 <sup>a</sup>	2,8-4,4 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	USEPA(2001)
<b>MON810</b>	0,19-0,39 <sup>a</sup>	7,9-10,34 <sup>a</sup>	<0.09 <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	USEPA(2001)
<b>Bt11</b>	1,4 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>	<0.09 <sup>b</sup>	n.a.	2,2-37,0 <sup>b</sup>	USEPA(2001)

<sup>a</sup> Peso fresco

<sup>b</sup> Peso seco

n.a.: no analizado

## 1.4. LAS MICOTOXINAS Y EL CULTIVO DE MAÍZ

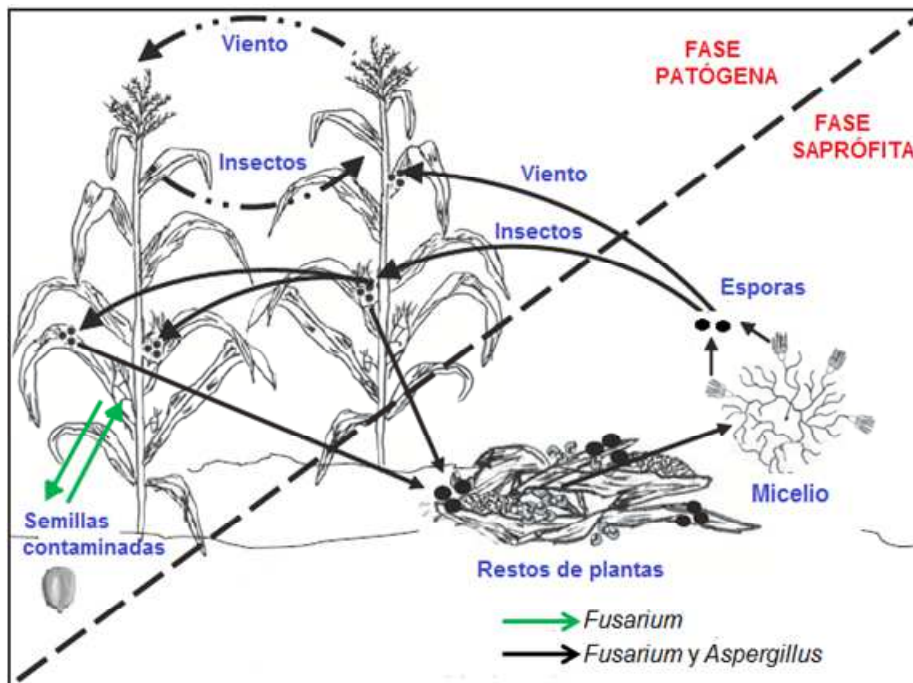
Las micotoxinas son metabolitos secundarios, tóxicos para mamíferos, sintetizados por ciertos hongos filamentosos como resultado de su crecimiento (Pitt, 1996). Aunque estas moléculas no son esenciales para el crecimiento y/o desarrollo de los hongos, se ha visto que pueden ser utilizados como arsenal molecular para competir con otros microorganismos en su ambiente natural (Keller *et al.*, 2005; Vining, 1990), por lo que su síntesis favorecería la proliferación del hongo (Fox y Howlett, 2008). La presencia de micotoxinas en los alimentos representa un riesgo para la salud de los seres humanos y de los animales, ya que la ingestión, inhalación o absorción cutánea de estas sustancias producen una respuesta tóxica conocida con el nombre de micotoxicosis, que en último término puede provocar la muerte (Bennett y Klich, 2003). Además, esta contaminación con micotoxinas ocasiona pérdidas económicas en la agricultura al reducir la calidad de la cosecha, así como en el sector ganadero, ya que el consumo de productos contaminados por animales de interés zootécnico produce una disminución de los índices reproductivos y un aumento de la morbilidad y mortalidad (Wu, 2006).

### 1.4.1. Hongos productores de micotoxinas y tipos de micotoxinas

La mayoría de las especies de hongos capaces de producir micotoxinas que afectan al maíz pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*, pero las especies más dañinas en el sur de Europa se incluyen dentro de los dos primeros (Meissle *et al.*, 2010). Durante su ciclo infeccioso en el maíz, ambos géneros pueden tener una etapa patógena y otra saprófita (**Figura 1.8**). En la etapa patógena las especies infectan los tejidos de la planta durante el cultivo causando enfermedades, y en la etapa saprófita se produce la colonización de los residuos vegetales que se acumulan principalmente después de la cosecha. Históricamente las poblaciones fúngicas micotoxígenas asociadas a los cultivos se han clasificado en función de si la síntesis de micotoxinas tiene lugar principalmente durante el cultivo o durante el almacenamiento de las materias primas o productos derivados (Miller *et al.*, 1995). Las especies de *Fusarium* requieren una alta humedad para su crecimiento, clasificándose dentro de los hongos fitopatógenos o de precosecha, ya que es durante el cultivo cuando se produce el crecimiento del mismo y la síntesis de micotoxinas (Lacey y Magan, 1991). Las especies de *Aspergillus* son más dañinas después de la cosecha, en la fase que actúan como saprófitos, por lo que se conocen como hongos de postcosecha, proliferando y

produciendo las mayores cantidades de micotoxinas principalmente en condiciones de almacenamiento, donde hay una baja humedad (Abbas *et al.*, 2009).

En ambos casos, en el campo, el inóculo primario de la infección se encuentra en los residuos de las plantas de la cosecha anterior, donde sobreviven de forma saprófita o en forma de esporas (Naef y Défago, 2006; Munkvold, 2003a), concretamente como clamidiosporas, macro y microconidios en el caso de las especies de *Fusarium* (Goswami y Kislner, 2004), y como esclerocios en el caso de *Aspergillus* (Abbas *et al.*, 2008). Posteriormente, la lluvia, el viento (Yates y Sparks, 2008) y algunos insectos (Sobek y Munkvold, 1999) favorecen la dispersión de las esporas hacia las plantas cultivadas. Cuando encuentran una fuente de nutrientes adecuada y unas condiciones favorables específicas para cada especie, el hongo se propaga rápidamente y puede sintetizar micotoxinas. Además, durante el periodo de crecimiento de las plantas, los tejidos infectados pueden actuar como fuente de nuevos inóculos, propagando el hongo a plantas adyacentes gracias al viento o a los insectos. En el caso de *Fusarium*, el inóculo también se puede encontrar en las semillas de plantas contaminadas, y tras su germinación el hongo podría colonizar la planta (Bacon *et al.*, 2001) (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Ciclo infeccioso de *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. en un sistema de cultivo de maíz, diferenciándose la etapa como hongo saprófita y como patógeno. Modificado de Abbas *et al.* (2009).

Se estima que podrían existir miles de micotoxinas, pero hasta la fecha se han identificado unas 300 diferentes, de las cuales solo un número reducido son de importancia por su toxicidad o capacidad para incorporarse a la cadena alimentaria (CAST, 2003). En el caso del maíz, las micotoxinas con mayor presencia son las fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, moniliformina, aflatoxinas y ocratoxinas (Cheli *et al.*, 2014) (**Tabla 1.2**). Las fumonisinas, tricotecenos, zearalenona y moniliformina son sintetizadas principalmente por diferentes especies del género *Fusarium*, siendo las fumonisinas las micotoxinas más importantes en el cultivo del maíz por su frecuencia de aparición (Munkvold, 2003b). Las aflatoxinas y ocratoxinas son producidas por especies del género *Aspergillus*. De éstas, la aflatoxina B<sub>1</sub> es la más tóxica (Wu y Guclu, 2012), habiéndose identificado como el agente cancerígeno natural más potente que se conoce (Kensler *et al.*, 2011). Es importante señalar que una misma especie de hongo es capaz de producir más de una micotoxina, según el quimiotipo del hongo, y que una determinada micotoxina puede ser producida por más de una especie de hongo.

**Tabla 1.2.** Micotoxinas más importantes en el maíz, y géneros a los que pertenecen las principales especies productoras encontradas en este cultivo, indicándose los efectos que producen en los seres humanos. Modificado de Turner *et al.* (2009).

Micotoxina	Tipos	Hongo productor	Efectos en humanos
<b>Fumonisin</b>	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub>	<i>Fusarium</i>	Cáncer, hepatotoxicidad
<b>Tricotecenos</b>	DON, T-2, HT-2, NIV	<i>Fusarium</i>	Inmunosupresión, hemorragia gastrointestinal
<b>Zearalenona</b>	-	<i>Fusarium</i>	Cáncer, inmunosupresión
<b>Moniliformina</b>	-	<i>Fusarium</i>	Cáncer, hemorragia intestinal
<b>Aflatoxinas</b>	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	<i>Aspergillus</i>	Cáncer, inmunodeficiencia, hepatitis aguda
<b>Ocratoxinas</b>	OTA	<i>Aspergillus</i>	Cáncer, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, teratogénesis

DON: deoxinivalenol; NIV: nivalenol; OTA: ocratoxina A; T-2: toxina T-2; HT-2: toxina HT-2.

#### **1.4.2. Factores asociados a la proliferación de hongos micotoxígenos y a la producción de micotoxinas**

La proliferación de los hongos micotoxígenos y la producción de micotoxinas se ve afectada por distintos factores, los cuales se pueden dividir en físicos, químicos y biológicos (D'Mello y MacDonald, 1997):

**a)** Factores físicos: la humedad y la temperatura son los factores físicos más determinantes en el crecimiento de los hongos y en la producción de micotoxinas (Alkhayyat y Yu, 2014). Por un lado, el agua disponible determina la germinación de las esporas y la tasa de crecimiento del hongo, afectando directamente a la biosíntesis de las toxinas. Además, cada especie fúngica tiene unas temperaturas mínima, máxima y óptima para su crecimiento y para la producción de micotoxinas (Marín *et al.*, 2010a; b; Pazzi *et al.*, 2006). Por este motivo, la distribución de los hongos micotoxígenos puede diferir en función del área geográfica, debido a las condiciones climáticas de temperatura y humedad específicas de cada zona (de la Campa *et al.*, 2005; Logrieco *et al.*, 2003).

**b)** Factores químicos: incluyen fundamentalmente la aplicación de fungicidas, así como otros productos químicos que buscan una reducción del crecimiento del hongo (Zain, 2010), lo que afectaría a la producción de micotoxinas.

**c)** Factores biológicos: estos factores se refieren a las interacciones entre el hongo colonizador y el propio sustrato u otros organismos presentes en él. En el caso del cultivo del maíz, un factor biológico clave que afecta a la producción de micotoxinas son los daños producidos por los insectos en la planta, estando evidenciada la existencia de una correlación positiva entre los daños provocados por el taladro *O. nubilalis* y los niveles de fumonisinas en los granos (Ostry *et al.*, 2010). Estos insectos actuarían como vectores de la infección, trasladando esporas fúngicas sobre la cutícula o en las heces desde una planta infectada hasta una sana (Darvas *et al.*, 2011; Sobek y Munkvold, 1999). Además, los hongos entrarían más fácilmente a la planta por las heridas producidas por las larvas (Munkvold *et al.*, 1999). Por su parte, los hongos pueden atraer o inhibir la presencia de otros insectos como los nitidúlidos (Coleoptera: Nitidulidae) o incluso pueden servir como alimento para ellos (Bartelt y Wicklow, 1999), aumentando así la probabilidad de que éstos actúen como vectores (Dowd *et al.*, 1998). Otro factor biológico que influye es la presencia de otras especies de hongos en el sustrato, debido a

la competencia que se establece entre ellos, especialmente por los nutrientes disponibles del medio (Marín *et al.*, 1998a).

### 1.4.3. Seguridad alimentaria y micotoxinas

Las micotoxinas han afectado al hombre desde el inicio de la agricultura, causando numerosas muertes y enfermedades tanto a humanos como a los animales domésticos (Richard, 2007; Zinedine *et al.*, 2007; Beardall y Miller, 1994). En términos de seguridad alimentaria son el riesgo más importante asociado con el consumo de cereales (Cheli *et al.*, 2014). A pesar de ello, el interés por las micotoxinas y las enfermedades que producen no se inició hasta la década de los 60, tras la muerte masiva de cientos de pavos en Inglaterra por el consumo de piensos contaminados con aflatoxinas (Asao, *et al.*, 1963). A partir de entonces se descubrieron otras toxinas y se desarrollaron normativas con las que controlar los niveles permitidos en los alimentos, de modo que en el año 2003 ya eran más de 100 países los que tenían algún tipo de normativa al respecto (FAO, 2004).

En el caso de la UE, hasta el año 2001 no se inició el desarrollo de una legislación que marcara los niveles máximos permitidos de toxinas en los diferentes productos alimenticios destinados al consumo humano (Comisión Europea, 2001), a la cual se fueron incorporando nuevas normativas (Comisión Europea, 2005; Comisión Europea, 2004; Comisión Europea, 2002b). La redacción de estas normativas estuvo impulsada por la adopción de la Ley General de Alimentos (Comisión Europea, 2002a) y la creación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés). A pesar de ello, esta normativa era poco restrictiva y concreta con los productos, y no fue hasta 2006 cuando se creó un reglamento único y más estricto (Comisión Europea, 2006c). Posteriormente, con el aumento de los estudios sobre micotoxinas y la incorporación de nuevos países a la UE, la Comisión varió los niveles máximos permitidos y aumentó el rango de productos donde se aplica la legislación, entre los que se describía detalladamente los productos de maíz y derivados (Comisión Europea, 2013a; Comisión Europea, 2007). Actualmente, en la UE existe regulación para las aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), fumonisinas, y T-2 y H-T2 en alimentos destinados para el consumo humano, especificándose los productos de maíz (**Tabla 1.3**). En cambio, en los cereales destinados a la alimentación animal solo se han establecido límites para la aflatoxina B<sub>1</sub> (Comisión Europea, 2002b),

existiendo para el resto de las micotoxinas unos valores recomendados (Comisión Europea, 2006b) (**Tabla 1.3**). Además, también existe una regulación que establece los contenidos máximos de micotoxinas que pueden contener los productos derivados de los animales como carne, huevos o leche, siendo de especial importancia la aflatoxina M<sub>1</sub>, micotoxina derivada de la aflatoxina B<sub>1</sub>, que es excretada en la leche de los mamíferos por ingesta de pienso contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub>.

**Tabla 1.3.** Contenido máximo (µg/kg) de las micotoxinas en los productos alimenticios de maíz o elaborados a partir de maíz para el consumo humano y recomendaciones para los alimentos destinados al consumo animal establecidos por la UE.

Micotoxinas	Consumo humano			Consumo animal (materias primas para piensos)	
	Maíz no elaborado	Maíz y alimento a base de maíz destinado al consumo humano directo	Alimentos para lactantes y niños de corta edad	Cereales (incluido el maíz)	Productos a base de maíz
Fumonisin (FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> ) <sup>a,e</sup>	4.000	1.000 <sup>f</sup>	200	60.000	60.000
Zearalenona <sup>a,e</sup>	350	100	20	2.000	3.000
Deoxinivalenol <sup>a,e</sup>	1.750	750	200	8.000	12.000
T-2 + H-T2 <sup>b</sup>	200	100	15	-	-
Aflatoxinas (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> ) <sup>c,d</sup>	4	10	0,1 <sup>g</sup>	20 <sup>g</sup>	20 <sup>g</sup>
OTA <sup>c,e</sup>	5	3	0,05	250	250

<sup>a</sup> Comisión Europea (2007) para los productos destinados al consumo humano.

<sup>b</sup> Comisión Europea (2013a) para los productos destinados al consumo humano.

<sup>c</sup> Comisión Europea (2006c) para los productos destinados al consumo humano.

<sup>d</sup> Comisión Europea (2002b) para los productos destinados al consumo humano.

<sup>e</sup> Comisión Europea (2006b) para los productos destinados al consumo animal (recomendaciones).

<sup>f</sup> excepto para los cereales para el desayuno a base de maíz y aperitivos de maíz para los cuales el límite es de 800 µg/kg.

<sup>g</sup> referido solo a aflatoxina B<sub>1</sub>.

#### 1.4.4. Estrategias de prevención y control de la presencia de micotoxinas en el maíz

La implementación en la UE de una legislación que regula los niveles de micotoxinas en los alimentos ha impulsado la necesidad de desarrollar métodos de control de estos tóxicos, diferenciándose dos estrategias: por un lado la inhibición del crecimiento de hongos en el alimento (prevención de la contaminación con micotoxinas), y por otro su detoxificación en el caso de que los alimentos ya estén contaminados. En cuanto a los métodos de detoxificación, la UE ha regulado algunos de ellos, prohibiendo la utilización

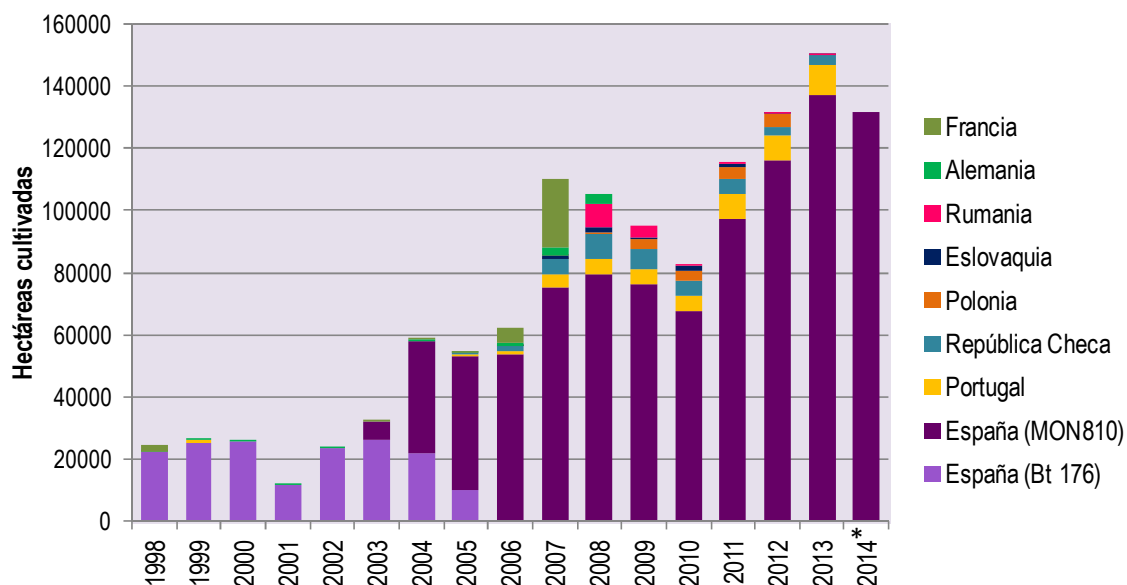
de tratamientos químicos (Comisión Europea, 2006c). Otros métodos de eliminación utilizados, como los físicos y biológicos, no resultan totalmente efectivos en el maíz, ya que pueden dañar la materia prima, no eliminando completamente la toxina del alimento (Kabak y Dobson, 2009). Además, la UE ha prohibido la mezcla de productos alimenticios de partidas que superen los contenidos máximos con otras que no lo hagan como técnica para reducir los niveles de micotoxinas en el producto final (Comisión Europea, 2006b).

Debido a estas dificultades, las estrategias basadas en la prevención de la contaminación resultan más eficaces (Aldred y Magan, 2004). La Comisión del Codex Alimentarius establecida por la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha elaborado un código de prácticas con el objetivo de prevenir y/o reducir los contaminantes en los alimentos. La primera línea de defensa contra la contaminación del maíz con micotoxinas se basa en tener unas buenas prácticas agrícolas (BPA), seguidas por la aplicación de buenas prácticas de fabricación (BPF) durante la manipulación, el almacenamiento y la distribución del maíz. Dentro de las BPA, se recomienda la reducción al mínimo de los daños producidos por los insectos, aconsejándose la utilización de variedades de plantas desarrolladas especialmente para resistir a las plagas de insectos (Codex Alimentarius, 2012). Concretamente en el cultivo del maíz, la utilización de maíz Bt resistente a los taladros del maíz, *S. nonagrioides* y *O. nubilalis*, representa una herramienta eficaz para disminuir sus daños y en consecuencia la producción de micotoxinas (Folcher *et al.*, 2010; Munkvold *et al.*, 1999), por lo que se considera una estrategia eficaz para la prevención de la acumulación de micotoxinas en los alimentos (Abbas *et al.*, 2013).

## 1.5. EL MAÍZ Bt EN EUROPA

A nivel mundial, en la actualidad están disponibles para su comercialización un gran número de variedades de maíz Bt diseñadas a partir de 9 toxinas distintas, que aportan resistencia frente al ataque de distintas especies de lepidópteros (Cry1Ab; Cry1A.105; Cry1F; Cry2Ab2 y Vip3Aa20) y coleópteros (Cry3A; Cry34Ab1; Cry35Ab1 y Cry3Bb1) (CERA, 2015). En Europa, el único cultivo transgénico autorizado es el maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab de la bacteria *B. thuringiensis* spp. *kurstaki*, para el control de a los taladros, *O. nubilalis* y *S. nonagrioides*, iniciándose su cultivo en 1998. Desde entonces y hasta la actualidad, únicamente en 8 de los 28 estados miembros de la UE se

ha cultivado en algún momento, aunque solo en España su uso ha tenido una alta aceptación entre los agricultores (**Figura 1.9**).



**Figura 1.9.** Superficie (ha) cultivada en Europa con variedades de maíz Bt que expresan la toxina Cry1Ab en el periodo 1998-2014. En el caso de España se especifican las hectáreas cultivadas con cada evento (Bt176 o MON810) (USDA, 2013). \* En 2014 se cultivó maíz Bt (MON810) en España, Portugal, República Checa, Rumania y Eslovaquia, pero solo se ha tenido acceso al área sembrada en España.

Entre 1998 y 2005 en España tan solo se cultivó una variedad derivada del evento Bt176 (Compa CB, Syngenta Seeds S.A.), manteniéndose la superficie sembrada en torno a las 20.000 ha (aproximadamente el 5% de la superficie total destinada al cultivo del maíz). A partir de 2003, se aprobó el cultivo de plantas derivadas del evento MON810 (Monsanto Europe S.A.), siendo el evento 176 sustituido progresivamente, hasta su retirada definitiva del Registro de Variedades Comerciales de Plantas en 2005. Esta retirada fue debida a un cambio en la legislación que prohibía el uso de genes de resistencia a antibióticos como marcadores, que eran los utilizados en el Bt176. Desde 2003, se fue incrementado de forma progresiva el número de variedades comerciales disponibles con el evento MON810 para los agricultores españoles, estando hoy en día autorizadas más de 120 (MAGRAMA, 2015a). A la vez, han ido aumentando las hectáreas sembradas cada año, alcanzándose el máximo en 2013, con casi 137.000 hectáreas (**Figura 1.9**), lo que representó el 94% de la superficie de maíz Bt de toda Europa (James, 2013). En el

año 2014 se sembraron 131.537 hectáreas de maíz Bt en España, lo que corresponde al 30% del total del maíz sembrado en el país, estando concentrado su cultivo mayoritariamente en Cataluña y Aragón (68,7%), seguido de Extremadura (10,5%), Andalucía (8,1%), Castilla La-Mancha (6,1%) y Navarra (5,5%) (MAGRAMA, 2015b) (**Tabla 1.4**).

Aunque en Europa ha continuado el proceso de evaluación de nuevos eventos de maíz GM para su cultivo, finalmente ninguno de ellos se ha autorizado, siendo este hecho un reflejo de la postura crítica en cuanto al cultivo de plantas GM que tiene la UE (Meissle *et al.*, 2011). Sin embargo, actualmente hay 58 autorizaciones de plantas GM para su importación, consumo y procesado en alimentos y piensos, correspondiendo 38 de ellas a eventos de maíz GM ([http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm), fecha de acceso: 30 de septiembre de 2015).

**Tabla 1.4.** Superficie de maíz y en concreto de maíz Bt en España por Comunidades Autónomas en 2014.

Comunidad Autónoma	Superficie total de maíz	Superficie de maíz Bt
	(ha) <sup>a</sup>	(ha) <sup>b</sup>
Andalucía	32.217	10.692
Aragón	79.191	54.041
Castilla y León	118.441	18
Castilla - La Mancha	35.914	7.973
Cataluña	38.213	36.381
Comunidad de Madrid	7.251	520
Comunidad Foral de Navarra	18.993	7.264
Comunidad Valenciana	904	640
Extremadura	80.200	13.815
Islas Baleares	334	160
La Rioja	885	9
Región de Murcia	165	24
Galicia	19.630	0
Asturias	290	0
Cantabria	133	0
País Vasco	382	0
Canarias	747	0
<b>Total</b>	<b>433.890</b>	<b>131.538</b>

<sup>a</sup> MAGRAMA (2015c).

<sup>b</sup> MAGRAMA (2015b).

## **1.6. RIESGOS POTENCIALES DEL MAÍZ Bt SOBRE EL MEDIO AMBIENTE**

A pesar de los beneficios atribuidos al maíz Bt, su cultivo a gran escala ha planteado dudas sobre los posibles efectos sobre el medioambiente que se podrían derivar. A continuación se exponen los riesgos más significativos que podrían comprometer su uso comercial.

### **1.6.1. Persistencia y capacidad invasora de las plantas GM en ambientes naturales o agrícolas, y flujo de genes a otras plantas cultivadas o silvestres**

Uno de los posibles riesgos de las plantas GM es que lleguen a ser más persistentes que las plantas parentales en ambientes agrícolas, o más invasivas en hábitats naturales. En Europa no hay evidencias que demuestren que el maíz Bt pueda invadir hábitats naturales o persistir fuera de un contexto agrícola, en ausencia de intervención humana. El flujo de genes del maíz Bt a otras variedades de maíz no-Bt de los alrededores está limitado a la polinización cruzada entre ellas. México y América Central son los lugares donde el potencial de transferencia de genes del maíz GM a otras plantas silvestres es de mayor importancia, ya que son los lugares de origen de *Z. mays*, donde están localizadas de forma natural las especies silvestres del género *Zea* (Galinat, 1988). En Europa recientemente se ha tenido constancia de la presencia de teosinte, grupo de especies y subespecies del género *Zea*, como mala hierba en campos de maíz de Aragón y Cataluña, con las que el maíz podría hibridar (Pardo *et al.*, 2014). En este contexto se plantea el debate sobre si es posible la coexistencia de plantas GM y convencionales, ya que se podría producir la presencia accidental de material de un cultivo GM en uno que no lo es lo que tiene implicaciones económicas y comerciales (Messeguer *et al.*, 2006; Brookes y Barfoot, 2004).

### **1.6.2. Desarrollo de resistencia de los taladros al maíz Bt**

La expresión constante de la toxina a lo largo de todo el cultivo de maíz Bt supone que las plagas diana están sometidas a una exposición continua a las proteínas Cry, favoreciéndose la adquisición de resistencia, ya que esta presión selectiva llevaría a seleccionar a aquellos individuos menos susceptibles a la toxina. Este riesgo supone la

principal amenaza para la sostenibilidad del cultivo de maíz Bt por las graves consecuencias agronómicas, económicas y medioambientales que derivarían (Tabashnik, 1994). Para poder mantener la eficacia del maíz Bt a largo plazo es necesario utilizar estrategias que permitan prevenir o retrasar la aparición de poblaciones resistentes. La estrategia más utilizada actualmente es la conocida como "dosis alta/refugio", con la cual se pretende evitar la selección de insectos resistentes a la toxina Cry en el campo, mediante el cultivo en paralelo en un área colindante de plantas que expresan altas dosis de proteínas Cry junto con zonas de refugio con plantas no transgénicas (Alstad y Andow, 1995). En concreto, en Europa las empresas distribuidoras de semillas aconsejan en los casos en los que se cultivan más de 5 hectáreas de maíz Bt, sembrar una zona de refugio junto al maíz Bt con la correspondiente línea isogénica con un tamaño del 20% del total del maíz sembrado en la finca.

La eficacia de esta estrategia está supeditada al cumplimiento de tres premisas: a) la herencia de la resistencia debe ser recesiva; b) la frecuencia inicial de los alelos de resistencia debe ser muy baja ( $<10^{-3}$ ) para que sea improbable el apareamiento entre dos individuos resistentes; y c) los individuos resistentes seleccionados en el cultivo Bt deben cruzarse con individuos susceptibles a la toxina (Tabashnik *et al.*, 2013). Otra estrategia utilizada para evitar la aparición de resistencia es el uso combinado de varias toxinas activas contra la misma plaga, mediante el empleo de variedades que las expresen de manera simultánea (Zhao *et al.*, 2005). Actualmente esta medida no se puede implementar en la UE, ya que solo se ha aprobado el uso de Cry1Ab.

Hasta el momento, se han citado dos casos de desarrollo de resistencia de dos especies de lepidópteros en condiciones de campo al maíz Bt, ambos noctuidos: *Spodoptera frugiperda* Walker, plaga defoliadora del maíz que causa importantes pérdidas económicas en América, que se hizo resistente al maíz Bt11 que expresa la toxina Cry1F en Puerto Rico (Storer, 2010) y *Busseola fusca* (Fuller), barrenador del tallo del maíz que causa importantes pérdidas en África que desarrolló resistencia al maíz MON810 que expresa la toxina Cry1Ab en Sudáfrica (Kruger *et al.*, 2009; van Rensburg, 2007). En estudios posteriores se identificó que en ambos casos no se habían cumplido alguna de las tres condiciones claves para asegurar el éxito de la estrategia "dosis alta/ refugio" (Storer *et al.*, 2012; Kruger *et al.*, 2011a, 2011b). Además, en un estudio reciente, se ha citado en EE.UU. una población de campo de *S. frugiperda* que muestra resistencia al maíz TC 3507 que expresa la toxina Cry1F (Huang *et al.*, 2014). Los autores no consideran este caso como un nuevo desarrollo de resistencia, sino que se debe

probablemente a migraciones de las poblaciones resistentes que se encuentran en Puerto Rico.

A pesar de estos casos, esta estrategia parece haber sido efectiva en su propósito de frenar el desarrollo de la resistencia de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides*, siendo hasta el momento ambas plagas susceptibles a la toxina Cry1Ab después de más de 19 años de uso intensivo de maíz Bt (Siegfried y Hellmich, 2012; Farinós *et al.*, 2011; 2004; Andreadis *et al.* 2007; Siegfried *et al.*, 2007), aunque existen estudios de laboratorio que han demostrado que ambas especies pueden aumentar en poco tiempo su tolerancia a las toxinas Cry (Farinós *et al.*, 2004; Bolin *et al.*, 1999).

### 1.6.3. Efectos del maíz Bt sobre los artrópodos no-diana

Aunque el maíz Bt está diseñado para controlar a determinadas plagas de insectos de una forma selectiva, existen otros artrópodos asociados temporal y/o espacialmente al agroecosistema del maíz hacia los que no va dirigido el control con la toxina, pero que pueden estar expuestos a ella, conocidos como artrópodos no-diana. Conceptualmente, a la hora de evaluar los riesgos potenciales del maíz Bt hay que considerar aquellas variables que intervienen [Riesgo =  $f$  (daño x exposición)] (Devos *et al.*, 2015; EFSA, 2010a). Por un lado hay que identificar si la toxina es capaz de producir daño o un efecto indeseado al artrópodo no-diana mediante una serie de parámetros que permiten medir la respuesta del artrópodo ante la exposición a la planta GM y/o sus productos, y por otro hay que estimar en qué medida está expuesto a la toxina en condiciones de campo.

Los efectos de la toxina sobre los artrópodos no-diana pueden ser de dos tipos:

**a)** Efectos directos, producidos por la ingestión de la toxina por diferentes vías según la función ecológica que tenga en el agroecosistema (**Tabla 1.5**). Así, los herbívoros podrían ingerir la toxina al alimentarse directamente de diferentes partes de la planta (Obrist *et al.*, 2006); los enemigos naturales (depredadores y parasitoides) podrían estar expuestos a través de la cadena trófica al depredar presas o parasitar huéspedes que se hayan alimentado de plantas Bt (García *et al.*, 2010); los polinizadores a través de aquellas variedades de maíz transgénico que exprese la toxina en el polen, como por ejemplo las variedades del evento MON810 (Nguyen y Jehle, 2007); y los descomponedores, por la incorporación de la toxina al suelo por diferentes vías (Saxena y Stotzky, 2001a).

**b)** Efectos indirectos producidos por una disminución de la cantidad o calidad de las presas ingeridas o a causa de cambios físicos o químicos en las propiedades de la planta debidos la modificación genética realizada (Schnell *et al.*, 2015; Dutton *et al.*, 2003).

**Tabla 1.5.** Principales grupos funcionales de artrópodos no-diana presentes en el agroecosistema del maíz y ejemplos de grupos taxonómicos que podrían verse expuestos a la toxina expresada por el maíz Bt. Modificado de EFSA (2010a).

Grupo funcional	Ejemplo de grupo taxonómico (Orden: familia)
<b>Herbívoros</b> (clasificados según su forma de alimentación)	Chupadores del floema Pulgones (Hemiptera: Aphididae)
	Chupadores del contenido celular Trips (Thysanoptera: Thripidae)
	Chupadores del floema Ácaros (Acarina)
	Chupadores del floema y del contenido celular Cicadélidos (Hemiptera: Cicadellidae)
	Chupadores del floema y del contenido celular Delfácidos (Hemiptera: Delphacidae)
Masticadores	Coleópteros (Coleoptera: Chrysomelidae)
	Larvas de lepidópteros (Lepidoptera) y dípteros (Diptera) Ortópteros (Orthoptera)
<b>Enemigos naturales</b>	Coleópteros (Coleoptera: Coccinellidae, Carabidae, Staphilinidae, etc.)
	Heterópteros (Heteroptera: Nabidae, Anthocoridae, etc.)
	<b>Depredadores</b> Sírfidos (Diptera: Syrphidae)
	Neurópteros (Neuroptera: Chrysopidae, etc.),
	Trips (Thysanoptera: Aeolothripidae, etc.)
	Arañas (Araneae)
	Opiliones (Opiliones)
Ácaros (Acarina: Phytoseiidae)	
<b>Parasitoides</b>	Himenópteros (Hymenoptera: Ichneumonidae, Braconidae, Aphelinidae, etc.)
<b>Polinizadores</b>	Abejas (Hymenoptera: Apidae)
	Sírfidos (Diptera: Syrphidae)
	Coleópteros (Coleoptera: Melyridae, Curculionidae, Scarabaeidae, etc.)
<b>Descomponedores</b>	Larvas de dípteros (Diptera: Phoridae, Sciaridae, etc.)
	Colémbolos (Collembola)
	Ácaros (Acarina)
	Isópodos (Isopoda)

Desde la aprobación de la primera variedad que expresaba la toxina Cry1Ab se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar los posibles efectos del maíz Bt sobre distintos artrópodos no-diana. Pocos años después de esta aprobación, se publicaron varios artículos que pusieron en duda la inocuidad de este cultivo, causando

cierta alarma social. En ellos se detectaron efectos negativos de la toxina Cry1Ab sobre alguna especie de artrópodo no-diana, siendo el publicado por Losey *et al.* (1999) el que tuvo más impacto social. Estos autores observaron una reducción del peso y un aumento de mortalidad en las larvas de la mariposa monarca (*Danaus plexippus* L.) alimentadas con su planta nutricia, *Asclepias curassavica* L., contaminadas con polen de maíz Bt11. En otros estudios sobre el efecto de la toxina Cry1Ab en *Chrysoperla carnea* (Stephens), se observó un aumento de la mortalidad y un retraso en el desarrollo al ser alimentada con toxina purificada o presas que habían sido alimentadas con ella (Hilbeck *et al.*, 1998a, 1998b). A estos hallazgos de efectos nocivos del maíz Bt para alguna especie de artrópodos no-diana se unió el hecho de que se demostrara la existencia del paso de la toxina al suelo a través de los exudados de las raíces (Saxena *et al.*, 1999), y la persistencia de la toxina de manera prolongada en el suelo manteniendo su actividad insecticida (Tapp y Stotzky, 1998). Estos descubrimientos impulsaron la necesidad de realizar nuevos estudios para determinar si otros organismos no-diana se veían afectados, así como para corroborar o rebatir los estudios anteriores (Lawo y Romeis, 2008; Li *et al.* 2008; Hellmich *et al.*, 2001; Zangerl *et al.*, 2001).

Para analizar los posibles efectos ambientales de los cultivos Bt sobre los artrópodos no-diana son necesarios llevar a cabo tanto estudios de campo como de laboratorio. Con los ensayos de laboratorio se pueden obtener resultados más robustos al disminuir la incertidumbre, ya que se controlan la mayoría de los factores, aunque la interpretación de estos resultados desde un punto de vista ecológico podrían ser poco realista. Con los experimentos realizados en campo se consigue evaluar el posible impacto de una planta GM en condiciones naturales, teniendo en cuenta la complejidad de las redes tróficas y la influencia de los factores agronómicos y ambientales (EFSA, 2010a; Duan *et al.*, 2010). Además, en el caso del cultivo continuado en una misma área, los estudios de campo a largo plazo permitirían detectar efectos adversos del cultivo Bt diferidos o acumulados. Se han propuestos dos estrategias diferentes a la hora de abordar estos estudios. Por un lado, algunos autores defienden que debe aplicarse un enfoque secuencial desde el laboratorio hasta el campo, que se describe a continuación de forma simplificada (Romeis *et al.*, 2008). En un primer paso, y tras elegir las especies objetivo, se propone realizar un experimento de laboratorio conocido como "el peor escenario posible", que consiste en exponer al insecto de manera continua a la toxina en una concentración mucho más elevada a la esperada en condiciones de campo. En el caso de que se observen efectos negativos en el experimento, se debería llevar a cabo un segundo en condiciones de semicampo. En el supuesto que la toxina tuviera un efecto negativo sobre el artrópodo,

se llegaría a un tercer y último nivel, ya en condiciones de campo. Por otro lado, se puede aplicar también un enfoque que comenzaría en el campo, con lo que se podrían determinar los artrópodos más abundantes y relevantes para el estudio del impacto del cultivo Bt, así como su posible exposición a la toxina en condiciones naturales. Algunos autores consideran que la estrategia desde el laboratorio al campo es incompleta y restrictiva, existiendo un debate sobre su aplicación estricta, sobre las evidencias que son necesarias recabar en los estudios de laboratorio para justificar la realización de ensayos de campo, así como el tipo de especies que deben ser seleccionadas para realizar la evaluación de riesgo (Lang y Otto, 2010; Andow *et al.*, 2006; Andow y Hilbeck, 2004). Sin embargo, no es posible llevar dicha evaluación con todas las especies presentes en un agroecosistema, por lo que se ha propuesto la utilización de determinadas especies indicadoras, que actuarían como representantes de una comunidad de artrópodos determinada (García *et al.*, 2010; García-Alonso *et al.*, 2006). En general, la selección de especies representativas se basa en diversos criterios como su función ecológica, distribución geográfica, exposición a la toxina, facilidad para su identificación taxonómica, manejo en el laboratorio o importancia económica (Romeis *et al.*, 2008; Todd *et al.*, 2008; Dutton *et al.*, 2003). Algunos ejemplos de especies que han sido seleccionadas como representativas de determinados grupos funcionales son: *Folsomia candida* (Willem) (Collembola: Isotomidae) para descomponedores (Clark y Coats, 2006); *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), para polinizadores o *Atheta coriaria* Kraatz (Staphylinidae: Aleocharinae), para depredadores epigeos (García *et al.*, 2010). También familias enteras pueden ser útiles por su amplia representación o incluso especies plaga no-diana debido a la posible exposición a la proteína insecticida y amplia distribución (Albajes *et al.*, 2013; Romeis *et al.*, 2008).

Se han realizado numerosos estudios de laboratorio y campo con artrópodos de distintos grupos funcionales presentes en el cultivo del maíz, para probar la toxicidad de la proteína Cry1Ab, así como el nivel de exposición a la que pueden estar sometidos:

- Herbívoros: estudios de laboratorio con herbívoros alimentados con maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab muestran que existen diferencias en la cantidad de toxina que es ingerida por diferentes especies en función de su modo de alimentación. En dos ejemplos de herbívoros que se alimentan de las células del mesófilo, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) y *Frankliniella tenuicornis* (Thysanoptera: Thripidae), se ha demostrado que existe un paso de la toxina Cry1Ab desde la planta, aunque no se han encontrado alteraciones en su supervivencia y desarrollo (García *et al.*, 2010; Obrist *et*

*al.*, 2005; Dutton *et al.*, 2002). En cambio, en el caso de pulgones (chupadores del floema) criados sobre maíz Bt únicamente se han encontrado trazas de toxina, no habiéndose detectado tampoco efectos en trabajos de laboratorio (Dutton *et al.*, 2002; Ramírez-Romero *et al.*, 2008a), aunque en campo se encontró un aumento de sus abundancias en el maíz Bt (Pons *et al.*, 2005).

- Depredadores: diversos estudios de laboratorio han demostrado que existe un paso de la toxina Cry1Ab a través de la cadena trófica desde la presa al depredador (García *et al.*, 2010), aunque debido a la complejidad de estas relaciones, el grado de exposición a la toxina Bt en el campo no está claro en todos los casos (Obrist *et al.*, 2006). La toxicidad y los efectos de la proteína Cry1Ab en laboratorio se ha estudiado en numerosos trabajos (revisión en Yu *et al.*, 2011), encontrándose únicamente efectos cuando se han utilizado como presas, larvas de lepidópteros susceptibles a la toxina.

- Parasitoides: se han dedicado un menor número de estudios a determinar el efecto del maíz Bt sobre los parasitoides que para el resto de los grupos. Al igual que en el caso de los depredadores, solo se han visto efectos deletéreos en su supervivencia y desarrollo cuando tenían como huésped un lepidóptero susceptible (revisión en Yu *et al.*, 2011).

- Polinizadores: no hay evidencias de toxicidad de la proteína Cry1Ab sobre larvas y adultos de *Apis mellifera* L. (Hendriksma *et al.*, 2011; Babendreier *et al.*, 2005) o *Bombus terrestris* L. (Babendreier *et al.*, 2008) al ser alimentados con polen de maíz Bt. Sin embargo, distintos estudios en condiciones controladas se ha sugerido que las toxinas Bt podrían tener efectos subletales sobre abejas al afectar a su comportamiento de forrajeo (Mommaerts *et al.*, 2010; Ramírez-Romero *et al.*, 2008b).

- Descomponedores: dentro de los descomponedores que habitan el suelo, ácaros y colémbolos son los grupos más abundantes de microartrópodos edáficos, no existiendo trabajos que hayan determinado la exposición de estos grupos a la toxina. Hasta el momento no se han observado efectos negativos de diferentes proteínas Cry sobre ambos, en estudios de campo y de laboratorio (revisión en Icoz y Stotzky, 2008).

### **1.6.3. Seguridad ambiental del maíz Bt: Normativa europea**

En numerosos países se han establecido legislaciones específicas para regular el uso y liberación de este tipo de plantas al medio, con el fin de valorar la seguridad e inocuidad de su cultivo, siendo la identificación y evaluación científica de los posibles riesgos la

base para desarrollar estos sistemas de regulación. En la UE existe una estricta legislación que exige un control tanto de los posibles efectos sobre la salud humana y animal, como sobre el medio ambiente, siendo la EFSA la entidad encargada de su evaluación. Así, existen dos etapas fundamentales en la evaluación de la seguridad ambiental de las variedades GM:

1) Evaluación de riesgo medioambiental (ERMA) (*environmental risk assessment, ERA*). Su objetivo es identificar y evaluar, caso por caso, los efectos adversos potenciales del organismo GM, ya sean directos o indirectos, inmediatos o diferidos, en la salud humana y el medio ambiente, que pueda tener la liberación voluntaria o la comercialización del organismo GM. Es un requisito imprescindible en la solicitud de autorización de liberación voluntaria del organismo GM.

2) Planes de seguimiento (*post-market monitoring*): se exigen obligatoriamente desde el momento de la autorización para cultivar el OGM (Comisión Europea, 2001b) para evaluar los efectos del cultivo a gran escala. Estos planes tienen dos objetivos; a) identificar cualquier efecto adverso del organismo GM que no se haya contemplado en la ERMA (*general surveillance*) el cual es obligatorio, y b) evaluar los posibles efectos ambientales adversos del organismo GM que se han identificado en la ERMA mediante el denominado seguimiento caso-específico (*case-specific monitoring*), que puede ser requerido para verificar la evaluación de riesgo ambiental (MARM, 2010).

En la UE, los planes de seguimiento comenzaron a ser un requisito obligatorio a raíz de la entrada en vigor de la Directiva 2001/18/CE en 2001 (Comisión Europea, 2001b). Sin embargo, hay que señalar que en España, atendiendo al Principio de Precaución, las Autoridades Competentes exigieron un Plan de Seguimiento para el cultivo de maíz Bt que expresaba la toxina Cry1Ab desde el año 1998, cuando fue aprobado el cultivo de las primeras variedades. En España se han llevado a cabo dos planes de seguimiento, uno para variedades de maíz del evento de transformación Bt176 (1998-2005) y otro para el evento MON810 (2003-2011) (MARM, 2010), ambos financiados por la Administración Central. Además, las empresas que desarrollan las plantas Bt también llevan a cabo de forma paralela sus propios planes de seguimiento, cuyos resultados son publicados anualmente (<http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm>).

## 1.7. OBJETIVOS DE LA TESIS

El maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab se cultiva en España desde el año 1998 para el control de los taladros del maíz, *S. nonagrioides* y *O. nubilalis*, y desde entonces la superficie de cultivo ha aumentado progresivamente. A pesar de este control específico, la fauna asociada temporal y espacialmente con el cultivo del maíz puede estar expuesta a la toxina, y por tanto verse afectada por la misma, existiendo aún un desconocimiento de su efecto en algunos grupos. En este contexto el primer objetivo de la Tesis es:

**Objetivo 1.** Evaluar los efectos a largo plazo del cultivo del maíz MON810 sobre determinados artrópodos presentes en las partes aéreas de la planta y sobre los microartrópodos edáficos, identificando los grupos más adecuados para ser utilizados como representantes en la evaluación de riesgo ambiental en condiciones agroclimáticas mediterráneas, así como determinar sus niveles de exposición a la toxina en campo.

Por otro lado, una de las ventajas asociadas al cultivo de maíz Bt es una posible reducción de la concentración de micotoxinas en el maíz, al no estar dañadas las plantas por los taladros. En relación con este hecho, el segundo objetivo de la tesis es:

**Objetivo 2.** Estudiar las diferencias en la contaminación con hongos micotoxígenos y en la producción de micotoxinas entre mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y mazorcas de maíz Bt, determinar si la presencia de los hongos micotoxígenos es un buen indicativo de la contaminación con micotoxinas de las muestras y analizar si los taladros del maíz *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* pueden portar dichos hongos.

2. EFECTOS DEL CULTIVO  
CONTINUADO DEL MAÍZ Bt  
SOBRE ARTRÓPODOS NO-DIANA  
DE LA PARTE AÉREA DE LA PLANTA  
Y MICROARTRÓPODOS EDÁFICOS



## 2.1. INTRODUCCIÓN

El maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab se cultiva en la UE desde 1998 para el control específico de los taladros *O. nubilalis* y *S. nonagrioides*. Desde entonces se ha aprobado la siembra de variedades que incluyen dos eventos distintos que expresan esa toxina, aunque desde 2006 únicamente se cultivan variedades derivadas del evento MON810, debido a la retirada del mercado del maíz Bt176. Solo España ha adoptado de forma significativa el cultivo de maíz Bt, habiéndose sembrado en 2014 más de 130.000 ha (MAGRAMA, 2015b). Se considera que la adopción del maíz Bt podría representar un riesgo potencial para los artrópodos no-diana que alberga el cultivo, por lo que la UE ha establecido la obligatoriedad de llevar a cabo un plan de seguimiento para los eventos aprobados para su uso en cultivos comerciales (EFSA, 2006; 2011). Con el fin de evaluar los posibles efectos del maíz Bt en los artrópodos no-diana, en España se han llevado a cabo en los últimos años distintos estudios de campo que se han concentrado fundamentalmente en maizales del centro y del noreste peninsular. El uso de maíz Bt176, cultivado hasta 2005, no afectó a diferentes plagas secundarias como el gusano cortador (*Agrotis segetum* Denis & Schiffemüller) (Lepidoptera: Noctuidae), el gusano de alambre (*Agriotes lineatus* L.) (Coleoptera: Elateridae), diferentes especies de pulgones y cicadélidos (Pons *et al.*, 2005), aunque sí se demostró que diferentes grupos de artrópodos no-diana estaban expuestos a la toxina Cry1Ab que expresaba (Álvarez-Alfageme *et al.*, 2009; Obrist *et al.*, 2006). Del mismo modo, cuando se evaluó el riesgo de los maíces MON810 y Bt176 sobre los depredadores mediante trampas de caída y muestreos visuales de las plantas, no se encontraron efectos negativos consistentes sobre los carábidos, arañas, coccinélidos y antocóridos, a excepción de disminuciones puntuales en la abundancia de estafilínidos en campos de maíz Bt176 y MON810 del centro peninsular (Albajes *et al.*, 2012; Ortego *et al.*, 2009; Farinós *et al.*, 2008; de la Poza *et al.*, 2005). A pesar de toda la información de campo recabada hasta el momento, aún quedan aspectos relevantes por conocer acerca de los efectos del cultivo del maíz Bt sobre ciertos grupos de artrópodos no-diana. Por ello, el propósito de este trabajo es ahondar en el conocimiento de las posibles consecuencias que tiene el uso del maíz Bt sobre los artrópodos que se encuentran en las partes aéreas de la planta y sobre los microartrópodos que habitan en el suelo, así como de su exposición a la toxina insecticida en el campo.

Cada evento transgénico expresa la proteína insecticida en diferentes cantidades y en diferentes proporciones según la parte de tejido de la planta y su estado fenológico

(Dutton *et al.*, 2003). Por este motivo, la cantidad de toxina adquirida por los organismos no-diana puede variar según el evento en el que se desarrollen. En el maíz MON810, la concentración de Cry1Ab es proporcional al contenido de clorofila (Székács *et al.*, 2010a), por lo que es en los tejidos verdes, principalmente en las hojas, donde la toxina Cry1Ab expresa sus niveles más altos (Székács *et al.*, 2010b). Por este motivo, los artrópodos no-diana que habitan durante todo su ciclo o parte de él en la parte aérea de la planta podrían estar expuestos a elevados niveles de toxina. Entre estos artrópodos encontramos grupos con funciones ecológicas diversas, que pueden estar expuestos a la toxina por diferentes vías en función de su tipo de alimentación. Los herbívoros pueden adquirir directamente la toxina al alimentarse del material vegetal en el que ésta se expresa, como se ha demostrado en el caso de por ejemplo *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) o *Frankliniella tenuicornis* (Uzel) (Thysanoptera: Thripidae) (Obrist *et al.*, 2006; 2005; Harwood *et al.*, 2005). Los organismos detritívoros podrían estar expuestos al alimentarse de polen o de diferentes residuos vegetales en descomposición (Meissle y Romeis, 2009). A su vez, tanto los herbívoros como los detritívoros pueden servir como vehículos para transferir la toxina a otros niveles tróficos superiores como depredadores y parasitoides, habiéndose encontrado cantidades significativas de Cry1Ab en depredadores recogidos en campo pertenecientes a las familias Coccinellidae, Carabidae, Araneae, Nabidae y Anthocoridae (Álvarez-Alfageme *et al.*, 2009; Obrist *et al.*, 2006; Harwood *et al.*, 2005).

Entre los herbívoros, los cicadélidos (Cicadellidae) y delfácidos (Delphacidae), hemípteros del suborden Auchenorrhyncha, son dos familias de gran importancia en el cultivo de maíz debido a su diversidad y abundancia (Rauschen, 2008a). Ambas familias son consideradas plagas secundarias relevantes de este cultivo, causando daños directos al alimentarse de la planta, o indirectos al actuar como vectores en la transmisión de patógenos de plantas, como bacterias, virus y micoplasmas (Albajes *et al.*, 2009; Rauschen, 2008a; Pons *et al.*, 2005; Nickel, 2003; Batlle *et al.*, 2000). Según la especie, pueden presentar de una a tres generaciones al año, las cuales se desarrollan durante la primavera y el verano, pasando el invierno en forma de huevo, ninfa o adulto (Nickel, 2003). Poseen piezas bucales modificadas para perforar el tejido de la planta y succionar los fluidos, aunque cada especie tiene un comportamiento diferente en cuanto a la forma de insertar el estilete en el material vegetal. Dentro de las especies de cicadélidos de los campos de maíz europeos, *Zyginidia scutellaris* se ha propuesto como un herbívoro clave a la hora de medir el impacto del maíz Bt (Romeis *et al.*, 2014; Albajes *et al.*, 2013), debido a que tiene un vínculo estrecho con este cultivo, una amplia distribución

geográfica y facilidad para ser muestreado en el campo (Rauschen *et al.*, 2008b). La exposición de *Z. scutellaris* a las toxinas Cry de maíz Bt se ha demostrado en distintas ocasiones. En un trabajo realizado en condiciones de invernadero, en el cual se realizó una suelta de esta especie en plantas de maíz Bt11, se pudo constatar que los individuos recuperados habían ingerido la toxina Cry1Ab (Dutton *et al.*, 2004). En condiciones de campo, Meissle y Romeis (2009) detectaron la toxina Cry3Bb1 en individuos capturados en una finca experimental de maíz MON88017 en Alemania, y Obrist *et al.* (2006) comprobaron que esta especie estaba expuesta a la toxina Cry1Ab del maíz Bt176. Sin embargo, no existen datos acerca del nivel de exposición de *Z. scutellaris* a la toxina Cry1Ab en campos de maíz MON810.

Los principales agentes de control biológico empleados para luchar contra cicadélidos y delfácidos han sido los parasitoides especializados en estos grupos, fundamentalmente mimáridos (Hymenoptera: Mymaridae) (Albajes *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 1996; Gauld y Bolton, 1988). Este grupo de himenópteros se encuentra de forma habitual en los campos de maíz (Albajes *et al.*, 2013; Dively, 2005), relacionándose su aparición con picos de abundancia previos de cicadélidos (Albajes *et al.*, 2009). Los mimáridos son exclusivamente ooparasitoides (parasitoides de huevos), teniendo una amplia gama de insectos huésped como lepidópteros, míridos, etc., aunque sus principales huéspedes son los cicadélidos (Huber, 1986). El éxito de su uso para el control de plagas radica en que la mayoría de las especie son proovigénicas, careciendo de periodo de preoviposición, lo que hace que puedan tener un alto número de generaciones al año (Hassell, 2000), además de atacar al huésped en las etapas tempranas del ciclo vital del insecto (huevo), antes de que puedan causar daño (Usmani *et al.*, 2012). La mayoría de los mimáridos solo se alimentan de néctar floral en su estado adulto (Godfray, 1994); por lo tanto, la posibilidad de estar expuestos a las toxinas Cry del maíz Bt en campo dependerá de la presencia de la toxina en los huevos del huésped que serán parasitados y a la posterior transferencia de la proteína hasta los parasitoides. Existen escasos trabajos que hayan analizado la posibilidad de que esta transferencia tenga lugar, siendo a su vez contradictorios en los resultados (Han *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2010). A pesar de ello, los parasitoides son especialmente vulnerables a los cambios en la calidad de su huésped, ya que normalmente completan su desarrollo en un único individuo (Godfray, 1994), por lo que una alteración en la población del huésped debido al uso del maíz Bt podría tener un efecto indirecto sobre las poblaciones de los parasitoides.

Los estudios de campo a largo plazo llevados a cabo hasta el momento sobre el efecto del cultivo de maíz Bt en artrópodos recogidos de las mazorcas o en el follaje de la planta no han revelado efectos negativos en los grupos estudiados (Eckert *et al.*, 2006; Habuštová *et al.*, 2014). Pons *et al.* (2005) evaluaron, en tres etapas distintas del cultivo, los efectos del maíz Bt176 que expresa la toxina Cry1Ab en la abundancia de *Z. scutellaris* y observaron que las ninfas maduras fueron más abundantes en el maíz Bt que en el no-Bt. En cambio, en los estudios que llevaron a cabo Rauschen *et al.* (2008b; 2010) en dos momentos del cultivo en campos de Alemania, no se detectaron diferencias entre las abundancias de *Z. scutellaris* en dos variedades distintas de maíz Bt que expresaban las toxinas Cry1Ab y Cry3Bb1, respectivamente, y sus correspondientes líneas isogénicas.

Un segundo grupo de artrópodos no-diana poco estudiado que se podría ver afectado por el cultivo del maíz Bt, especialmente en las regiones donde se cultiva de manera continuada durante varias campañas, es el de los microartrópodos edáficos. Diferentes estudios han demostrado que la toxina Cry1Ab del maíz Bt pasa al suelo por diversas vías durante el periodo vegetativo: a través de los exudados de las raíces (Saxena *et al.*, 2002; 1999; Saxena y Stotzky, 2001a), de heridas naturales o por la senescencia de las células de la raíz (Baumgarte y Tebbe, 2005), a través del polen que cae al sustrato durante la floración (Mendelsohn *et al.*, 2003) y por la incorporación de restos de la planta que caen al suelo durante el cultivo. Además, tras la cosecha, grandes cantidades de residuos vegetales quedan depositados sobre la superficie del cultivo, pudiendo suponer la principal fuente a través de la cual la toxina se incorpora al suelo (Flores *et al.*, 2005). Una vez en el suelo, la toxina es degradada rápidamente (Hopkins y Gregorich, 2003; Sims y Holde, 1996), pero una fracción puede unirse a las partículas de arcilla y ácidos húmicos haciendo que persista en el suelo sin perder su actividad insecticida, además de permanecer en los residuos vegetales que se mantienen en el suelo (Saxena *et al.*, 2002; Crecchio y Stotzky, 1998; Tapp y Stotzky 1998). Como consecuencia, la fauna edáfica podría estar expuesta a la toxina de forma continuada por la ingestión de la proteína al alimentarse de partes de la planta vivas o en descomposición, o al alimentarse de presas que hayan adquirido la proteína (García *et al.*, 2010, Álvarez-Alfageme *et al.*, 2009).

Los microartrópodos edáficos tienen un importante papel en el suelo ya que participan en la descomposición y degradación de los residuos vegetales, intervienen en el ciclo de nutrientes y mineralización, además de representar un importante reservorio de

biodiversidad (Winter y Behan-Pelletier, 2008; Coleman *et al.*, 2004). Los ácaros (Acari) y colémbolos (Collembola) son los dos grupos mayoritarios dentro de l

a comunidad de microártropodos edáficos, representando alrededor del 95% del total (Seastedt, 1984). Ambos están presentes en todos los agroecosistemas, incluyendo los suelos agrícolas y hábitats muy degradados, aunque su abundancia relativa puede variar dependiendo de las condiciones ambientales, el tipo de suelo, su uso, etc. (Coleman *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2001). Los ácaros del suelo (principalmente oribátidos y acarídidos de vida libre) y los colémbolos participan en la fragmentación de la materia orgánica en descomposición, siendo capaces de reducirla a partículas muy finas, aumentando así la superficie expuesta al ataque de microorganismos (Yang *et al.*, 2012). Los ácaros se alimentan principalmente de la microflora del suelo o de material vegetal muerto, mientras que los colémbolos son en su mayoría fungívoros, aunque también pueden alimentarse de residuos vegetales o animales en descomposición, partes de plantas vivas, bacterias o algas (Endlweber *et al.*, 2009). Además, algunos colémbolos epigeos pueden utilizar las partes aéreas de las plantas en determinados momentos de su ciclo (Peterson *et al.*, 2010; Frampton *et al.*, 2001), como es el caso de los especímenes pertenecientes a la familia *Entomobryidae* en el maíz (Dively, 2005). Tanto ácaros oribátidos como colémbolos se han utilizado como indicadores de la calidad del suelo (Behan-Pelletier, 1999; van Straalen, 1997). Sin embargo, los colémbolos se han revelado como mejores indicadores en los sistemas agrícolas, probablemente debido a que pueden responder más rápidamente que los oribátidos a perturbaciones en el ecosistema, ya que sus poblaciones siguen una estrategia *r* de reproducción (Behan-Pelletier, 2003).

Diversos estudios de laboratorio no han revelado ningún efecto negativo de la toxina Cry1Ab purificada sobre diversas especies de colémbolos (Heckmann *et al.*, 2006; Sims y Martin, 1997). También se han realizado estudios de campo en EE.UU. y en ciertos países de la UE (regiones biogeográficas atlántica y continental) que han concluido que el maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab no provoca cambios importantes en la composición de la comunidad de microartrópodos del suelo (Cortet *et al.*, 2007; Zwahlen *et al.*, 2007). Sin embargo, no hay información sobre el impacto que podría tener el maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab sobre los microartrópodos edáficos en condiciones agroecológicas mediterráneas. Además, tampoco se han publicado trabajos en estas condiciones sobre la detección de la toxina en microartrópodos edáficos, ni de la incorporación de la misma al suelo y sus tasas de degradación. Los resultados obtenidos

en los distintos trabajos son difíciles de extrapolar a otras regiones debido a diferencias en las propiedades físico-químicas del suelo, condiciones climáticas de la zona, el cultivo estudiado y el manejo del mismo (retirada de rastrojos, siembra directa, etc.), y a otros factores ambientales que varían según la zona de estudio (Baumgarte y Tebbe, 2005; Muchaonyerwa *et al.*, 2004; Zhawlen *et al.*, 2003; Tapp y Stozky, 1998), junto con una falta de métodos de análisis comunes, lo que dificulta la comparación de los datos y da lugar a discrepancias en los resultados.

La complejidad de las redes tróficas existentes en el agroecosistema del maíz y la influencia de diversos factores ambientales, hacen que para detectar los posibles efectos del maíz Bt sobre artrópodos no-diana sea conveniente la realización de ensayos en condiciones de campo. Los análisis estadísticos de este tipo de ensayos, generalmente tienen como objetivo evaluar si existen o no diferencias significativas entre los efectos de una planta transgénica y su respectiva variedad isogénica no-Bt sobre diversos parámetros relativos a los artrópodos no-diana (abundancia, diversidad de especies, etc.), considerándose como hipótesis nula ( $H_0$ ) la falta de diferencias. No obstante, no todas las especies o grupos de artrópodos presentes en el agroecosistema son igual de eficaces a la hora de detectar diferencias significativas entre ambos tipos de plantas, cuando realmente existen (Comas *et al.*, 2014; 2013). Esta probabilidad se conoce como la potencia estadística del análisis ( $1-\beta$ ), que se define como la probabilidad de rechazar una  $H_0$  que es falsa, es decir, de no cometer un error de Tipo II ( $\beta$ ). La potencia depende de varios factores: el tamaño de la muestra, la variabilidad de la respuesta estudiada, el error de Tipo I o  $\alpha$  (probabilidad de rechazar  $H_0$  cuando en realidad es cierta, la cual generalmente se fija en 0,05) y la magnitud del efecto es decir, la diferencia mínima entre los grupos que se considera relevante. A este parámetro también se le denomina capacidad para detectar diferencias, expresándose habitualmente en porcentaje ( $dc$ ). Se considera que un nivel de potencia estadística del 80% que pueda detectar el tamaño del efecto previamente definido de un tratamiento frente a un control es aceptable (EFSA, 2010b). Cuanto mayor sea el tamaño del efecto que se desea detectar, mayor será la probabilidad de obtener hallazgos significativos y, por lo tanto, mayor será la potencia estadística del análisis. Otra forma de expresar la potencia estadística de un análisis es mediante el cálculo de la  $dc$ . Un menor  $dc$  indica una mayor capacidad para detectar efectos entre tratamientos del taxón analizado. Se considera que los grupos de artrópodos que son adecuados para la detección de efectos en estudios de campo son aquellos capaces de detectar una diferencia del 50% como máximo con respecto a la media del control de la variable estudiada (Perry *et al.*, 2003).

Diversos trabajos científicos, principalmente enfocados en depredadores, han utilizado la potencia para orientar la selección de especies indicadoras (Albajes *et al.*, 2012; Prasifka *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2006). Sin embargo, uno de los inconvenientes de esta medida es que en aquellos organismos que muestren una alta capacidad para detectar diferencias, la potencia puede llegar a saturarse ( $1-\beta = 1$ ). Cuando esto sucede, no se puede usar la potencia para comparar diferencias en la respuesta de los organismos, siendo más conveniente usar la capacidad para detectar diferencias, que tiene la ventaja de no saturarse y permite la comparación de grupos con una alta capacidad de detección (Albajes *et al.*, 2012). En este caso es necesario fijar la potencia en el 0,8 establecido para que un taxón pueda considerarse un buen indicador.

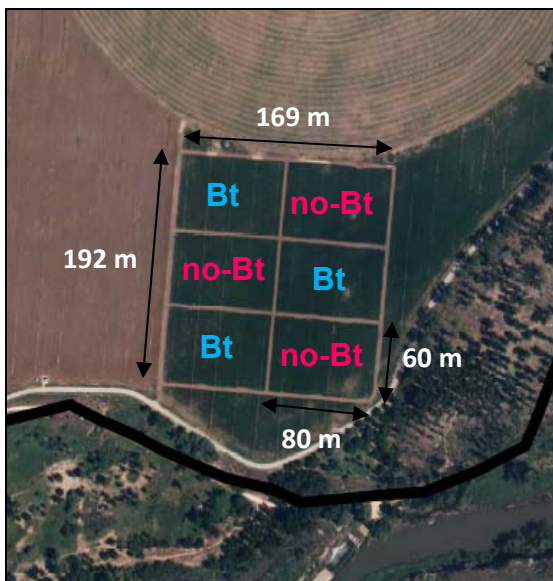
Teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento acerca del posible riesgo que puede suponer el cultivo de maíz Bt para los artrópodos no-diana presentes en los campos de maíz, así como la escasa información relativa a los efectos potenciales sobre los microartrópodos que habitan en el suelo y sobre determinados artrópodos que se encuentran en la parte aérea de la planta, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar los posibles efectos del cultivo continuado de maíz Bt sobre los artrópodos que habitan en la parte aérea de la planta y sobre la comunidad de microartrópodos edáficos, en condiciones agroclimáticas mediterráneas.
2. Determinar los niveles de exposición a la toxina Cry1Ab de distintos representantes de ambas comunidades en condiciones de campo.
3. Evaluar el nivel de toxina Cry1Ab y su actividad insecticida en diferentes fracciones de la rizosfera.
4. Identificar, dentro de cada una de estas comunidades, los grupos más adecuados para ser utilizados como indicadores en la evaluación de riesgo medioambiental del maíz Bt.

## 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Área de estudio y diseño experimental

El estudio se llevó a cabo en un campo experimental de maíz situado en la localidad de San Fernando de Henares (Madrid). El campo tenía un tamaño de 192 x 169 m (3,25 ha) en el cual se realizó un diseño de *split-plot* con bloques aleatorios que consistió en tres bloques y dos tratamientos. Los tratamientos que se compararon fueron maíz transgénico (cv. DKC 6451 YG, evento MON810) que expresa la toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* (maíz Bt) y su correspondiente línea isogénica DKC 6450 (maíz no-Bt) (**Figura 2.1**). Cada parcela tenía un tamaño aproximado de 0,5 ha (80 x 60 m) con un pasillo de separación de 3 m entre ellas. Este diseño experimental se mantuvo en la finca durante cinco años (2008, 2009, 2010, 2011 y 2013), repitiéndose la ubicación exacta de los tratamientos (en el año 2012 el campo estuvo en barbecho durante el verano). Los diferentes muestreos se llevaron a cabo durante los años 2009, 2010, 2011 y 2013, detallándose en la **tabla 2.1**. las fechas de siembra y de recogida del maíz de estos años.



**Figura 2.1.** Foto aérea del campo indicándose el esquema general del diseño experimental.

**Tabla 2.1.** Fechas de siembra y cosecha del maíz, y tratamientos herbicidas aplicados en los años en los que se llevaron a cabo muestreos.

Año	Siembra	Tratamiento herbicida	Cosecha
2009	29 de abril	Acetocloro 45%+Terbutilacina 21,4% (Harness® GTZ) 4,5 l/ha	11 de noviembre
2010	28 de abril	*	29 de noviembre
2011	19 de abril	Pendimetalina 33% (Assistan®) 4 l/ha Nicosulfuron 4% (Bandera® 4 SC) 1,5 l/ha	28 de octubre
2013	13 de mayo	Terbutilazina 50% (Cuña®) 2 l/ha Petoxamida 60% (Successor® 600) 2 l/ha	3 de diciembre

\* Se realizó un tratamiento con herbicida, pero en la finca experimental no quedó constancia de cuál fue.

El cultivo se mantuvo con riego por aspersión, llevándose a cabo un control de las malas hierbas de forma anual con la aplicación de tratamientos herbicidas (**Tabla 2.1**) y excluyéndose el uso de insecticidas. No hubo rotación de cultivos excepto en el invierno de 2011-2012, durante el cual se sembró cebada. Durante la recolección del maíz, la planta se cortaba aproximadamente a unos 20-30 cm del suelo, dejando los residuos de la cosecha en el suelo hasta la campaña siguiente. El suelo se caracterizó por ser alcalino (pH = 8,03), con un porcentaje de materia orgánica del 3% y presentó una textura de suelo franco, con 43% de arena, 42% de limo y 15% de arcilla (muestras de suelo analizadas por Innoagral, Grupo Hespérides Biotech S.L., Sevilla, España).

### 2.2.2. Variables ambientales

En el mismo campo experimental se tomaron datos diarios de precipitación y temperatura mediante una estación meteorológica que contaba con un sensor de temperatura y humedad (HMP45A, Vaisala, Finlandia) y un pluviómetro (ARG100, Campbell Scientific, Reino Unido). Todos los datos registrados en la estación se encuentran en la web del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente (MAGRAMA) (<http://eportal.magrama.gob.es/websiar/SeleccionParametrosMap.aspx?dst=1>). Con el fin de evaluar la tendencia de las variables de temperatura y precipitación en cada año, los datos meteorológicos registrados desde 2003 hasta 2008 se utilizaron para establecer intervalos de confianza (IC) al 95% para cada mes (Fowler y Cohen, 1990). Para su cálculo se utilizó la temperatura mínima para los meses de diciembre-marzo, la

temperatura máxima para los meses de junio-septiembre, la temperatura media para los meses de abril, mayo, octubre y noviembre y la precipitación acumulada en cada mes (Murphy *et al.*, 2012). Las medias de cada mes de estas variables climáticas calculadas en los años 2009, 2010 y 2011 se compararon con los IC al 95% obtenidos, considerándose diferentes aquellas que estuvieron fuera del IC.

### 2.2.3. Muestreo, extracción e identificación de artrópodos

#### 2.2.3.1. Artrópodos de la parte aérea de la planta

Para determinar la composición y abundancia de especies de artrópodos no-diana que habitan en la parte aérea de la planta de maíz Bt y no-Bt se colocaron trampas amarillas adhesivas de 100 x 210 mm (Bug-Scan® IVOG®-System, Biobest, Bélgica) durante tres años consecutivos (2009-2011). Las trampas se situaron en una planta de maíz en el centro de cada parcela en 2009 y 2010, o en dos plantas de la fila central separadas por 20 m en 2011. Las trampas se colocaron perpendiculares a las filas del maíz de la siguiente forma: un mes después de la siembra, una trampa se fijó a un palo de bambú a 50 cm del suelo (**Figura 2.2**), y un mes más tarde, cuando el maíz ya era lo suficientemente resistente y alto, la trampa se fijó directamente a la planta y se incorporó una trampa adicional a 150 cm del suelo para cubrir todo el área del follaje. Pasados tres días las trampas se recogían, envolviéndolas en film transparente y se almacenaban a 4 °C hasta la determinación de los insectos.



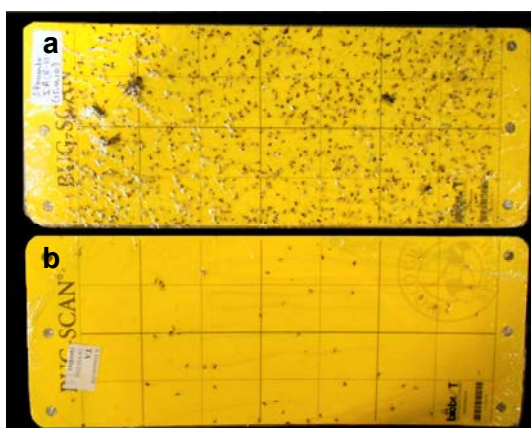
**Figura 2.2.** Trampa adhesiva colocada a 50 cm del suelo.

Los muestreos se llevaron a cabo desde junio a septiembre (17 semanas), abarcando todas las etapas de crecimiento del maíz (de V6 hasta R6) (**Tabla 2.2**). En general, se realizaron semanalmente al inicio de la campaña, momento de mayor abundancia de especímenes, y cada dos semanas al final de la misma, al reducirse las capturas (**Figura 2.3**).

**Tabla 2.2.** Periodos de muestreo y número de trampas adhesivas colocadas en cada año.

Año	Periodo de muestreo	Nº de muestreos	Nº trampas colocadas	
			A 50 cm del suelo	A 150 cm del suelo
2009	12 de junio - 1 de octubre	11	66	42
2010	4 de junio - 1 de octubre	11	66	42
2011	3 de junio - 22 de septiembre	15	180	120

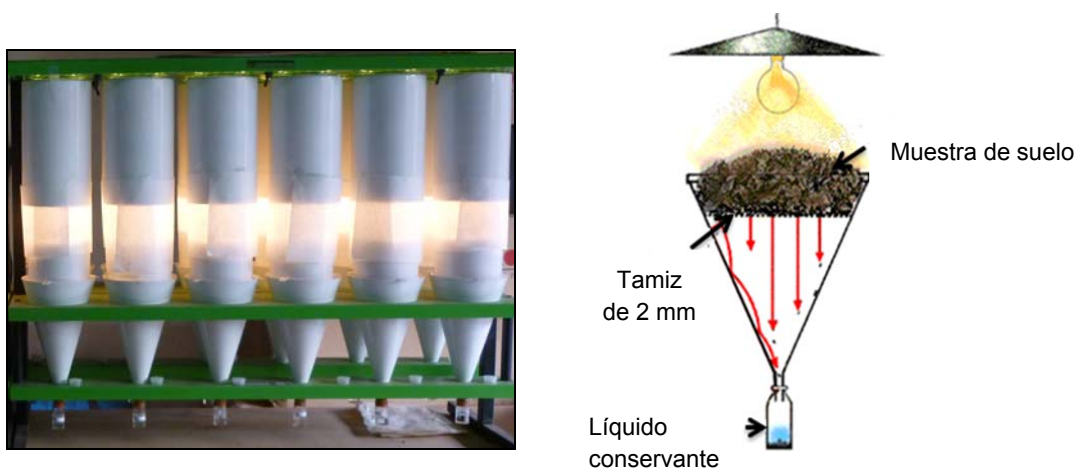
Se contabilizaron los insectos capturados en la zona central de la trampa (15 x 5 cm<sup>2</sup>) (**Figura 2.3**) y su identificación se llevó a cabo utilizando un microscopio estereoscópico Leica M125 (Leica Microsystems SA, Barcelona, España). Los mimáridos se identificaron hasta nivel de género utilizando las claves descritas en Baquero (1997).



**Figura 2.3.** Trampas amarillas tras tres días en el campo en un momento de abundantes (a) y de escasas (b) capturas.

### 2.2.3.2. Microartrópodos edáficos

Para determinar la composición y la densidad de los microartrópodos edáficos en los dos tratamientos se llevaron a cabo muestreos de suelo utilizando una barrena de cilindro cerrado de 50 mm de diámetro interno y 150 mm de profundidad (Burkard Scientific Co. Ltd., Uxbridge, Reino Unido) durante tres años consecutivos (2009-2011). Para ello, se tomaron entre plantas de la misma fila dos submuestras de suelo separadas por unos 8 cm a una profundidad de 9 cm, las cuales se mezclaron en una bolsa de plástico hermética, formando una muestra. En cada muestreo se recogieron dos muestras por parcela separadas del borde y entre sí más de 20 m. Las muestras se llevaban inmediatamente al laboratorio para la extracción de los microartrópodos mediante embudos Berlese-Tullgren (Burkard Scientific Co. Ltd., Uxbridge, Reino Unido). Cada muestra se colocaba cuidadosamente en la parte superior del embudo que tenía un fondo de red metálica con una luz de malla de 2 mm. Sobre la muestra había una luz incandescente de 25W encendida durante tres días para secar desde arriba de manera gradual la muestra de suelo, obligando a los individuos a desplazarse hacia abajo huyendo de la luz y el calor, acabando por atravesar el tamiz y cayendo a un bote con solución Scheerpeltz (60% alcohol absoluto, 39% agua destilada, 1% ácido acético glacial) (**Figura 2.4**). Los muestreos se distribuyeron a lo largo de todo el año, llevándose a cabo en general cada dos semanas cuando estaba presente el cultivo de maíz y una vez al mes el resto del año, realizándose un total de 9, 10 y 16 muestreos en 2009, 2010 y 2011, respectivamente. En cada fecha de muestreo se recogieron un total de doce muestras de suelo (seis muestras por tratamiento).



**Figura 2.4.** Embudos de Berlese-Tullgren y esquema general de su funcionamiento.

Los microártropodos se identificaron utilizando un microscopio estereoscópico (Leica M125 Microsystems S.A., Barcelona, España). Los ácaros adultos se identificaron hasta nivel de suborden (Actinedida, Gamasida, Oribatida, Acaridida) (Krant, 1978) y los colémbolos hasta género o especie (Jordana *et al.*, 1997; Jordana y Arbea, 1989), lo que requería el montaje previo de los individuos. Para ello, los colémbolos se colocaban en un vidrio de reloj con 25% de ácido láctico durante 72 horas para su aclarado (Jordana *et al.*, 1997). Tras este periodo se colocaban en portaobjetos sobre una gota de líquido Höyer para su posterior observación bajo el microscopio óptico Olympus CX31 (Olympus Optical Co., Tokio, Japón) con un aumento de hasta x1000.

#### **2.2.4. Proteína Cry1Ab**

La toxina Cry1Ab purificada que se utilizó para preparar las concentraciones de la curva estándar del ELISA y para el bioensayo de susceptibilidad fue suministrada por el Dr. Juan Ferré del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia, obtenida a partir de cultivos de *Escherichia coli*, cepa XL1-azul (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 relA1 ligo supE44 [F0 proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]), transformada con el plásmido pBD140, cedido por el Dr. R.A. de Maagd (Plant Research International B.V., Wageningen, Países Bajos).

#### **2.2.5. Exposición de los artrópodos de la parte aérea de la planta a la toxina Cry1Ab**

Los niveles de toxina Cry1Ab se cuantificaron en diferentes grupos de artrópodos que se capturaban frecuentemente en las trampas adhesivas procedentes de una parcela de maíz Bt y de una no-Bt, un mes después de la siembra (maíz en V6-V7). Los insectos se recogieron con una manga entomológica de un diámetro de 40 cm y una luz de malla < 1 mm, realizando diversas pasadas por las plantas. Después la manga se introdujo en una caja de poliestireno con nieve carbónica durante aproximadamente 2 minutos y el contenido se volcó sobre una bandeja para recoger los insectos, que se guardaron en tubos dispuestos sobre nieve carbónica para su traslado. En el laboratorio se identificaron con un microscopio estereoscópico, esparciéndolos en una placa Petri sobre nieve carbónica para evitar su descongelación. Además, también se recogieron muestras de

hoja de plantas de maíz Bt y no-Bt del campo, para el análisis de los niveles de toxina en la planta.

La toxina Cry1Ab se cuantificó en *Z. scutellaris*, *Empoasca* spp. y *Macrostelus* spp., (Hemiptera: Cicadellidae), en delphácidos (Hemiptera: Delphacidae) y en clorópidos (Diptera: Chloropidae). La cuantificación se hizo por duplicado mediante *double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays* (DAS ELISA), utilizando el kit de Agdia Bt-Cry1Ab/Cry1Ac (Elkhart, IN, EE.UU.). Para la extracción de la toxina, cada muestra se homogeneizó con tampón fosfato-salino-Tween 20 (PBST) suministrado por el kit (**Tabla 2.3**), tras lo cual se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 rpm. Una alícuota de 100 µl del sobrenadante de cada muestra se dispensó en los pocillos del ELISA, junto con los controles positivos y negativos del kit y las concentraciones estándar de Cry1Ab, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las curvas de calibración se realizaron utilizando como calibradores soluciones con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ab purificada (0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 6, 9, 12 y 15 ng/ml). Se tomaron medidas espectrofotométricas en un lector de microplacas VersaMax™ (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, EE.UU.) con una longitud de onda de 650 nm. La absorbancia de los controles negativos fue restada a la de cada una de las muestras analizadas. Se realizó una recta de regresión con la absorbancia de los 13 calibradores utilizados y de ésta se extrapoló la cantidad de toxina Cry1Ab presente en las muestras.

**Tabla 2.3.** Metodología empleada para cuantificar la toxina Cry1Ab por ELISA.

Muestra	Tratamiento	Muestras analizadas (n)	Nº de individuos por muestra	Peso de la muestra (mg)	PBST Buffer (ml)	ng Cry1Ab / mg muestra	
<b>Hemiptera</b>							
Cicadellidae	<i>Z. scutellaris</i>	Bt	15	1	0,69 ± 0,02	0,5	2,63 ± 0,46
		no-Bt	2	5	3,03 ± 0,58	0,3	n.d.
	<i>Empoasca</i> spp.	Bt	2	3	2,22 ± 0,15	0,3	1,38 ± 0,23
		no-Bt	2	3	2,21 ± 0,04	0,3	n.d.
	<i>Macrostelus</i> spp.	Bt	8	1	1,76 ± 0,06	0,3	n.d.
		no-Bt	2	5	9,05 ± 0,01	0,3	n.d.
Delphacidae	Bt	3	10	9,61 ± 0,89	0,3	n.d.	
	no-Bt	1	5	5,35	0,3	n.d.	
<b>Diptera</b>							
Chloropidae	Bt	2	10	7,82 ± 1,03	0,3	n.d.	
	no-Bt	1	10	7,19	0,3	n.d.	
<b>Collembolla</b>							
Entomobryidae	<i>Entomobrya</i> spp.	Bt	3	150-200	5,52 ± 0,86	0,3	
		no-Bt	1	150-200	6,38	0,3	
<b>Planta</b>							
Hoja (V7)	Bt	5	-	4,99 ± 0,04	0,3 (dilución 1:40)	20,01 ± 0,83	
	no-Bt	2	-	5,01 ± 0,01	0,3	n.d.	

El límite de detección (LOD) se calculó utilizando la siguiente ecuación:  $LOD = 3 \sigma/S$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar de 10 controles de buffer PBST y S es la pendiente de la curva de calibración (ICH, 2005). El LOD obtenido fue de 0,17 ng Cry1Ab/ml.

### 2.2.6. Exposición de los colémbolos a la toxina Cry1Ab

La cantidad de toxina Cry1Ab se evaluó en especímenes de *Entomobrya* spp., que fueron los colémbolos más abundantes encontrados en las muestras de suelo (ver Resultados). Debido a su pequeño tamaño, para estudiar su exposición se requiere un gran número de individuos. Por ello, para recolectarlos se aprovechó la presencia de forma abundante de este género en las mazorcas de las plantas de maíz al final de la temporada. Así, poco antes de la cosecha se recogieron diez mazorcas de una parcela de maíz Bt y cinco mazorcas de una parcela no-Bt, embolsándolas primero en la planta, para después retirarlas manualmente. En el laboratorio se fueron retirando una a una las hojas que cubrían la mazorca dentro de la bolsa y con ayuda de un aspirador entomológico se capturaron los colémbolos vivos, congelándolos inmediatamente a -20 °C. Para seleccionar únicamente especímenes del género *Entomobrya*, los colémbolos se

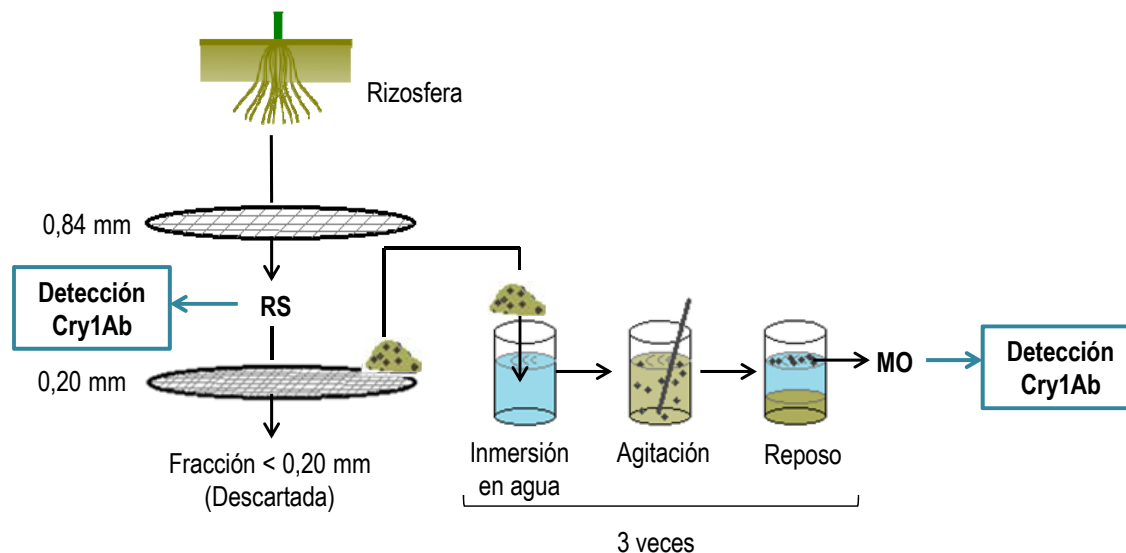
colocaron en una placa Petri sobre nieve carbónica y se examinaron con un microscopio estereoscópico. Los colémbolos recogidos en todas las mazorcas de cada tratamiento se agruparon aleatoriamente en muestras de 150 a 200 individuos (**Tabla 2.3**). Los niveles de toxina Cry1Ab de las muestras se determinaron mediante ELISA siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.5.

### **2.2.7. Extracción y cuantificación de la toxina Cry1Ab de la rizosfera**

Se analizó la presencia de toxina Cry1Ab en el suelo del mismo campo experimental, en tres fechas diferentes después de la cosecha del maíz (36, 78 y 99 días después). Las muestras se recogieron en el año 2013, en el que se esperaba que hubiera la mayor acumulación de toxina en el suelo. Para obtener las muestras, las cañas de maíz cortadas (20-30 cm de alto) que permanecían fijadas al suelo tras la cosecha se retiraron manualmente junto con las raíces y el suelo circundante. Cada una de ellas se guardó de forma individual en una bolsa de plástico hermética, consistiendo cada muestra en la fracción del suelo que estaba unida a las raíces (rizosfera). En cada fecha se recogieron dos muestras de una parcela de maíz Bt y una muestra de una parcela de maíz no-Bt que fue usada como control.

En el laboratorio las raíces se agitaron vigorosamente dentro de las bolsas para separar la rizosfera. La muestra se secó en una estufa (T 6060, Heraeus instrumentos, Hanou, Alemania) a 30 °C durante 72 horas y se pasó por un tamiz con una luz de malla de 0,84 mm para romper los agregados y eliminar los restos vegetales y piedras superiores a ese tamaño, obteniéndose la fracción RS (rizosfera <0,84 mm), la cual se pesó. A continuación, RS se pasó de nuevo por un tamiz con una luz de malla de 0,20 mm para descartar la fracción más fina. La fracción de suelo no descartada (tamaño de entre 0,84 y 0,20 mm) se sumergió en agua, se movió suavemente y se dejó reposar para posteriormente retirar cuidadosamente los fragmentos que flotaban, materia orgánica (MO) que estaba compuesta principalmente por restos de plantas que no estaban unidas a los componentes minerales del suelo (Gregorich *et al.*, 1994). Este proceso se repitió tres veces. La MO recuperada se colocó en un papel de filtro y se secó a 25 °C durante 48 h, tras lo cual se pesó y se redujo a polvo con nitrógeno líquido en un mortero de cerámica para homogeneizar la muestra y facilitar la extracción de la toxina (**Figura 2.5**). La cantidad de Cry1Ab se midió en la fracción RS y en la MO por ELISA siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.5. En este caso, para la extracción, 100 mg de

RS o 7,5 mg de MO se homogeneizaron con 0,5 ml de PBST, tras lo cual se mezclaron durante 30 min a 500 rpm en un agitador orbital (OS-20, Boeco, Alemania), y se centrifugaron a 14.500 rpm durante 15 min.



**Figura 2.5.** Esquema del fraccionamiento del suelo y de la extracción de la materia orgánica. RS = rizosfera < 0,84 mm; MO = materia orgánica recuperada de la rizosfera después de descartar las fracciones >0,84 y <0,20 mm.

### 2.2.8 Actividad insecticida de la toxina Cry1Ab de la materia orgánica de la rizosfera

Para analizar la actividad insecticida de la toxina Cry1Ab de la MO de la rizosfera, la toxina se extrajo con el mismo protocolo descrito en el apartado 2.2.7. con algunas modificaciones. En este caso, la MO recuperada en las tres fechas (36, 78 y 99 días después de la cosecha) se unificó y 3 gramos de la mezcla se homogeneizaron vigorosamente en un mortero con 70 ml de PBST. La mezcla se dispensó en tubos de 2 ml que se centrifugaron durante 15 min a 14.500 rpm. Posteriormente se recogió el sobrenadante de cada tubo recuperándose un total de 66 ml, que se liofilizó para concentrar la toxina. El polvo obtenido se resuspendió en 1,67 ml de agua Milli-Q estéril (sistema Milli-Q, Millipore, Francia). El mismo procedimiento se siguió con las muestras de MO procedentes de parcelas de maíz no-Bt. La cantidad de toxina se cuantificó por ELISA siguiendo el procedimiento descrito en apartado 2.2.5.

La actividad insecticida de la toxina recuperada se probó en una población de laboratorio de la especie susceptible *O. nubilalis* siguiendo el procedimiento descrito en Farinós *et*

*al.*, (2004), con algunas modificaciones. El bioensayo se realizó en bandejas de plástico "Bio-Ba-128" (color-Dec Italia, Capezzano Pianore, Italia), dispensándose en cada pocillo de la bandeja aproximadamente 1 ml de dieta artificial semisintética usada para la cría de la especie. Una vez solidificada, se aplicaron en la superficie de la dieta 50 µl de los extractos de MO de parcelas de maíz Bt (1,1 ng Cry1Ab/cm<sup>2</sup> de acuerdo con el resultado del ELISA) y no-Bt (control). Las bandejas se dejaron secar en una campana de flujo laminar y posteriormente se colocaron dos larvas neonatas (<24h) de *O. nubilalis* por pocillo con la ayuda de un pincel. La bandeja se tapó con cubiertas adhesivas ventiladas (Bio-CV-16, Color-Dec Italia, Capezzano Pianore, Italia). El número de larvas ensayadas en los tratamientos Bt y no-Bt fue de 62 y de 32, respectivamente. Las bandejas se incubaron en cámaras de cría a 25 ± 0,3 °C, 70 ± 5% de humedad relativa, y en oscuridad (Sanyo MLR-350 H. Sanyo, Japón). Después de 7 días se registró la mortalidad de las larvas.

Se realizó un bioensayo paralelo para estimar la mortalidad esperada a 1,1 ng Cry1Ab/cm<sup>2</sup> en la misma población de *O. nubilalis*, con toxina Cry1Ab purificada, siguiendo la metodología explicada anteriormente. Las concentraciones ensayadas fueron 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ng de Cry1Ab/cm<sup>2</sup>, realizándose tres réplicas de 32 larvas de cada concentración y de 64 larvas para el control. El control consistió en tampón carbonato-bicarbonato sódico (50 mM, pH = 10,5) que también se utilizó para realizar las diluciones de la toxina. La mortalidad fue corregida respecto a la del control por medio de la fórmula de Abbott (1987). La recta de regresión probit obtenida al relacionar el logaritmo de las concentraciones ensayadas y la mortalidad fue  $y = 1,3x + 4,95$  ( $\chi^2 = 85,5$ ; g.l. = 22). A partir de esta recta se calculó la mortalidad esperada para la concentración 1,1 ng Cry1Ab/cm<sup>2</sup>, obteniéndose un 49,5%.

### **2.2.9. Análisis estadístico**

Para el análisis del efecto del maíz Bt sobre los artrópodos presentes en la parte aérea de la planta y los microartrópodos edáficos se utilizó un modelo de ecuaciones de estimación generalizada (EEG). El análisis EEG es una extensión del modelo lineal generalizado que permite el análisis de medidas repetidas pudiendo no tener las variables una respuesta con distribución normal. En ambos casos la fecha de muestreo (la semana del año para el caso de los artrópodos de la parte aérea de la planta y el mes para los microartrópodos edáficos) se incorporó como un factor de medidas repetidas junto con el año. Los factores fijos fueron el tratamiento (Bt y no-Bt), el año de muestreo

(2009, 2010 y 2011), el bloque (ya que en los tres años su localización en el campo experimental fue la misma), las interacciones tratamiento x año y tratamiento x bloque, y además, debido a que no hubo el mismo número de muestreos en todos los años, se analizó también la fecha de muestreo anidada al año. Para todos los análisis, cuando se encontró una interacción significativa entre los factores año y tratamiento, se analizaron las diferencias entre tratamientos agrupando los datos de los tres años. En el caso de los artrópodos de la parte aérea de la planta se estudiaron las diferencias en la abundancia por trampa de cicadélidos, delfácidos, mimáridos, tricogramátidos, clorópodos y tisanópteros, transformando los datos previamente con el  $\ln(x+1)$  para asumir una distribución normal. En las muestras de suelo se analizaron las diferencias en la abundancia de ácaros (del total y de cada suborden) y colémbolos (del total y de las siete especies mayoritarias) por muestra, asumiendo distribuciones de Poisson. En el caso de los colémbolos, se calcularon además la riqueza (número de especies) y dos índices de diversidad de especies (Shannon y Simpson), transformando los datos con el  $\ln(x+1)$  para asumir una distribución normal. Las diferencias en la frecuencia de aparición de las siete especies de colémbolos predominantes entre las muestras de parcelas de maíz Bt y no-Bt también fueron analizadas. Para ello, sus abundancias por muestra se transformaron a una distribución binomial en la que el valor 1 representa la presencia de la especie en la muestra y el valor 0 ausencia. Además, también con el modelo EEG se analizaron las diferencias en las capturas de *Z. scutellaris* y *Anagrus* spp. entre las trampas adhesivas colocadas a 50 cm y a 150 cm en cada año de estudio por separado, considerándose solo como factor fijo la altura a la que se colocó la trampa. Para este análisis únicamente se tuvieron en cuenta los datos de las fechas en las que se colocaron las trampas a ambas alturas (desde la semana 28 a la 39).

Para identificar los taxones más adecuados para ser utilizados como indicadores de los posibles efectos del maíz Bt con los datos obtenidos con cada método de muestreo (trampas adhesivas y muestras de suelo) es necesario conocer el valor de la potencia de los análisis estadísticos realizados. Para ello, se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) con los factores año (2009, 2010 y 2011), tratamiento (Bt y no-Bt) y bloque, junto con las interacciones tratamiento x año y tratamiento x bloque. De este modo se conseguía incrementar los grados de libertad del test en comparación con el análisis de EEG y aumentar la potencia estadística del análisis. En cada análisis se estudiaron las diferencias en estos factores en la media del número total de artrópodos contabilizados por muestra de suelo o por trampa amarilla. Además, en los colémbolos, se analizaron los valores medios por muestra de la riqueza y de los dos índices de diversidad de

especies (Shannon y Simpson). Debido a que las interacciones tratamiento x año y tratamiento x bloque solo fueron significativas en tres de las variables analizadas se decidió no tener en cuenta estas interacciones para el análisis. Por otro lado, también se realizó un ANOVA de una vía con el factor tratamiento, con las mismas variables dependientes descritas, pero en este caso separando los datos año por año. Para normalizar los datos originales, éstos fueron previamente transformados con el  $\ln(x+1)$ . Todos los análisis descritos se realizaron con el software SPSS (IBM © SPSS © Estadística, Versión 22, 2013).

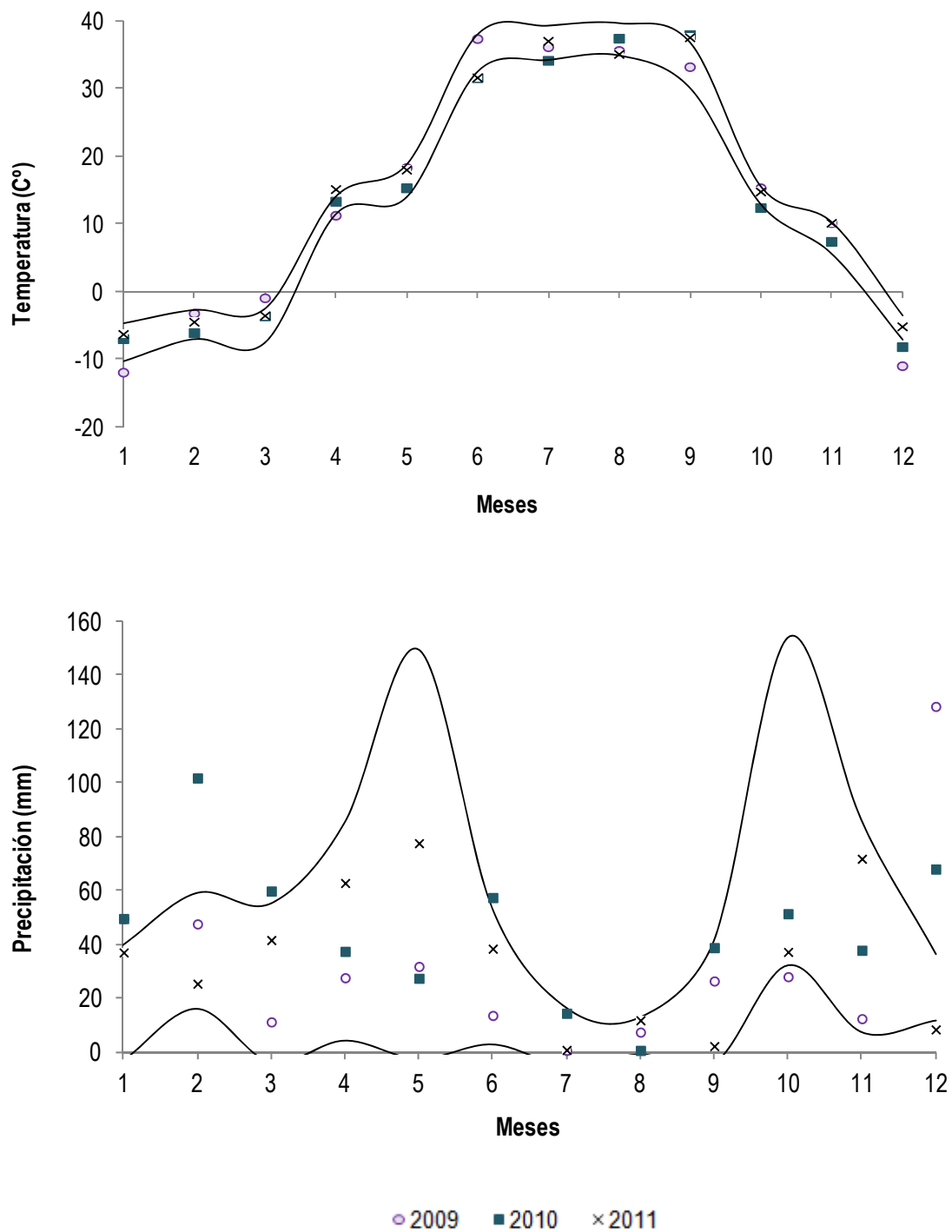
A partir de los ANOVAs de abundancia, riqueza y diversidad descritos anteriormente, se calculó la potencia para detectar dos magnitudes de diferencias entre el maíz Bt y no-Bt: una del 50% y otra más restrictiva capaz de detectar diferencias del 25%. Los valores de potencia se estimaron tanto para el análisis combinado con los datos de los tres años, como para los realizados cada año por separado. Los parámetros utilizados en el cálculo de la potencia incluyeron: el tamaño de la muestra, la media obtenida de cada variable estudiada en el maíz Bt y no-Bt, y la suma de cuadrados del término error obtenido en cada análisis. Además, para los datos obtenidos al combinar los tres años, se calculó la capacidad para detectar diferencias ( $dc$ ) en el maíz Bt en relación a la media del maíz no-Bt, estableciendo una potencia fija del 0,8. El término  $\alpha$  fue en todos los casos de 0,05. Los análisis de la potencia se llevaron a cabo mediante el software JMP v.11.1 (SAS, Versión 9.4).

La susceptibilidad de *O. nubilalis* a la toxina Cry1Ab se determinó por medio de los valores de mortalidad de las larvas. Se calculó la recta de regresión que relaciona el logaritmo de las concentraciones ensayadas y la mortalidad obtenida con la toxina Cry1Ab purificada mediante una análisis probit, con el programa POLO-Plus (LeOra © Software, versión 1.0, 2002-2015). Las diferencias entre la mortalidad observada con la toxina extraída de la MO (1,1 ng Cry1Ab/cm<sup>2</sup>) y la estimada a esa concentración con la toxina purificada se analizaron mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson, aplicándose la corrección de Yates para 1 g.l. Se utilizó un nivel de significación de  $p < 0,05$  en todos los análisis.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Variables ambientales

El clima en el área de estudio es mediterráneo continental, propio de las localidades de la Meseta Central, con veranos muy calurosos y secos e inviernos fríos. Las temperaturas medias más altas se registraron a partir de mediados de julio hasta finales de agosto, y las mínimas a partir de mediados de noviembre y hasta mediados de marzo. El régimen de precipitaciones fue muy bajo durante el verano, hecho que corresponde con el clima característico del centro de España. Los datos de las temperaturas analizadas en 2009, 2010 y 2011 estuvieron dentro de los IC al 95% obtenidos a partir de promedio de los 6 años anteriores (2003-2008) en la mayoría de los casos. En cambio, en los valores de precipitación acumulada por mes se registró un mayor número de desviaciones con respecto al IC calculado, particularmente desde diciembre de 2009 a marzo de 2010, periodo en el que las precipitaciones fueron más abundantes de lo habitual (**Figura 2.6**).



**Figura 2.6.** Temperatura del aire (°C) y precipitaciones (mm) mensuales en la parcela experimental en 2009, 2010 y 2011. Las líneas marcan los intervalos de confianza al 95% calculados con los datos desde 2003 a 2008, considerando para el caso de la precipitación los mm acumulados en el mes, y para la temperatura, las mínimas de diciembre-marzo, las máximas de junio-septiembre y la media de abril, mayo, octubre y noviembre.

## 2.3.2. Efectos del maíz Bt sobre los artrópodos de la parte aérea de la planta

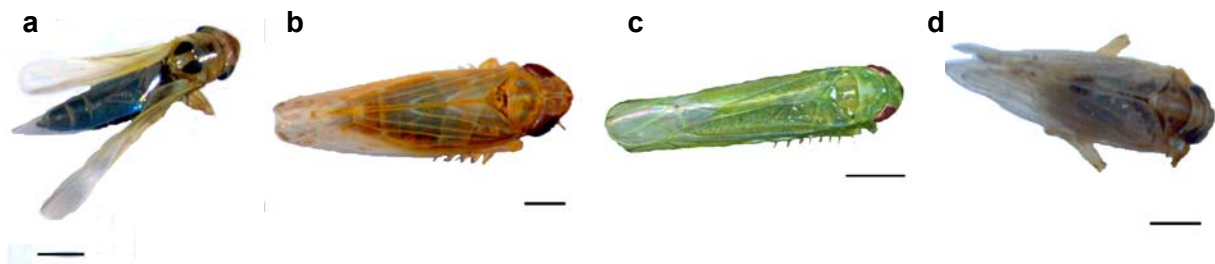
### 2.3.2.1. Artrópodos capturados con trampas adhesivas

De todas las capturas realizadas con las trampas adhesivas colocadas en la parte aérea del maíz durante los años 2009, 2010 y 2011 se analizaron un total de 27.205 artrópodos (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4.** Grupos de artrópodos contabilizados y número total de individuos de cada grupo en las trampas adhesivas colocadas durante el periodo 2009-2011.

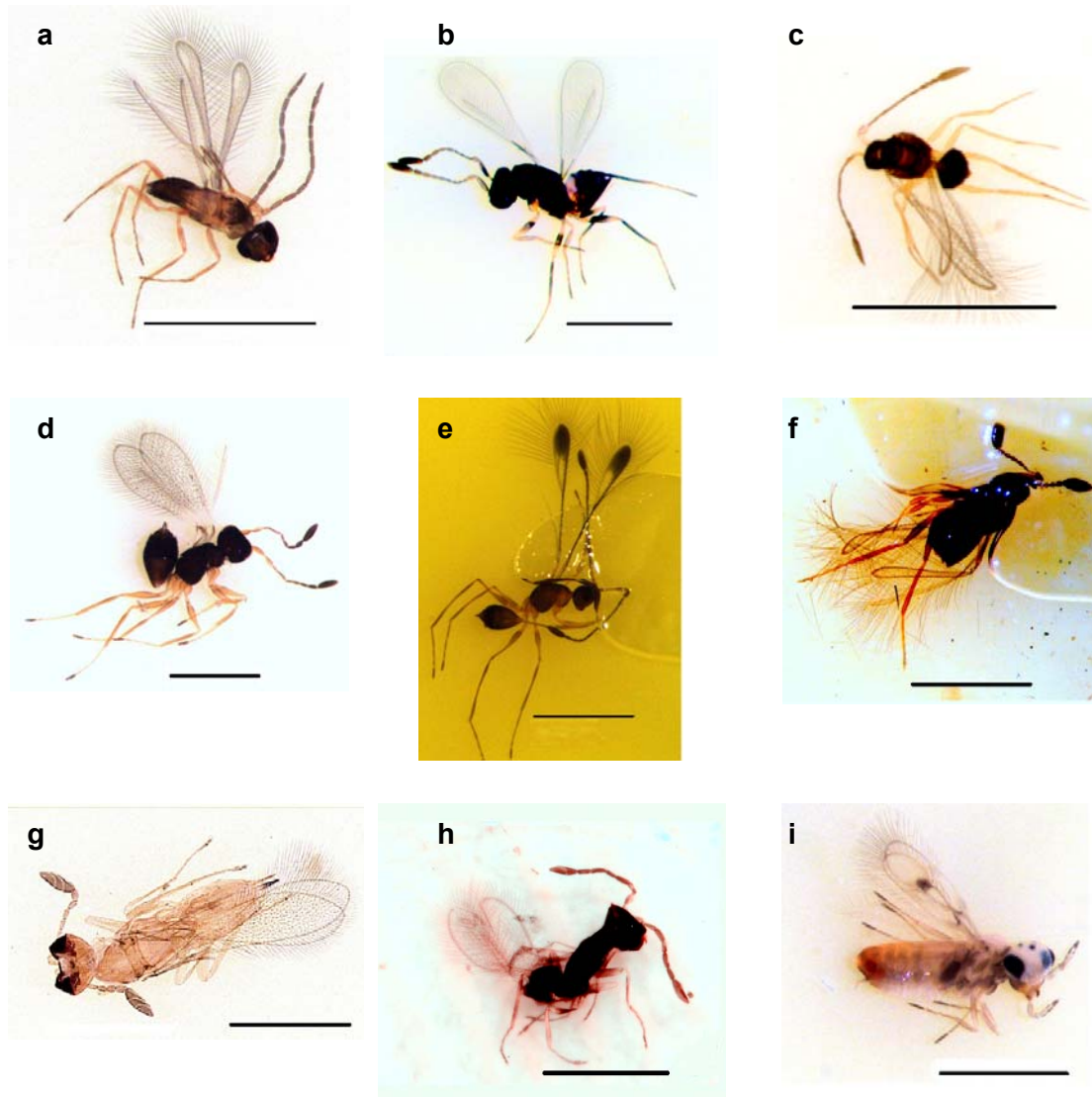
Grupos de artrópodos capturados de la parte aérea del maíz			Función principal en el ecosistema	Nº de individuos estudiados	
Hemiptera	Cicadellidae	<i>Z. scutellaris</i>	Herbívoro	11.079	
		<i>Empoasca</i> spp.	Herbívoro	606	
		<i>Macrostelus</i> spp.	Herbívoro	484	
		Otros		140	
	Delphacidae		Herbívoro	364	
	Anthocoridae	<i>Orius</i> spp.	Depredador	86	
Hymenoptera	Chalcidoidea	<i>Anagrus</i> spp.	Parasitoide	6.479	
		<i>Gonalocerus</i> spp.	Parasitoide	461	
		<i>Camptoptera</i> spp.	Parasitoide	46	
		<i>Polynema</i> spp.	Parasitoide	44	
		Mymaridae	<i>Mymar</i> spp.	Parasitoide	11
		<i>Litus</i> spp.	Parasitoide	2	
		<i>Stethynium</i> spp.	Parasitoide	3	
		<i>Anaphes</i> spp.	Parasitoide	3	
		Otros		9	
		Trichogrammatidae		Parasitoide	387
		Otros			1.744
	Ichneumonoidea	Braconidae	Parasitoide	44	
Ichneumonidae		Parasitoide	47		
Diptera	Chloropidae		Detritívoro	2.925	
Thysanoptera			Herbívoro/Depredador	1.882	
Coleoptera	Coccinellidae	<i>S. punctillum</i>	Depredador	151	
		<i>P. quatuordecimpunctata</i>	Depredador	50	
		<i>C. septempunctata</i>	Depredador	5	
	Staphylinidae		Depredador	49	
Neuroptera	Chrysopidae	<i>C. carnea</i>	Depredador	67	
Araneae			Depredador	37	
			<b>Total</b>	<b>27.205</b>	

Los cicadélidos fueron el grupo más abundante contabilizado, representando el 45,2% del total de los individuos. El 90% de ellos pertenecieron a la especie *Z. scutellaris*, siendo esta especie capturada en casi la totalidad de las trampas colocadas durante todo el estudio (98,6% de las trampas). El resto de los cicadélidos identificados pertenecieron a los géneros *Empoasca* (4,9%) y *Macrosteles* (3,9%). Dentro de los hemípteros también se encontraron, pero en menor medida, delfácidos (1,3% del total de los artrópodos) y depredadores del género *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) (**Tabla 2.4; Figura 2.7**).



**Figura 2.7.** Adultos de los principales hemípteros capturados con las trampas amarillas: *Z. scutellaris* (a), *Macrosteles* spp. (b), *Empoasca* spp. (c) y delfácido (d). La barra representa 0,5 mm.

El segundo grupo más abundante fue el de los himenópteros parasitoides (33,8% del total de artrópodos capturados), de los que casi la totalidad (98,5%) pertenecieron a la superfamilia Chalcidoidea. Dentro éstos, el 76,8% se englobaban en la familia Mymaridae, pudiéndose identificar ocho géneros diferentes (**Figura 2.8**), entre los que destacaban por su abundancia *Anagrus* spp. con el 91,8% y *Gonatocerus* spp. con el 6,5% del total de los mimáridos. El resto de los Chalcidoidea identificados pertenecieron a la familia Trichogrammatidae (**Figura 2.8**). También se capturaron representantes de la superfamilia Ichneumonoidea (bracónidos e ichneumónidos) aunque en densidades muy bajas (<0,4% del total de las capturas) (**Tabla 2.4**).



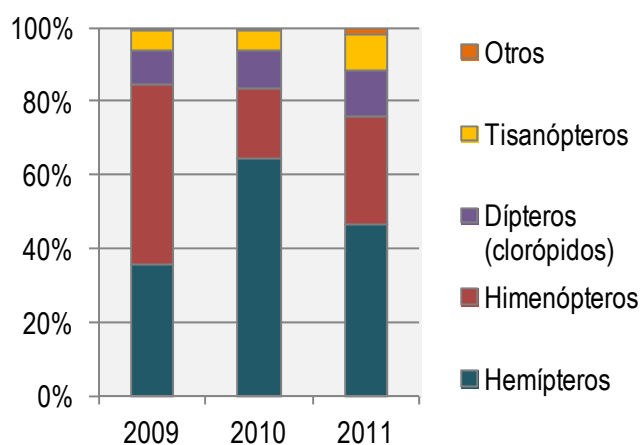
**Figura 2.8.** Adultos de los géneros de mimáridos capturados [(a) *Anagrus* spp., (b) *Gonatocerus* spp., (c) *Camptoptera* spp., (d) *Polynema* spp., (e) *Mymar* spp., (f) *Litus* spp., (g) *Stethynium* spp., y (h) *Anaphes* spp.] y de Trichogrammatidae (i). La barra representa 0,5 mm.

Además se capturaron dípteros de la familia Chloropidae, cuyos adultos son conocidos por alimentarse de los fluidos vegetales, suponiendo el 10,8% de las capturas. Los tisanópteros o trips (Thysanoptera) representaron el 6,9% del total de artrópodos, entre los que se pudieron identificar adultos de la familia *Aeolothripidae* (41,1% del total de los tisanópteros), que se alimentan tanto de polen como de pequeñas presas (**Tabla 2.4**).

El resto de las capturas fueron depredadores que acumularon el 1,3% de todos los artrópodos, habiéndose registrado individuos de *Chrysoperla carnea* (Stephen) (Neuroptera: Chrysopidae), distintas especies de coccinélidos (Coleoptera: Coccinellidae)

como *Stethorus punctillum* (Weise), *Propylea quatuordecimpunctata* (L.) y *Coccinella septempunctata* L., junto con larvas y adultos de estafilínidos (Coleoptera: Staphylinidae).

La distribución del porcentaje de los grupos por años (**Figura 2.9**) indicó que hemípteros e himenópteros, compuestos principalmente por cicadélidos y mimáridos respectivamente, fueron los grupos mayoritarios en todos los años, sumando entre ambos entre el 75-85% de las capturas. Las proporciones entre ambos grupos cambiaron en función del año, siendo en 2009 los himenópteros el grupo más abundante, mientras que en 2010 y 2011 lo fueron los hemípteros. Los niveles de clorópidos fueron muy similares todos los años. En cambio, en el año 2011 se capturaron proporcionalmente más trips que en los dos años anteriores. Debido a que estos cuatro grupos fueron los más abundantes, se estudiaron sobre ellos los posibles efectos del cultivo de maíz Bt en sus abundancias.



**Figura 2.9.** Porcentaje comparativo de los grupos de insectos más abundantes para cada año de estudio.

### 2.3.2.2. Abundancia y dinámica de las poblaciones de artrópodos capturados en maíz Bt y no-Bt

A continuación se describen los resultados obtenidos sobre el efecto del maíz Bt en la abundancia y dinámica de las poblaciones de hemípteros, himenópteros, clorópidos y tisanópteros (**Tabla 2.5**).

**Tabla 2.5.** Abundancia de los principales grupos de insectos capturados con trampas adhesivas en función del año (2009-2011) y del tratamiento (Bt, no-Bt) y resultados del análisis de ecuaciones de estimación generalizada (EEG).

	Abundancia por trampa (media ± error estándar) <sup>a</sup>						Resultados EEG <sup>b</sup>		
	2009		2010		2011		Año	Tratamiento	Año x Tratamiento
	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Wald $\chi^2$ ( $\rho$ ) (g.l. = 2)	Wald $\chi^2$ ( $\rho$ ) (g.l. = 1)	Wald $\chi^2$ ( $\rho$ ) (g.l. = 2)
<b>Hemiptera</b>									
<b>Cicadellidae</b>									
<i>Z. scutellaris</i>	32,68 ± 3,84	38,56 ± 4,91	37,39 ± 7,08	41,75 ± 5,39	16,06 ± 1,11	16,67 ± 1,06	128,44 (<0,00) *	1,53 (0,22)	3,18 (0,20)
<i>Empoasca</i> spp.	0,38 ± 0,15	0,13 ± 0,06	1,18 ± 0,37	0,77 ± 0,15	1,32 ± 0,14	1,99 ± 0,21	#	#	7,09 (0,03) *
<i>Macrosteles</i> spp.	0,90 ± 0,30	1,08 ± 0,35	1,04 ± 0,21	0,94 ± 0,19	1,17 ± 0,17	0,79 ± 0,12	5,28 (0,07)	0,56 (0,45)	4,51 (0,11)
<b>Delphacidae</b>	0,18 ± 0,07	0,27 ± 0,09	1,65 ± 0,44	1,88 ± 0,52	0,68 ± 0,11	0,58 ± 0,10	91,25 (<0,00) *	0,22 (0,64)	3,91 (0,14)
<b>Hymenoptera</b>									
<b>Mymaridae</b>									
<i>Anagrus</i> spp.	41,70 ± 6,87	40,75 ± 6,10	9,12 ± 1,21	10,56 ± 1,49	7,13 ± 0,56	6,69 ± 0,53	446,28 (<0,00) *	0,00 (0,99)	1,37 (0,50)
<i>Gonatocerus</i> spp.	39,56 ± 6,76	37,15 ± 5,94	8,82 ± 1,19	10,12 ± 1,44	6,13 ± 0,54	5,88 ± 0,54	272,30 (<0,00) *	0,01 (0,92)	0,43 (0,81)
<b>Trichogrammatidae</b>	1,72 ± 0,32	3,27 ± 0,56	0,22 ± 0,07	0,29 ± 0,10	0,77 ± 0,10	0,55 ± 0,08	#	#	28,30 (<0,00) *
<b>Diptera</b>									
<b>Chloropidae</b>	0,54 ± 0,14	0,83 ± 0,18	0,08 ± 0,04	0,52 ± 0,15	1,46 ± 0,24	0,54 ± 0,08	#	#	21,91 (<0,00) *
<b>Thysanoptera</b>	9,86 ± 1,01	9,48 ± 1,05	7,65 ± 1,89	5,75 ± 0,88	4,65 ± 0,35	4,24 ± 0,34	116,70 (<0,00) *	2,66 (0,10)	0,19 (0,91)
	4,10 ± 0,78	6,15 ± 1,04	3,78 ± 1,45	3,08 ± 1,12	3,94 ± 0,38	3,16 ± 0,35	#	#	9,71 (0,01) *

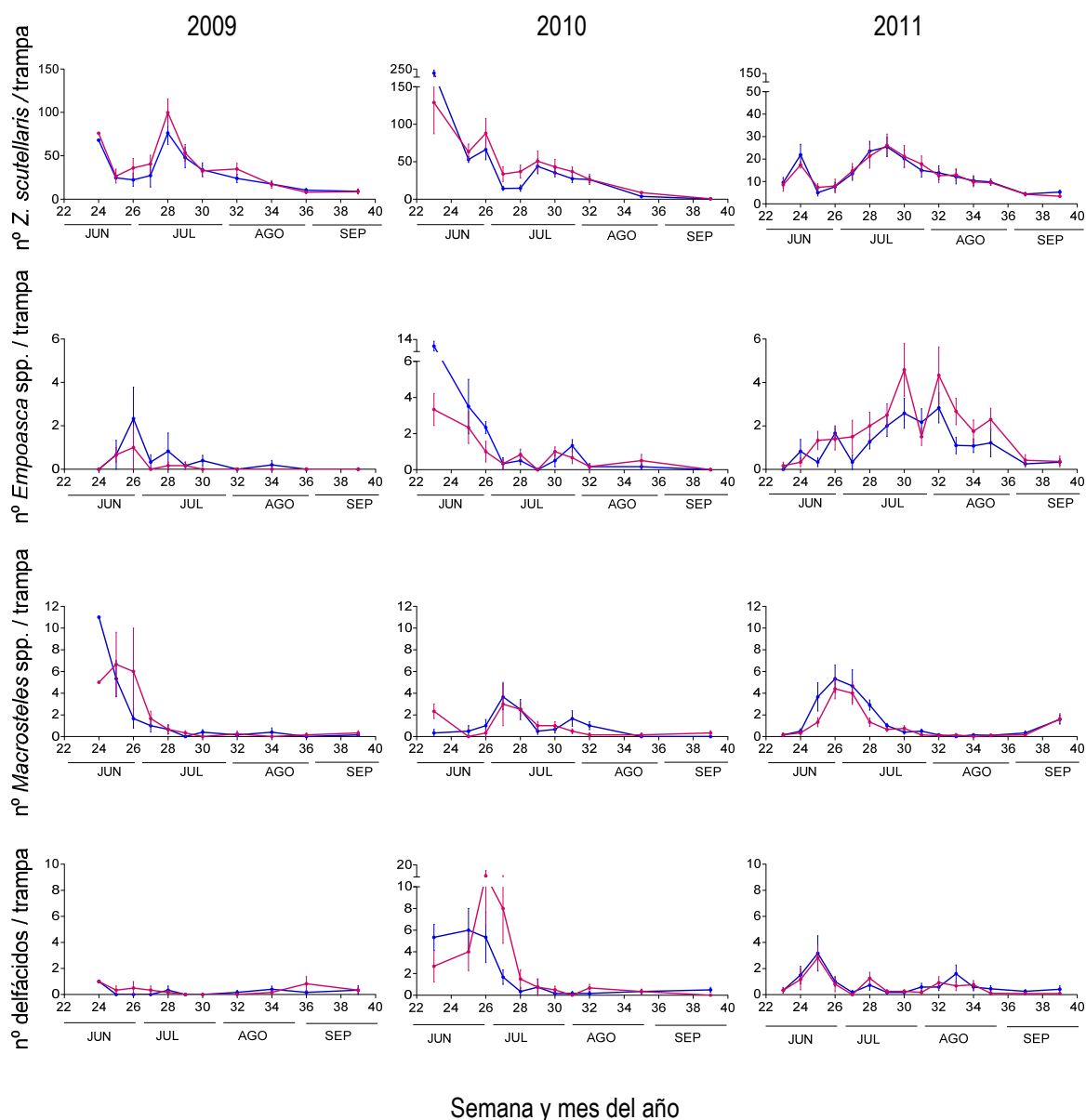
<sup>a</sup> El número de trampas fue 50 (2009, Bt), 48 (2009, no-Bt), 51 (2010, Bt), 52 (2010, no-Bt), 144 (2011, Bt) y 146 (2011, no-Bt).

<sup>b</sup> Los resultados del factor bloque, fecha anidada a año y la interacción tratamiento x bloque no se muestran.

# Los resultados del análisis estadístico para los factores año y tratamiento fueron omitidos cuando la interacción entre ambos factores fue significativa. En este caso las diferencias entre tratamientos se analizaron agrupando los datos de los tres años, siendo este el caso de *Empoasca* spp. (Wald  $\chi^2 = 1,12$ ;  $p = 0,29$ ), *Gonatocerus* spp. (Wald  $\chi^2 = 0,01$ ;  $p = 0,94$ ), *Trichogrammatidae* (Wald  $\chi^2 = 2,03$ ;  $p = 0,16$ ) y *Thysanoptera* (Wald  $\chi^2 = 0,05$ ;  $p = 0,83$ ).

\* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

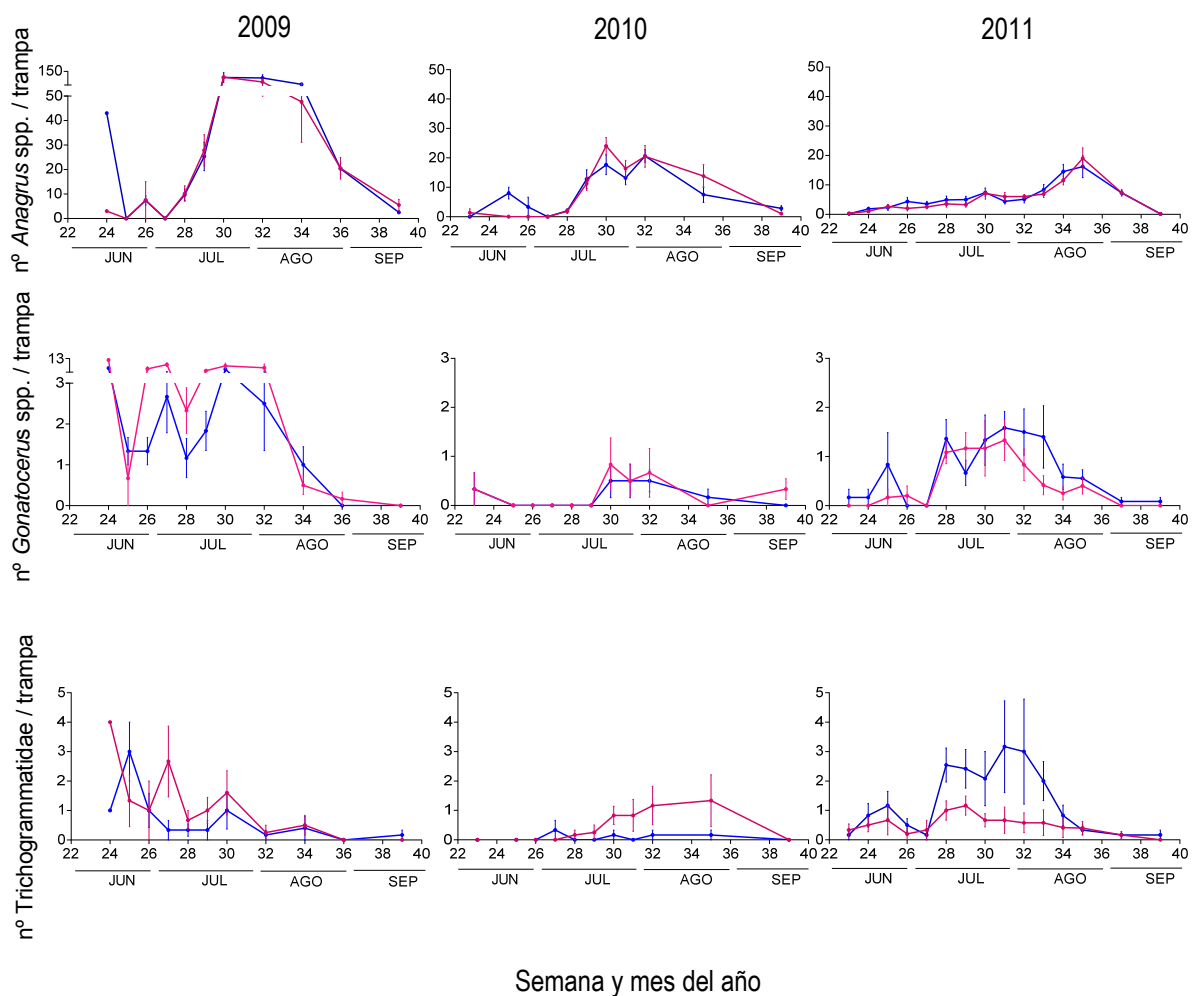
Los resultados del análisis de EEG indicaron que no existían diferencias significativas en la abundancia de cicadélidos y delfácidos en función del tratamiento, aunque sí se vieron muy influenciados por el año de estudio en ambos casos. Dentro de los cicadélidos, *Z. scutellaris* fue la especie más abundante encontrada, tanto en las parcelas de maíz Bt como no-Bt, en los tres años de estudio. Las abundancias de esta especie fueron significativamente mayores en 2009 y 2010 que en 2011, pero no se encontraron diferencias significativas entre maíz Bt y no-Bt. En su dinámica poblacional se observan dos picos de abundancia, el primero durante el mes de junio, y el segundo un mes después, tras el cual sus densidades disminuyen hasta prácticamente desaparecer a finales de septiembre. En *Empoasca* spp., la interacción entre los factores año y tratamiento fue significativa, pero en un análisis posterior agrupando los tres años no se encontraron diferencias entre los distintos tipos de maíz. En el caso de *Macrosteles* spp., no se encontraron diferencias significativas ni entre los años, ni entre los tratamientos. En las dinámicas de *Empoasca* spp. y *Macrosteles* spp. se puede distinguir generalmente en todos los casos un pico de abundancia (variable en función del año en *Empoasca* spp. y entre junio y julio en *Macrosteles* spp.), tras lo cual sus densidades decaen a niveles muy bajos (**Tabla 2.5; Figura 2.10**).



**Figura 2.10.** Abundancia (media  $\pm$  error estándar) de los diferentes grupos de hemípteros capturados por trampa a lo largo del cultivo de maíz en parcelas Bt (—) y no-Bt (—).

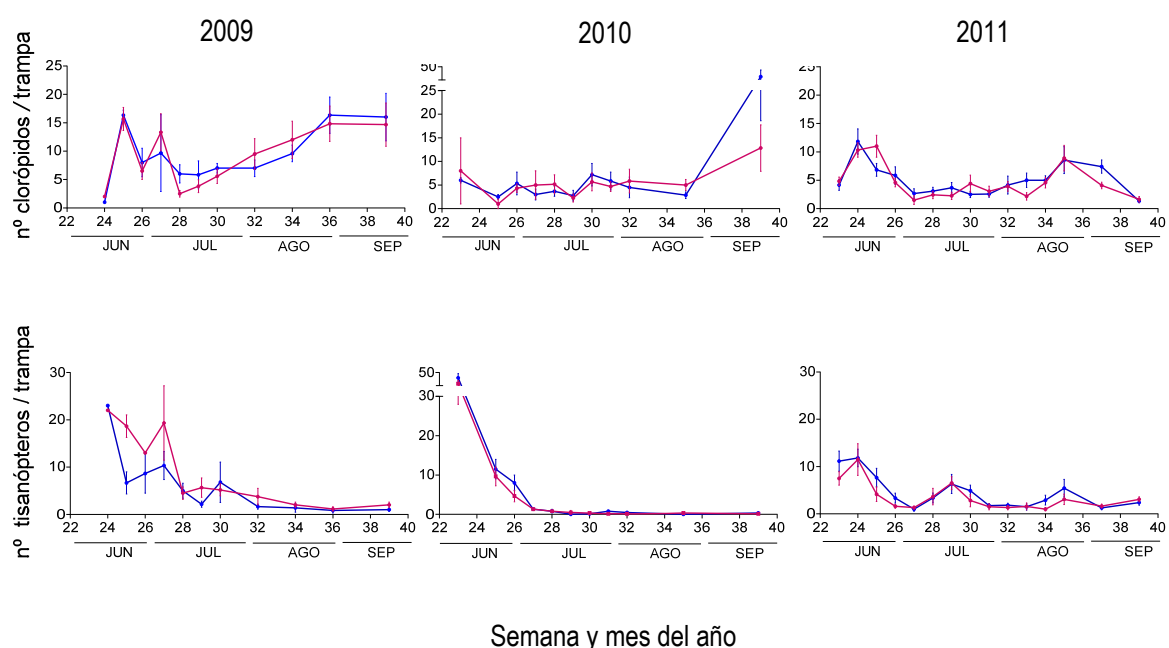
Dentro de los himenópteros parasitoides se analizó el efecto del maíz Bt en el conjunto de mimáridos, y particularmente de los dos géneros más abundantes, *Anagrus* y *Gonatocerus*, así como en la familia Trichogrammatidae. Las abundancias en el maíz Bt y no-Bt del conjunto de los mimáridos fueron muy similares, no encontrándose diferencias significativas entre ellas, pero sí entre años. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para *Anagrus* spp., género que acumuló más del 90% de las capturas de mimáridos, siendo más abundante en el 2009 que en el resto de los años de estudio. En

su dinámica se observa que las mayores capturas siempre se produjeron en los meses de julio o agosto, en función del año. *Gonatocerus* spp. solo se detectó de forma considerable en el año 2009. Igualmente, la presencia de la familia Trichogrammatidae en todo el estudio fue muy discreta, no habiéndose contabilizado más de 4 individuos en ninguna de las trampas examinadas. Tanto para este género como para los tricogramátidos la interacción año x tratamiento fue significativa, pero al estudiar las diferencias entre el maíz Bt y no-Bt agrupando los datos de los tres años no se obtuvieron diferencias en sus abundancias entre ambos tipos de maíz (Tabla 2.5; Figura 2.11).



**Figura 2.11.** Abundancia (media ± error estándar) de *Anagrus* spp., *Gonatocerus* spp., y tricogramátidos capturados por trampa a lo largo del cultivo de maíz en parcelas Bt (—) y no-Bt (—).

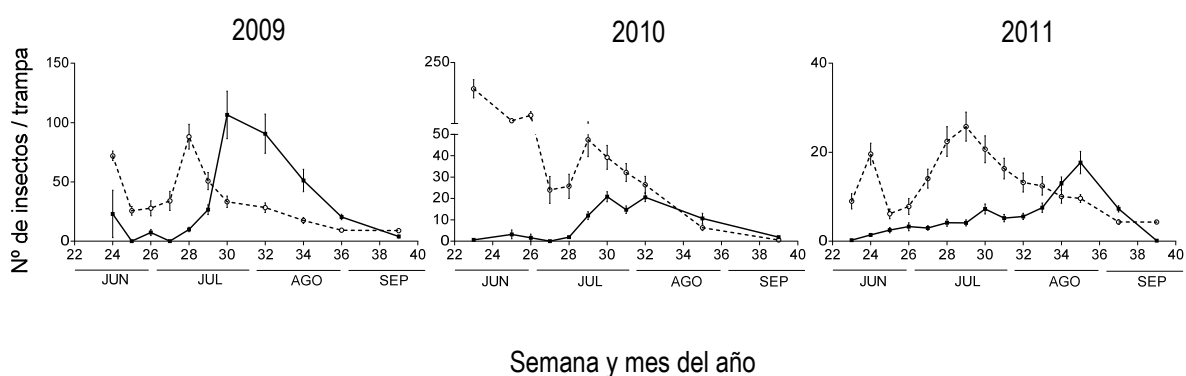
Los clorópidos presentaron abundancias diferentes en función del año, pero muy similares entre tratamientos. Al observar sus dinámicas se puede apreciar que hay un repunte de sus números en la etapa final del cultivo en 2009 y 2010. Las capturas de tisanópteros fueron siempre mayores durante el mes de junio, decayendo hasta prácticamente desaparecer al final del muestreo en todos los años. En este grupo se han encontrado diferencias significativas al analizar la interacción de ambos factores (año y tratamiento), aunque un análisis posterior agrupando los datos de los tres años de estudio no mostró diferencias entre los dos tipos de maíz (**Tabla 2.5; Figura 2.12**).



**Figura 2.12.** Abundancia (media  $\pm$  error estándar) de clorópidos y tisanópteros capturados por trampa a lo largo del cultivo de maíz en parcelas Bt (—) y no-Bt (—).

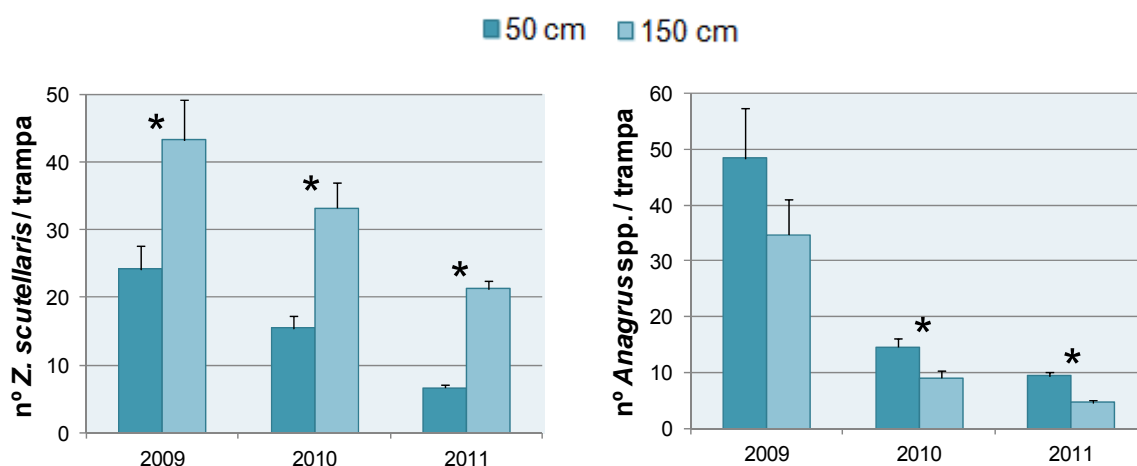
### 2.3.2.3. Relación entre el parasitoide *Anagrus* spp. y su huésped *Z. scutellaris* en el maíz

Como se ha mostrado anteriormente, los dos grupos más abundantes capturados en las trampas adhesivas fueron los cicadélidos, principalmente *Z. scutellaris*, y los himenópteros parasitoides de la familia Mymaridae, fundamentalmente *Anagrus* spp. Este hecho hace que sean dos grupos a tener en cuenta a la hora de elegir candidatos para la evaluación de efectos del maíz Bt sobre los artrópodos no-diana. Debido a la conexión trófica existente entre *Z. scutellaris* y *Anagrus* spp. como huésped y parasitoide se quiso conocer con más detalle la relación existente entre sus dinámicas en el cultivo del maíz. Como se ha visto anteriormente (apartado 2.3.2.2.), no se han observado diferencias significativas en las abundancias de ninguno de los dos grupos entre el maíz Bt y no-Bt. Además, tampoco se encontraron diferencias entre los bloques analizados (datos no mostrados). Por ello se han contrastado sus dinámicas dentro de cada año agrupando las capturas de los dos tratamientos y de los bloques. En los tres años de estudio se observó que *Z. scutellaris* presentó dos picos de abundancia, uno durante el mes de junio y otro un mes después, mientras que las mayores densidades de *Anagrus* spp. tuvieron lugar con posterioridad al segundo pico de abundancia de *Z. scutellaris*, hecho que fue mucho más evidente en los años 2009 y 2011 (**Figura 2.13**). Este resultado sugiere que la presencia del parasitoide en el maíz está ligada a la aparición de *Z. scutellaris* en el cultivo.



**Figura 2.13.** Abundancia (media  $\pm$  error estándar) de *Z. scutellaris* (-----) y *Anagrus* spp. (—) capturados por trampa en los tres años de estudio (2009, 2010 y 2011) a lo largo del cultivo de maíz.

Por otra parte, se evaluó la distribución de estos dos grupos en la planta de maíz durante los meses de julio, agosto y septiembre (semanas 28-39), cuando las plantas eran suficientemente altas para tener instaladas trampas a 50 cm y 150 cm del suelo. Se encontró que *Z. scutellaris* se capturó de forma más abundante en las trampas a 150 cm en los tres años de estudio (Wald  $\chi^2 = 13,77$ ;  $p < 0,00$  para 2009; Wald  $\chi^2 = 14,50$ ;  $p < 0,00$  para 2010; Wald  $\chi^2 = 128,92$ ;  $p < 0,00$  para 2011), mientras que *Anagrus* spp. fue más abundantes en las trampas a 50 cm en los años 2010 (Wald  $\chi^2 = 19,93$ ;  $p < 0,00$ ) y 2011 (Wald  $\chi^2 = 51,60$ ;  $p < 0,00$ ), pero no en 2009, en donde no se encontraron diferencias (Wald  $\chi^2 = 3,31$ ;  $p = 0,07$ ) (**Figura 2.14**).



**Figura 2.14.** Abundancia de *Z. scutellaris* y *Anagrus* spp. (media  $\pm$  error estándar) en las trampas amarillas colocadas a 50 cm y a 150 cm del suelo en los tres años de estudio (solo se analizan estadísticamente los datos de las fechas en las que se colocaron las trampas a ambas alturas). \* indica diferencias significativas debidas a la altura de la trampa dentro de cada año (análisis EEG,  $p < 0,05$ ).

### 2.3.3. Efectos del maíz Bt sobre los microartrópodos edáficos

#### 2.3.3.1. Composición de la comunidad de microartrópodos edáficos

Durante los tres años de estudio se recogieron un total de 15.235 microartrópodos pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos (**Tabla 2.6**).

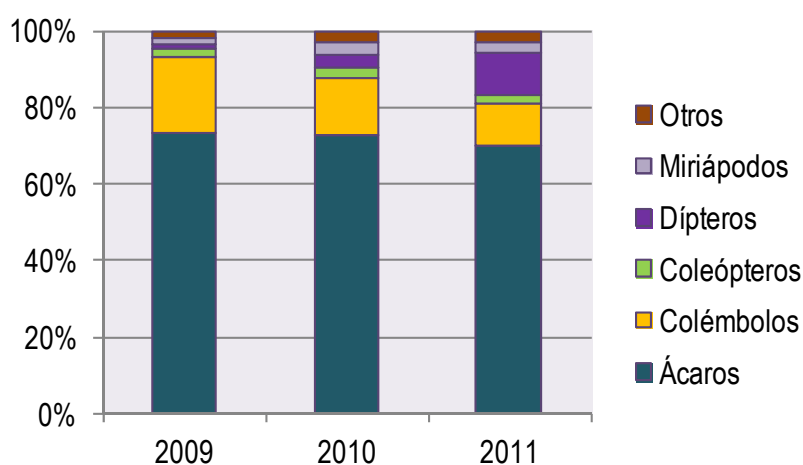
**Tabla 2.6.** Grupos de microartrópodos edáficos contabilizados y número total de individuos de cada grupo en todas las muestras de suelo recogidas durante el periodo 2009-2011.

Grupos de fauna de microartrópodos edáficos		Función principal en el ecosistema	Nº de individuos capturados en los tres años de estudio	
Arachnida	Acari	Detritívoro/Depredador	11.057	
	Araneae	Depredador	22	
	Collembola	Detritívoro	2.271	
Coleoptera	Staphylinidae	Depredador	265	
		Carabidae	Depredador	12
		Otros	52	
Hexapoda	Diptera (larva)	Chironomidae	Detritívoro	750
		Otros	Detritívoro	196
	Psocoptera	Detritívoro	12	
	Thysanoptera	Herbívoro/Depredador	51	
	Homoptera	Cicadellidae	Herbívoro	110
	Hymenoptera	Formicidae	Detritívoro/Herbívoro/Depredador	21
Myriapoda	Diplopoda	Julidae	Detritívoro	178
		Polydesmidae	Detritívoro	35
	Pauropoda	Detritívoro	90	
	Symphyla	Detritívoro	73	
	Chilopoda	Scolopendromorpha	Depredador	21
		Lithobiomorpha	Depredador	19
<b>Total</b>			<b>15.235</b>	

Ácaros y colémbolos fueron los grupos más abundantes en los tres años de estudio, suponiendo más de 86% de los microartrópodos capturados en los tres años. En menor medida, se encontraron otros microartrópodos, dentro de los cuales el grupo mayoritario fue el de los dípteros (6,21% del total de los individuos recogidos), representados en su gran mayoría por larvas de quironómidos (Diptera: Chironomidae). Los siguientes grupos

en abundancia fueron los miriápodos (2,73% del total) y los coleópteros (2,16%), principalmente representados por larvas y adultos de estafilínidos (Coleoptera: Staphylinidae) y carábidos (Coleoptera: Carabidae). Otros grupos encontrados que no superaron el 1% del total de las capturas fueron arañas (Araneae), psocópteros (Psocoptera), trips (Thysanoptera), cicadélidos (Homoptera: Cicadellidae) y hormigas (Hymenoptera: Formicidae) (**Tabla 2.6**).

Los ácaros fueron el grupo dominante en las muestras de suelo en los tres años de estudio, no observándose cambios en sus proporciones entre los años (**Figura 2.16**). Les siguieron los colémbolos, aunque en este caso se puede observar que fueron proporcionalmente más importantes en 2009 que en 2010 y 2011, con respecto al total de los microartrópodos capturados. La suma de ambos grupos superó el 80% de las capturas en los tres años, por lo que se estudió en ellos los posibles efectos del maíz Bt sobre la dinámica de sus poblaciones a lo largo del año y sobre distintos parámetros poblacionales.



**Figura 2.16.** Porcentaje comparativo de los grupos de microartrópodos más abundantes en cada año de estudio.

### **2.3.2.2. Abundancia y dinámica de la población de ácaros del suelo en maíz Bt y no-Bt**

La mayoría de los ácaros (94%) se identificaron hasta suborden, obteniéndose la siguiente distribución: Oribatida (45%), Actinedida (37%), Gamasida (10%) y Acaridida (1%). La dinámica del total de los ácaros fue similar a lo largo del estudio, no encontrándose diferencias significativas en sus abundancias ni entre los tres años de estudio ni entre tratamientos, siendo siempre más abundantes durante el cultivo del maíz en ambos tratamientos. Al analizar cada suborden por separado se observa que las abundancias de oribátidos, gamásidos y actinédidos fueron diferentes en los tres años de estudio, aunque no la de los acarídidos. El suborden Actinedida fue el único que presentó diferencias significativas entre las parcelas de maíz Bt y no-Bt, debido principalmente a los altos valores observados en parcelas Bt a finales de septiembre del año 2011. En ningún caso hubo interacciones significativas entre los factores analizados, año y tratamiento (**Tabla 2.7; Figura 2.17**).

**Tabla 2.7.** Abundancia del total de ácaros, oribátidos, actinédidos, gamásidos y acarídidos en función del año (2009-2011) y del tratamiento (Bt, no-Bt) y resultados del análisis de ecuaciones de estimación generalizada (EEG).

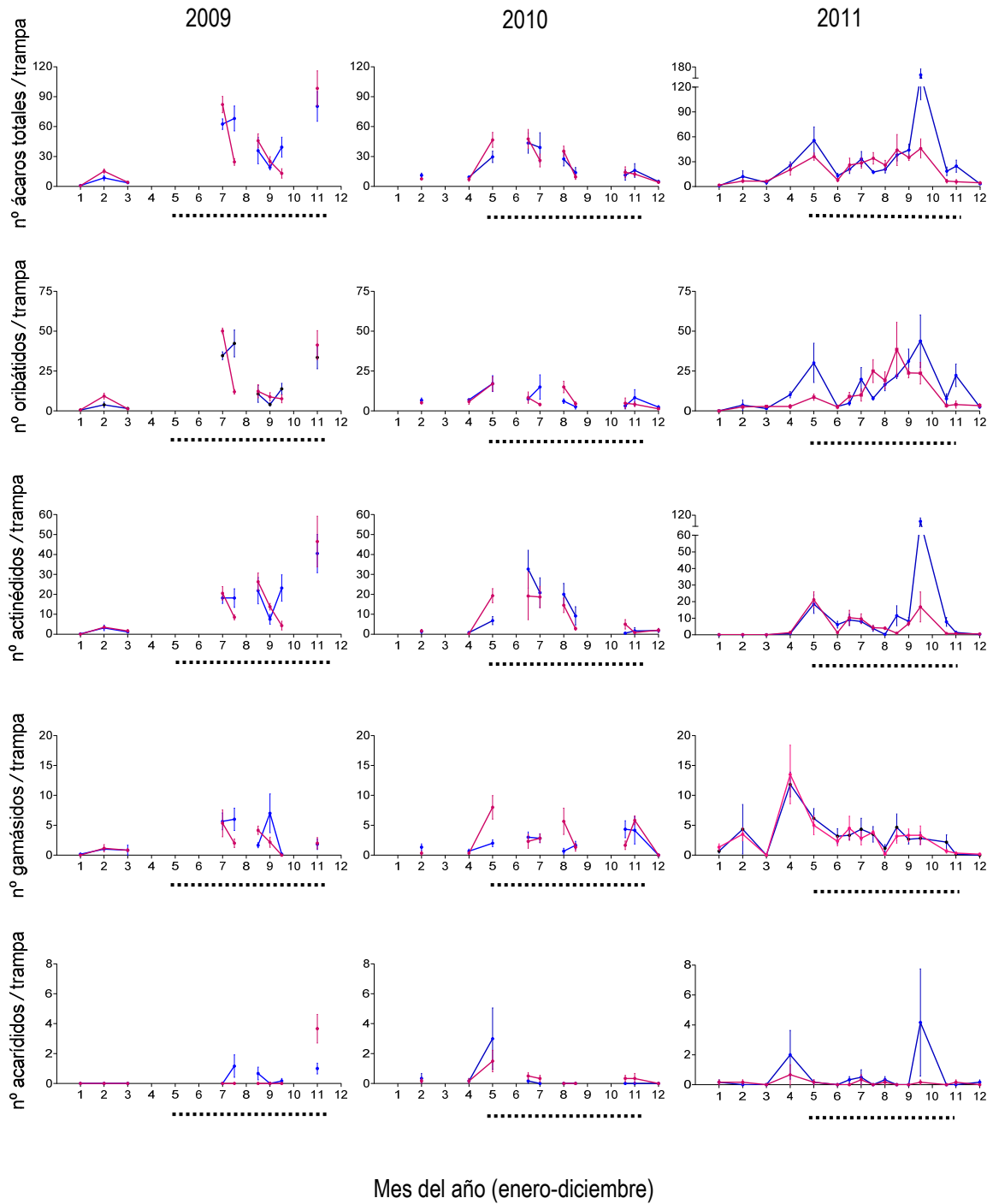
	Abundancia por muestra de suelo (media ± error estándar) <sup>a</sup>						Resultados EEG <sup>b</sup>		
	2009		2010		2011		Año	Tratamiento	Año x Tratamiento
	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Wald $\chi^2$ ( $p$ ) (g.l. = 2)	Wald $\chi^2$ ( $p$ ) (g.l. = 1)	Wald $\chi^2$ ( $p$ ) (g.l. = 2)
<b>Total ácaros</b>	35,37 ± 4,69	36,12 ± 5,31	20,62 ± 2,67	21,03 ± 2,55	29,43 ± 4,01	21,01 ± 2,21	3,68 (0,16)	2,13 (0,14)	2,75 (0,25)
<b>Oribatida</b>	16,09 ± 2,50	16,76 ± 2,69	7,60 ± 1,20	7,02 ± 0,97	14,18 ± 1,93	11,20 ± 1,67	15,35 (<0,00)*	1,72 (0,19)	1,02 (0,60)
<b>Actinedida</b>	14,87 ± 2,28	14,68 ± 2,60	9,57 ± 1,91	8,43 ± 1,67	10,16 ± 2,42	4,96 ± 0,93	18,88 (<0,00)*	8,54 (<0,00)*	5,71 (0,06)
<b>Gamasida</b>	2,70 ± 0,56	2,04 ± 0,40	2,07 ± 0,35	2,83 ± 0,47	3,19 ± 0,47	3,00 ± 0,48	11,11 (<0,00)*	0,00 (0,99)	4,74 (0,09)
<b>Acaridida</b>	0,33 ± 0,12	0,44 ± 0,20	0,37 ± 0,22	0,33 ± 0,10	0,49 ± 0,25	0,12 ± 0,05	4,79 (0,09)	1,85 (0,17)	3,99 (0,14)

<sup>a</sup> El número de muestras fue 54 (2009, Bt), 50 (2009, no-Bt), 60 (2010, Bt y no-Bt) y 96 (2011, Bt y no-Bt).

<sup>b</sup> Los resultados del factor bloque, fecha anidada a año y la interacción tratamiento x bloque no se muestran.

\* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Efectos del cultivo continuado del maíz Bt sobre los artrópodos no-diana



**Figura 2.17.** Abundancia (media  $\pm$  error estándar) de los ácaros totales y de cada suborden (oribátidos, actinédidos, gamásidos y acarídidos) capturados por trampa a lo largo del año en parcelas de maíz Bt (—) y no-Bt (—). La línea discontinua marca el periodo de cultivo de maíz.

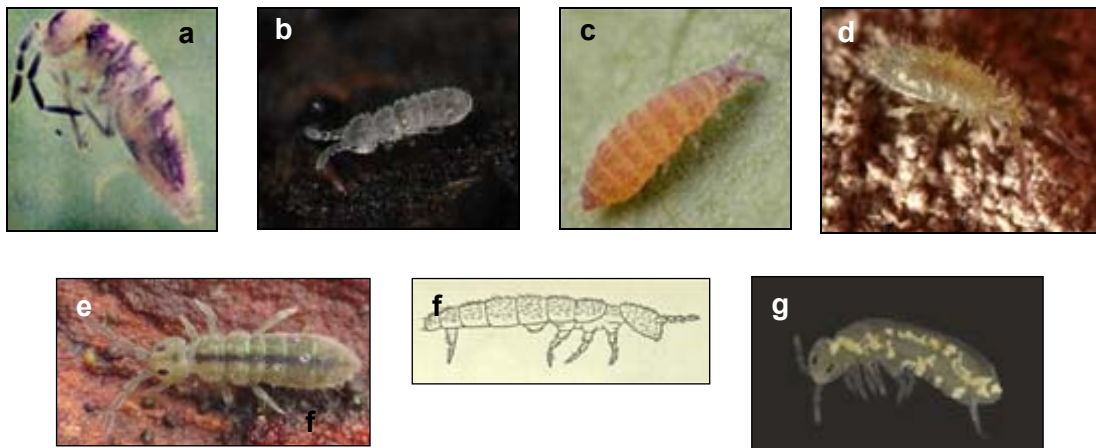
### 2.3.3.3. Abundancia, dinámica de la población y composición de especies de colémbolos en maíz Bt y no-Bt

Los colémbolos fueron el segundo grupo de microartrópodos más abundantes capturados en las muestras de suelo. Un total de 2.259 individuos se identificaron hasta nivel de especie, estando representados los cuatro subórdenes del grupo (Entomobryomorpha, Poduromorpha, Neelipleona y Symphypleona). Se registraron un total de 25 especies, la mayoría pertenecientes a las familias Entomobryidae e Isotomidae (Entomobryomorpha) (Tabla 2.8).

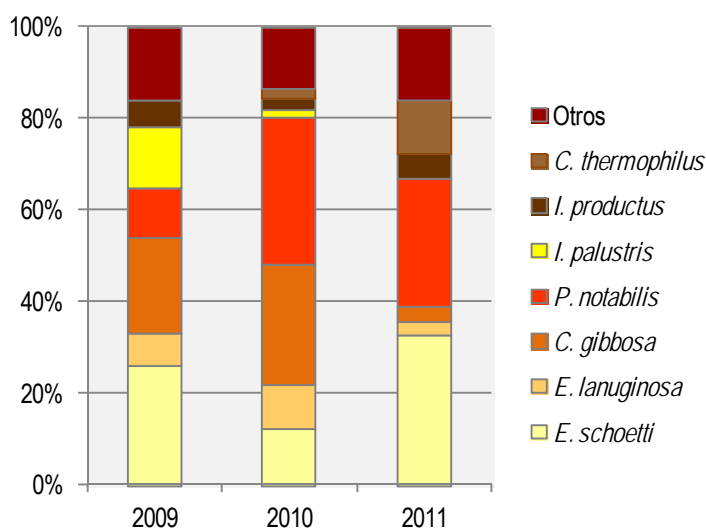
**Tabla 2.8.** Especies de colémbolos capturadas en las muestras de suelo y su proporción en los tres años de estudio.

Orden	Familia	Especie	Proporción de capturas (%)
Entomobryomorpha	Entomobryidae	<i>Entomobrya schoetti</i> Stach	25,28
		<i>Entomobrya lanuginosa</i> Nicolet	6,25
		<i>Entomobrya</i> sp1	0,40
		<i>Entomobrya</i> sp2	1,32
		<i>Pseudosinella imparipunctata</i> Gisin	2,07
		<i>Pseudosinella templadoi</i> Simón y Selga	1,41
		<i>Sinella coeca</i> (Schött)	0,97
		<i>Lepidocyrtus lusitanicus</i> Gama	0,22
		<i>Willowsia platini</i> Nicolet	0,04
		<i>Orchesella quinquefasciata</i> (Bourlet)	0,04
		<i>Parisotoma notabilis</i> (Schäffer)	21,44
		<i>Isotomurus palustris</i> (Müller)	6,12
		<i>Isotomodes productus</i> (Axelson)	4,98
		<i>Cryptopygus thermophilus</i> (Axelson)	4,45
Isotomidae	<i>Folsomia checae</i> Luciañez y Simón	1,54	
	<i>Proisotoma</i> sp.	1,37	
	<i>Pseudanurophorus isotoma</i> (Börner)	0,13	
	<i>Folsomides parvulus</i> Stach	0,13	
	Cyphoderidae	<i>Cyphoderus bidentaculatus</i> Parona	1,94
Poduromorpha	Hypogastruridae	<i>Ceratophysella gibbosa</i> (Bagnall)	16,03
	Onychiuridae	<i>Mesaphorura macrochaeta</i> Rusek	1,98
Neelipleona	Neeliidae	<i>Megalothorax minimus</i> (Willem)	0,79
		<i>Neelus</i> sp.	0,04
Symphypleona	Sminthuridae	<i>Sphaeridia pumilis</i> (Krausbaver)	0,35
	Arrhopalitidae	<i>Arrhopalites microphthalmus</i> Cassagnau y Delamare	0,18
No identificados			0,53

Siete especies (*Entomobrya schoetti*, *Parisetoma notabilis*, *Ceratophysella gibbosa*, *Entomobrya lanuginosa*, *Isotomurus palustris*, *Isotomodes productus* y *Cryptopygus thermophilus*) representaron el 85% del total de los colémbolos capturados (**Figura 2.18**). De estas siete especies mayoritarias, *E. schoetti* y *P. notabilis* fueron las predominantes (25,28% y 21,44% del total, respectivamente). *Entomobrya schoetti* fue la especie más abundante en 2009, *P. notabilis* en 2010 y ambas presentaron abundancias similares en 2011 (**Figura 2.19**).



**Figura 2.18.** Adultos de *E. schoetti* (a) (Jordana y Baquero, 1999); *P. notabilis* (b) (bugguide.net); *C. gibbosa* (c) (bugguide.net); *E. lanuginosa* (d) (bugguide.net); *I. palustris* (e) (bugguide.net); *I. productus* (f) (collembola.org); *C. thermophilus* (g) (collections.tepapa.govt.nz).



**Figura 2.19.** Porcentaje comparativo de las siete especies de colémbolos más abundantes capturadas en las muestras de suelo de parcelas de maíz Bt y no-Bt, en los tres años de estudio.

La dinámica de la población de colémbolos en su conjunto tuvo un patrón diferente dependiendo del año, observándose cómo en 2009 y 2011 las capturas fueron mayores en las fechas en las que el cultivo estaba presente, mientras que en el año 2010 esta tendencia no fue tan clara (**Figura 2.20**). En el total de colémbolos se obtuvo una interacción significativa entre los factores año y tratamiento por lo que la abundancia fue analizada agrupando los datos de todos los años, no encontrándose en este análisis diferencias entre tratamientos. Al estudiar cada especie de colémbolo por separado, solo en *E. schoetti* y *E. lanuginosa* la interacción entre los factores año y tratamiento fue significativa, aunque tampoco se detectaron diferencias significativas entre ambos tipos de maíz en el análisis posterior. En las cinco especies restantes las abundancias fueron diferentes en función del año, pero solo para *P. notabilis* se encontraron diferencias entre los tratamientos, siendo más abundante en las parcelas de maíz Bt (**Tabla 2.9**). Tanto *E. schoetti* como *P. notabilis*, las dos especies más abundantes del estudio, fueron capturadas principalmente cuando el cultivo de maíz estaba presente (**Figura 2.20**). El resto de las especies de colémbolos presentaron patrones de distribución en cada año muy heterogéneos, sin una clara relación con la fecha de muestreo (dinámicas no mostradas).

**Tabla 2.9.** Abundancia, riqueza y diversidad de especies colémbolos capturados en las muestras de suelo en función del año (2009-2011) y del tratamiento (Bt, no-Bt) y resultados del análisis de ecuaciones de estimación generalizada (EEG).

	Abundancia por muestra de suelo (media ± error estándar) <sup>a</sup>						Resultados EEG <sup>b</sup>		
	2009		2010		2011		Año	Tratamiento	Año x Tratamiento
	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Wald $\chi^2$ ( $\rho$ ) (g.l. = 2) <sup>c</sup>	Wald $\chi^2$ ( $\rho$ ) (g.l. = 1)	Wald $\chi^2$ ( $\rho$ ) (g.l. = 2) <sup>c</sup>
<b>Abundancia</b>									
<b>Total colémbolos</b>	7,91 ± 1,33	11,12 ± 2,06	5,07 ± 1,35	3,40 ± 0,89	5,02 ± 0,68	3,10 ± 0,38	#	#	16,09 (<0,00)*
<i>E. schoetti</i>	1,70 ± 0,62	3,30 ± 1,52	0,72 ± 0,25	0,33 ± 0,09	1,61 ± 0,42	1,03 ± 0,24	#	#	11,75 (<0,00)*
<i>E. lanuginosa</i>	0,96 ± 0,38	0,36 ± 0,20	0,30 ± 0,11	0,52 ± 0,18	0,17 ± 0,07	0,07 ± 0,03	#	#	14,65 (<0,00)*
<i>P. notabilis</i>	0,94 ± 0,27	1,10 ± 0,43	1,72 ± 0,59	1,00 ± 0,36	1,35 ± 0,27	0,92 ± 0,23	15,63 (<0,00)*	6,52 (0,01)*	2,55 (0,28)
<i>I. palustris</i>	1,00 ± 0,32	1,54 ± 0,41	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,05	0	0	34,02 (<0,00)*	1,14 (0,29)	0,04 (0,83)
<i>I. productus</i>	0,44 ± 0,23	0,66 ± 0,22	0,15 ± 0,06	0,08 ± 0,04	0,28 ± 0,09	0,16 ± 0,06	10,42 (0,01)*	1,31 (0,25)	3,58 (0,17)
<i>C. thermophilus</i> <sup>d</sup>	0	0	0,05 ± 0,03	0,12 ± 0,06	0,75 ± 0,29	0,20 ± 0,06	5,23 (0,02)*	0,01 (0,91)	-
<i>C. gibbosa</i>	1,15 ± 0,52	2,86 ± 0,74	1,30 ± 0,74	0,90 ± 0,59	0,16 ± 0,10	0,12 ± 0,06	45,02 (<0,00)*	0,40 (0,53)	3,36 (0,19)
<b>Riqueza de especies</b>	2,48 ± 0,25	2,16 ± 0,24	1,72 ± 0,16	1,37 ± 0,14	1,66 ± 0,15	1,35 ± 0,13	14,03 (<0,00)*	9,27 (<0,00)*	0,06 (0,97)
<b>Diversidad de especies</b>									
<b>Simpson</b>	0,35 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,33 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,03	2,55 (0,28)	10,46 (<0,00)*	2,74 (0,25)
<b>Shannon</b>	0,63 ± 0,04	0,45 ± 0,07	0,53 ± 0,06	0,34 ± 0,06	0,49 ± 0,06	0,46 ± 0,06	4,80 (0,09)	9,80 (<0,00)*	2,00 (0,37)

<sup>a</sup> El número de muestras fue 54 (2009, Bt), 50 (2009, no-Bt), 60 (2010, Bt y no-Bt) y 96 (2011, Bt y no-Bt).

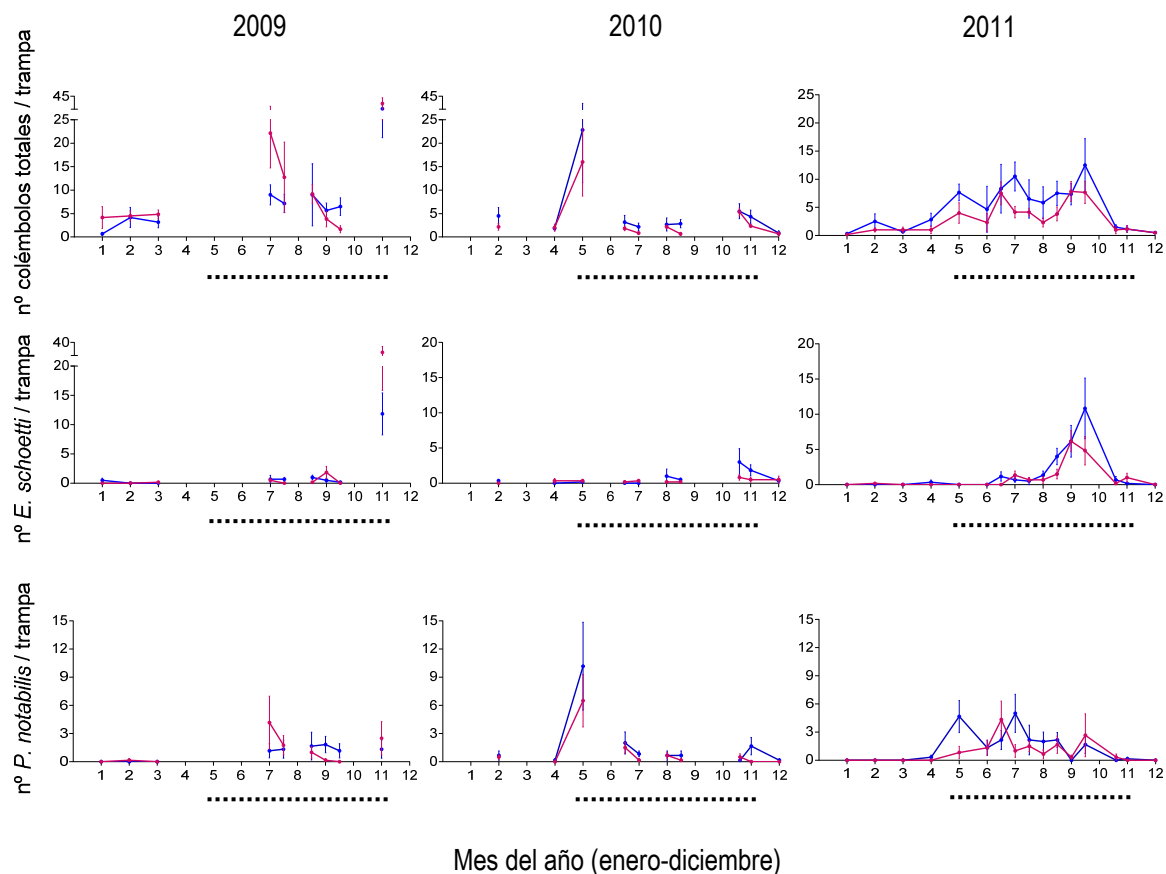
<sup>b</sup> Los resultados del factor bloque, fecha anidada a año y la interacción tratamiento x bloque no se muestran.

<sup>c</sup> excepto para *I. palustris* y *C. thermophilus* para los cuales es g.l.=1.

<sup>d</sup> En esta especie no se pudo analizar la interacción año x tratamiento.

# Los resultados del análisis estadístico para los factores año y tratamiento fueron omitidos cuando la interacción entre ambos factores fue significativa. En este caso las diferencias entre tratamientos se analizaron agrupándolos datos de los tres años, siendo este el caso del total de colémbolos (Wald  $\chi^2 = 0,64$ ;  $p = 0,43$ ), *E. schoetti* (Wald  $\chi^2 = 0,08$ ;  $p = 0,77$ ) y *E. lanuginosa* (Wald  $\chi^2 = 1,90$ ;  $p = 0,17$ ).

\* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

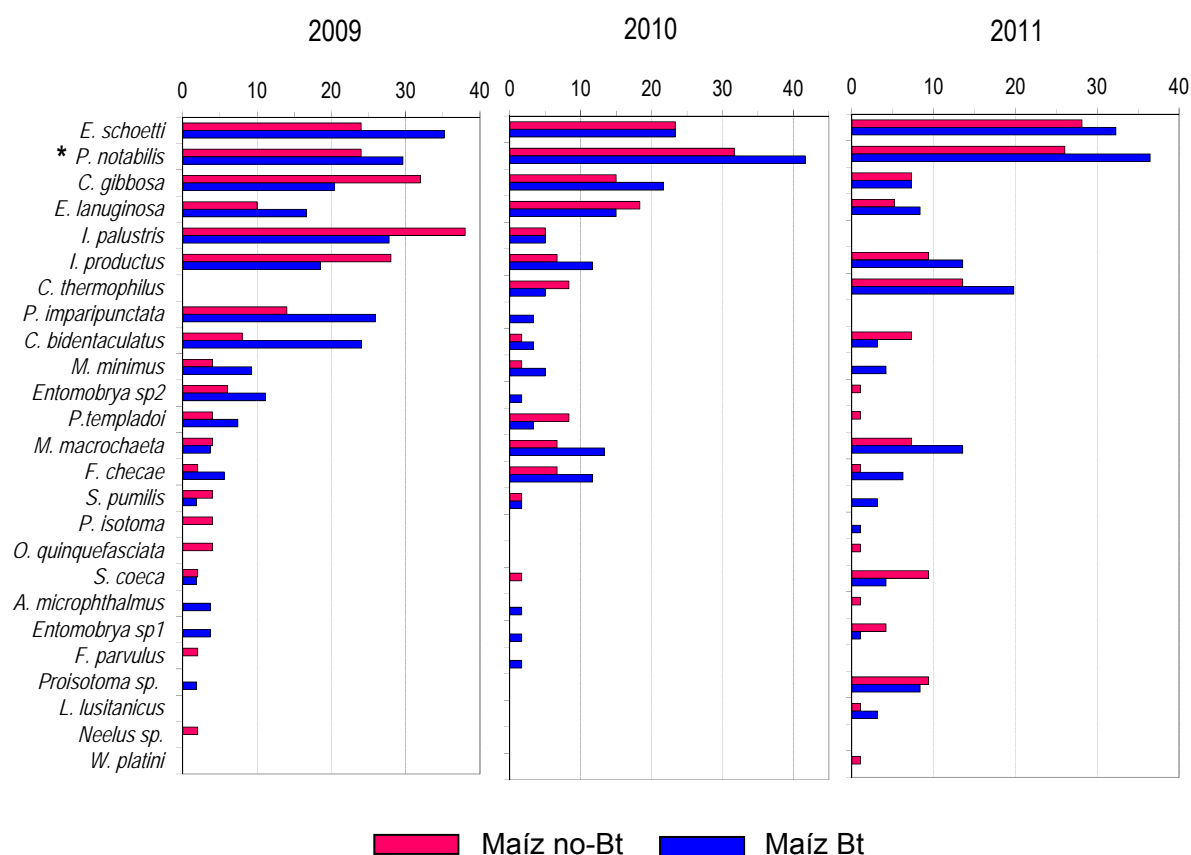


**Figura 2.20.** Abundancia (media  $\pm$  error estándar) de los colémbolos totales y de las especies *E. schoetti* y *E. notabilis* capturados por trampa a lo largo del año en parcelas de maíz Bt (—) y no-Bt (—). La línea discontinua marca el cultivo de maíz.

La riqueza de especies fue significativamente diferente entre años y entre tratamientos, siendo mayor en las parcelas de maíz Bt que en las no-Bt. Del mismo modo, la diversidad de especies calculada usando los índices de Simpson y Shannon mostró diferencias entre ambos tratamientos, con valores significativamente más altos en las parcelas de maíz Bt que en las no-Bt, mientras que no se detectaron diferencias entre años (**Tabla 2.9**).

En las siete especies de colémbolos más abundantes del estudio, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aparición entre años en todas las especies, pero solo para *P. notabilis* se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, siendo más frecuente en las parcelas de maíz Bt (Wald  $\chi^2 = 8,94$ ;  $p < 0,00$ ). En ningún caso la interacción año x tratamiento fue significativa (resultados del análisis no mostrados). De las siete especies, *P. notabilis*, *E. schoetti*, *C. gibbosa*, *I. productus* y *E.*

*lanuginosa* se capturaron siempre en ambos tratamientos en todos los años. La presencia de *I. palustris*, una de las especies más comunes en 2009 (apareció en el 28% y el 38% de las muestras de parcelas Bt y no-Bt, respectivamente) se redujo considerablemente en 2010 (un 5% en ambos tipos de parcelas), desapareciendo en 2011. El caso contrario ocurrió con *C. thermophilus*, la cual no se capturó en 2009, aumentando gradualmente su frecuencia de aparición en 2010 y 2011 en ambos tipos de maíz. La presencia del resto de las especies de colémbolos en muestras de suelo fue desigual dependiendo del año (Figura 2.21).



**Figura 2.21.** Frecuencia de aparición (%) en las muestras de suelo de las especies de colémbolos. \* indica diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) obtenidas en el análisis de EEG realizado en las siete primeras especies.

#### 2.3.4. Potencia estadística y diferencias detectables entre tratamientos

De los grupos más abundantes que se capturaron con las trampas amarillas durante los tres años de estudio, los que presentaron mejores características para detectar diferencias entre el maíz Bt y no-Bt (valores de  $dc$  inferiores al 50%) con una potencia fija del 0,8 fueron: la familia Cicadellidae, y dentro de ella *Z. scutellaris* y *Macrosteles* spp., la familia Mymaridae, y en concreto *Anagrus* spp. y la familia Chloropidae. En consecuencia, estos grupos tuvieron la potencia más alta para detectar diferencias del 25% y 50% en las abundancias en el maíz Bt con respecto al maíz no-Bt (exceptuando a *Macrosteles* spp., para el que la potencia para detectar una diferencia del 25% fue inferior a 0,8). En los análisis realizados cada año por separado la potencia que se obtuvo varió de un año a otro, aunque se aprecia una tendencia a disminuir con respecto a la obtenida en el análisis combinado en la mayoría de los grupos, a excepción de las familias Cicadellidae y Mymaridae, y dentro de ellas la especie *Z. scutellaris* y el género *Anagrus*, respectivamente. En estos grupos, se encontraron para cada año, valores de potencia para detectar diferencias del 50% similares a los obtenidos en el análisis en el que se combinaron los datos de los tres años. En el resto de los artrópodos analizados (*Empoasca* spp., *Gonatocerus* spp., delfácidos y tricogramátidos) se obtuvieron potencias inferiores al valor límite de 0,8 cuando se analizaron los datos en conjunto, siendo en general incluso menores cuando los datos se analizaron año a año (**Tabla 2.10**).

**Tabla 2.10.** En la parte izquierda de la tabla, potencia para detectar diferencias del 25% o 50% en el maíz Bt con respecto al maíz no-Bt y capacidad para detectar diferencias entre tratamientos (*dc*) expresada en porcentaje, fijando una potencia del 0,8, en la abundancia de artrópodos no-diana capturados con trampas amarillas durante los tres años de estudio (2009-2011). En la parte derecha de la tabla, potencia para detectar diferencias del 25% o 50% en maíz Bt con respecto al maíz no-Bt, calculada para cada año por separado, indicándose si la potencia aumenta (↑), disminuye (↓) o no cambia (=) con respecto al análisis combinado [para estas comparaciones se consideraron iguales diferencias de hasta 0,05 (5%)].

	2009-2010			2009		2010		2011	
	Potencia para detectar		<i>dc</i> (%)	Potencia para detectar		Potencia para detectar		Potencia para detectar	
	25%	50%		25%	50%	25%	50%	25%	50%
Hemiptera									
Cicadellidae	1	1	11	1 =	1 =	0,96 =	1 =	0,90 ↓	1 =
<i>Z. scutellaris</i>	1	1	11	0,99 =	1 =	0,81 ↓	1 =	0,81 ↓	1 =
<i>Empoasca</i> spp.	0,29	0,80	50	0,05 ↓	0,06 ↓	0,96 ↑	1 ↑	0,22 ↓	0,63 ↓
<i>Macrostelus</i> spp.	0,35	0,88	45	0,16 ↓	0,46 ↓	0,14 ↓	0,39 ↓	0,34 =	0,41 ↓
Delphacidae	0,19	0,58	65	0,08 ↓	0,18 ↓	0,09 ↓	0,19 ↓	0,20 =	0,60 =
Hymenoptera									
Mymaridae	1	1	14	0,81 ↓	1 =	1 =	1 =	0,81 ↓	1 =
<i>Anagrus</i> spp.	0,99	1	16	0,63 ↓	0,99 =	0,96 =	1 =	0,81 ↓	1 =
<i>Gonatocerus</i> spp.	0,20	0,61	63	0,63 ↑	0,99 ↑	0,12 ↓	0,33 ↓	0,07 ↓	0,14 ↓
Trichogrammatidae	0,07	0,14	158	0,24 ↑	0,68 ↑	0,06 =	0,07 ↓	0,06 =	0,07 ↓
Diptera									
Chloropidae	1	1	18	1 =	1 =	0,28 ↓	0,77 ↓	0,72 ↓	1 =
Thysanoptera									
	0,27	0,77	52	0,30 =	0,37 ↓	0,13 ↓	0,37 ↓	0,11 ↓	0,27 ↓

En el caso de las muestras de suelo, al analizar los datos de los tres años en conjunto, el total de ácaros y de colémbolos presentaron los valores de potencia más altos (0,8 o superiores) tanto para la detección de diferencias del 25% como del 50%. Dentro de los ácaros, en los subórdenes Oribatida, Actinedida y Gamasida se consiguieron detectar diferencias inferiores al 33%, con una potencia fija del 0,8. En cambio, en las siete especies de colémbolos más abundantes, el valor de obtenido *dc* nunca estuvo por debajo del 50%, lo que indica que ninguna de las especies de colémbolos analizadas por separado sería un buen grupo indicador. Sin embargo, cuando se analizaron los parámetros poblacionales de riqueza y diversidad (Simpson y Shannon) de especies de colémbolos, se obtuvieron valores de *dc* entre el 25 y 26%, con una potencia estadística

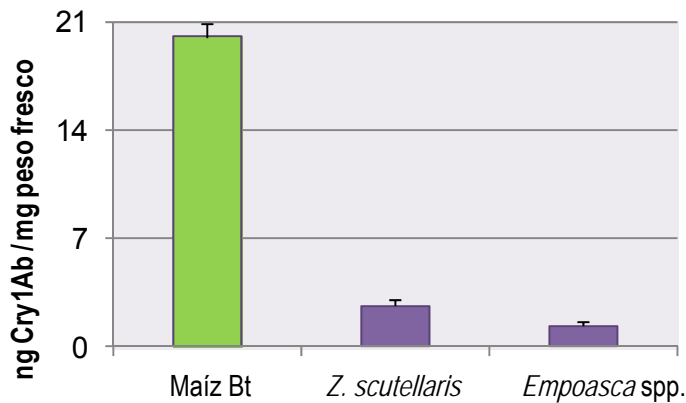
de 0,8. En general, cuando se comparó la potencia obtenida en los análisis año por año con respecto a los datos analizados de forma combinada, la potencia disminuyó al buscar diferencias del 25% en todos los taxones en alguno de los años. Sin embargo, en el conjunto de ácaros, y en concreto en los oribátidos y en el conjunto de colémbolos la potencia no varió al analizar diferencias del 50% entre el análisis con los datos combinados y los análisis de cada año por separado (**Tabla 2.11**).

**Tabla 2.11.** En la parte izquierda de la tabla, potencia para detectar diferencias del 25% o 50% en el maíz Bt con respecto al maíz no-Bt y capacidad para detectar diferencias entre tratamientos (*dc*) expresada en porcentaje, fijando una potencia del 0,8, en la abundancia, riqueza y diversidad de artrópodos no-diana capturados en las muestras de suelo durante los tres años de estudio (2009-2011). En la parte derecha de la tabla, potencia para detectar diferencias del 25% o 50% en maíz Bt con respecto al maíz no-Bt, calculada para cada año por separado, indicándose si la potencia aumenta (↑), disminuye (↓) o no cambia (=) con respecto al análisis combinado [para estas comparaciones se consideraron iguales diferencias de hasta 0,05 (5%)].

	2009-2011			2009		2010		2011	
	Potencia para detectar		<i>dc</i> (%)	Potencia para detectar		Potencia para detectar		Potencia para detectar	
	25%	50%		25%	50%	25%	50%	25%	50%
Abundancia									
Acari	1	1	10	1 =	1 =	1 =	1 =	0,90 ↓	1 =
Oribatida	0,99	1	17	0,97 =	1 =	0,80 ↓	1 =	0,54 ↓	0,98 =
Actinedida	0,90	1	22	0,90 =	1 =	0,43 ↓	0,94 ↓	0,63 ↓	1 =
Gamasida	0,45	0,96	32	0,33 ↑	0,85 ↓	0,29 ↑	0,80 ↓	0,33 ↑	0,85 ↓
Acaridida	0,11	0,29	101	0,11 =	0,29 =	0,11 =	0,29 =	0,06 =	0,08 ↓
Collembola	0,80	1	25	0,80 =	1 =	0,74 ↓	1 =	0,54 ↓	0,99 =
<i>E. schoetti</i>	0,24	0,70	56	0,23 =	0,68 =	0,07 ↓	0,12 ↓	0,17 ↓	0,52 ↓
<i>E. lanuginosa</i>	0,10	0,26	107	0,07 =	0,13 ↓	0,11 =	0,30 =	0,06 =	0,08 ↓
<i>P. notabilis</i>	0,22	0,67	59	0,08 ↓	0,19 ↓	0,21 =	0,63 =	0,26 ↑	0,74 =
<i>I. palustris</i>	0,21	0,63	61	0,31 ↑	0,82 ↑	0,06 ↓	0,09 ↓	-	-
<i>I. productus</i>	0,10	0,26	107	0,10 =	0,26 =	0,07 =	0,11 ↓	0,06 =	0,11 ↓
<i>C. thermophilus</i>	0,06	0,09	245	-	-	0,06 =	0,08 =	0,06 =	0,09 =
<i>C. gibbosa</i>	0,14	0,43	79	0,37 ↑	0,9 ↑	0,08 =	0,16 ↓	0,07 =	0,15 ↓
Riqueza de especies de colémbolos	0,8	1	25	0,94 ↑	1 =	0,40 ↓	0,92 ↓	0,50 ↓	0,97 =
Diversidad de especies de colémbolos									
Simpson	0,76	1	26	0,26 ↓	0,74 ↓	0,18 ↓	0,54 ↓	0,26 ↓	0,74 ↓
Shannon	0,76	1	26	0,26 ↓	0,74 ↓	0,19 ↓	0,56 ↓	0,29 ↓	0,80 ↓

### 2.3.5. Exposición de los artrópodos no-diana a la toxina Cry1Ab

De los grupos de insectos recogidos de la parte aérea de plantas de maíz Bt al inicio del cultivo, sólo se ha detectado la toxina Cry1Ab en los cicadélidos *Z. scutellaris* y *Empoasca* spp. habiéndose obtenido valores de  $2,63 \pm 0,46$  y  $1,38 \pm 0,23$  ng Cry1Ab/mg de peso fresco, respectivamente, que se corresponden con el 13% y 7% de la toxina presente en la hoja de maíz Bt (**Figura 2.22**). En cambio, en las muestras de *Macrosteles* spp., delfácidos y clorópidos recogidos sobre maíz Bt no se detectó la toxina. En ningún caso los insectos procedentes del maíz no-Bt y las hojas de maíz isogénico exhibieron valores por encima del LOD.



**Figura 2.22.** Niveles de toxina Cry1Ab (media  $\pm$  error estándar) en hojas de plantas de maíz Bt en V7 y en individuos de *Z. scutellaris* y *Empoasca* spp. recogidos en parcelas de maíz Bt.

En el caso de los colémbolos del género *Entomobrya* spp. recogidos de las mazorcas de la plantas de maíz Bt al final del cultivo (**Figura 2.23**), la toxina se detectó en las tres muestras analizadas ( $0,136 \pm 0,006$  ng/mg de colémbolo). Por el contrario, no se detectó en los colémbolos capturados en plantas de maíz no-Bt.



**Figura 2.23.** Colémbolo del género *Entomobrya* capturado en una mazorca de maíz.

### 2.3.6. Detección de la toxina Cry1Ab en la rizosfera y evaluación de su actividad insecticida

La toxina Cry1Ab se detectó en las muestras de MO de la rizosfera procedente de la parcela de maíz Bt a los 36, 78 y 99 días tras la cosecha, con valores que oscilaron entre 0,10 y 0,18 ng de Cry1Ab/mg de MO. Por el contrario, la toxina no se detectó en la MO de la rizosfera de la parcela no-Bt, ni en ninguna de las muestras de la fracción RS de la cual se extrajo la MO, ya procediera de la parcela de maíz Bt o de la no-Bt (**Tabla 2.12**). Es importante señalar que la MO representó de media el  $0,22 \pm 0,03\%$  y el  $0,22 \pm 0,06\%$  del peso seco de RS en las muestras de suelo Bt y no-Bt, respectivamente.

Por otro lado, se evaluó la actividad insecticida de la toxina Cry1Ab extraída de la MO de la parcela de maíz Bt en larvas neonatas de *O. nubilalis* usando una concentración de 1,1 ng/cm<sup>2</sup>. La mortalidad de las larvas después de siete días fue de 12,8% (mortalidad corregida con respecto al testigo), la cual resultó significativamente diferente de la mortalidad esperada a esta concentración (49,5%), calculada a partir del bioensayo con la toxina Cry1Ab purificada ( $\chi^2$  de Pearson = 52,  $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.12.** Concentración de toxina Cry1Ab en muestras de rizosfera procedentes de parcelas con maíz Bt y no-Bt después de la cosecha.

Días después de la cosecha	Tipo de maíz (nº de muestras)	Cry1Ab en RS <sup>a</sup> (ng Cry1Ab/mg RS)	Cry1Ab en MO <sup>b</sup> (ng Cry1Ab/mg MO)	% MO en RS <sup>a</sup>
36	Bt (2)	n.d.	0,11 ± 0,01	0,20 ± 0,02
	No-Bt (1)	n.d.	n.d.	0,31
78	Bt (2)	n.d.	0,18 ± 0,02	0,27 ± 0,04
	No-Bt (1)	n.d.	n.d.	0,24
99	Bt (2)	n.d.	0,10 ± 0,01	0,19 ± 0,01
	No-Bt (1)	n.d.	n.d.	0,10

<sup>a</sup> RS: rizosfera < 0,84 mm.

<sup>b</sup> MO: materia orgánica recuperada del suelo de la rizosfera después de descartar las fracciones >0,84 y <0,20 mm.  
n.d.: < LOD

## 2.4. DISCUSIÓN

La amplia aceptación del maíz Bt en España ha generado una gran preocupación sobre su posible impacto ambiental, especialmente en regiones con una alta tasa de adopción del cultivo. El cultivo de maíz (incluyendo maíz Bt) en el mismo campo durante varios años consecutivos es una práctica común en España, habiéndose registrado por ejemplo, entre los años 2009 y 2011, la siembra de maíz durante al menos dos años consecutivos en más del 50% de la superficie cultivada (MAGRAMA, 2015d). Además, España alberga más del 90% de la superficie sembrada de la UE, por lo que los campos de maíz españoles se pueden considerar un contexto adecuado para estudiar los efectos de este cultivo sobre la fauna no-diana en condiciones climáticas mediterráneas. A pesar de la abundante información acumulada en los diferentes trabajos de campo llevados a cabo en España, aún existen interrogantes acerca de los posibles efectos del cultivo del maíz MON810 sobre los microartrópodos que habitan en el suelo y sobre determinados artrópodos que se encuentran en la parte aérea de la planta. Por ello, el presente capítulo se ha centrado en ambas comunidades, pasándose a discutir a continuación los principales resultados obtenidos para cada una de ellas.

### 2.4.1. Efectos del maíz Bt sobre los artrópodos de la parte aérea de la planta

En este estudio se demuestra por primera vez la exposición, en condiciones de campo, de dos cicadélidos, *Z. scutellaris* y *Empoasca spp.*, a la proteína Cry1Ab que expresa el maíz MON810, mostrando valores del 13% y 7%, respectivamente, de la cantidad de toxina encontrada en hojas de maíz. La adquisición de la toxina por parte de estas especies, podría, además, dar lugar a su transferencia a niveles superiores de la cadena trófica, ya que estos insectos son presas de depredadores generalistas como arañas y carábidos, tal y como se ha descrito en el caso de *Z. scutellaris* (Albajes *et al.*, 2011; Lundgren *et al.*, 2009). Sin embargo, no se han encontrado diferencias en las abundancias de estas dos especies entre campos de maíz Bt y no-Bt, lo que hace pensar que la proteína no es tóxica para ellas. La exposición de cicadélidos a otras toxinas Cry presentes en plantas Bt ya había sido anteriormente descrita. Por ejemplo, Meissle y Romeis (2009) estudiaron el paso de la toxina Cry3Bb1 de plantas de maíz a *Z. scutellaris* y *Empoasca pteridis* Goethe (Hemiptera: Cicadellidae), encontrando 1,2 y 0,8 ng Cry3Bb1/mg de peso seco, respectivamente, que representó un 0,5% y 0,3% de la toxina presente en la planta. En ninfas de *Cicadella viridis* L. (Hemiptera: Cicadellidae) recogidas en campos de soja Bt, en las que se detectó 1,3 ng Cry1Ac/mg de peso seco, correspondiente al 3,5% de la toxina presente en la planta (Yu *et al.*, 2014). Por el

contrario, no se ha detectado la toxina en *Macrosteles* spp. y en los delfácidos. Estas diferencias en la exposición de los Auchenorrhyncha podrían estar relacionadas con los diferentes sitios de alimentación que presentan (Nickel, 2003). Los cicadélidos *Z. scutellaris* y *Empoasca* spp. pertenecen a la subfamilia Typhlocybinae, que se caracteriza por alimentarse de las células del mesófilo (Tonky y Whitcomb, 1987), donde la toxina se expresa en concentraciones elevadas (Abel y Adamczyk, 2004). Por el contrario, *Macrosteles* spp. está especializado en el tejido vascular, donde la toxina Cry1Ab no se expresa (Rauschen *et al.*, 2010b; Raps *et al.*, 2001). En el caso de los delfácidos el hecho de no detectar la toxina podría igualmente estar relacionado con el sitio de inserción del estilete. No obstante, la muestra que se analizó de esta familia estaba formada por una mezcla de individuos de diferentes especies que podrían tener distintos tipos de alimentación, por lo que sería necesario realizar un estudio específico para aclarar este resultado. También se analizó la presencia de la toxina Cry1Ab en adultos de la familia Chloropidae, los cuales se han descrito como detritívoros (Albajes *et al.*, 2013), aunque no fue detectada. Este resultado contrasta con el obtenido por Meissle y Romeis (2009), que demostraron el paso de la toxina Cry3Bb1 desde la planta a adultos de la especie *Oscinella frit* (Diptera: Chloropidae), plaga del maíz. Esta discrepancia podría deberse también a que las muestras analizadas estaban formadas por un conjunto de especies que sólo se pudieron identificar taxonómicamente hasta nivel de familia, por lo que sería necesario confirmar estos resultados con un estudio específico.

La comunidad de artrópodos de la parte aérea de la planta capturada a lo largo de los tres años de estudio con las trampas adhesivas fue muy diversa, tanto desde un punto de vista sistemático, como por su función ecológica. Las capturas estuvieron principalmente compuestas por artrópodos fitófagos y parasitoides y, en menor medida, por detritívoros y depredadores. Sin embargo, solo unos pocos grupos se capturaron en densidades lo suficientemente altas como para poder estudiar el efecto del maíz Bt sobre diferentes parámetros poblacionales. No se han encontrado efectos negativos del cultivo del maíz Bt en la abundancia de los herbívoros (cicadélidos, delfácidos y trips), parasitoides (mimáridos y tricogramátidos) y detritívoros (clorópidos). Un examen de la dinámica de estos grupos mostró patrones similares de abundancia en los campos de maíz Bt y no-Bt a lo largo de todo el cultivo, con algunas diferencias puntuales que no fueron consistentes. Los resultados obtenidos se corresponden con los descritos en otros trabajos en estos grupos de artrópodos, a pesar de haberse realizado con distintas metodologías, otros cultivos transgénicos y en otras condiciones agroclimáticas

(Habuřtová *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2006; Eckert *et al.*, 2006; Daly y Buntin, 2005; Dively, 2005).

De forma específica, tampoco se encontraron cambios en las abundancias de los géneros o especies más abundantes de cicadélidos (*Z. scutellaris*, *Empoasca* spp. y *Macrosteles* spp.) y mimáridos (*Anagrus* spp. y *Gonatocerus* spp.). La falta de efectos del maíz Bt en *Z. scutellaris* ya había sido descrita por Rauschen *et al.* (2010, 2008b, 2004) en estudios realizados en campos de Alemania de maíz MON810 y MON88017 y por Pons *et al.* (2005) en un campo de maíz Bt176 situado en Lleida (España). Sin embargo, hay que señalar que en este último estudio se observó que el número de ninfas maduras de *Z. scutellaris* fue mayor en campos de maíz Bt, barajándose la posibilidad de que cambios derivados por la modificación genética del maíz Bt podrían ser los responsables de este aumento diferencial de la abundancia. En este sentido, Faria *et al.* (2007), observaron que diferencias en el contenido y la composición de aminoácidos entre las líneas de maíz Bt y no-Bt ensayadas pudieron ser las responsables de un aumento de las abundancias del pulgón *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) al ser alimentado con maíz Bt (Bt11, Bt176 y MON810). Es interesante destacar que el cicadélido *Z. scutellaris* tiene una asociación específica con este cultivo, ya que se alimenta principalmente de maíz cuando está presente (Nickel *et al.*, 2003). *Zyginidia scutellaris* ha sido citada en este agroecosistema en diferentes partes de Europa (Schuch *et al.*, 2012; Candolfi *et al.*, 2004; Kiss *et al.*, 2002), además de ser la especie de cicadélido más común encontrada en maizales españoles en otros trabajos (Albajes *et al.*, 2009; Pons *et al.*, 2005). Los cicadélidos son sensibles a los cambios en la estructura de la vegetación, estando su ciclo de vida estrechamente relacionada con el ciclo de sus plantas huésped. Concretamente *Z. scutellaris* pasa el invierno principalmente en fase adulta, usando como refugio diferentes especies de gramíneas situadas en prados, bordes de caminos o campos abandonados (Nickel, 2003). En nuestro estudio esta especie estuvo presente en los dos tipos de maíz durante todo el tiempo que duró el cultivo, identificándose en ambos casos dos picos de abundancias de adultos, uno al comienzo de la campaña y otro un mes después. El número de capturas varió significativamente entre los años de estudio, hecho que parece estar influenciado por las lluvias del invierno anterior. En concreto, en el invierno de 2009 a 2010 las precipitaciones fueron significativamente más abundantes que las habituales en la zona. Este hecho pudo favorecer la presencia de vegetación silvestre circundante al lado de los campos de maíz albergando un mayor número de individuos de *Z. scutellaris*., que posteriormente colonizaron el maíz tras su siembra,

dando lugar al mayor pico de abundancia de todo el estudio. El resto de las especies de Auchenorrhyncha estudiadas (cicadélidos de los géneros *Empoasca* y *Macrostelus*, y delfácidos) se consideran "especies accidentales", es decir, habitualmente se localizan fuera de los cultivos, en las hierbas o pastos circundantes, aunque ocasionalmente pueden acceder a los campos de maíz mientras buscan un huésped adecuado (Rauschen, 2008a; Nickel, 2003; Kiss *et al.*, 2002). Pueden alimentarse del maíz pero de forma limitada, ya que este huésped no es compatible con el mantenimiento de grandes poblaciones de estos grupos (Nickel *et al.*, 2003), lo que explicaría las menores densidades observadas, tanto en maíz Bt como no-Bt.

Dentro de los enemigos naturales capturados, los himenópteros parasitoides pertenecientes a la familia Mymaridae fueron los más abundantes. Los mimáridos estuvieron compuestos en su gran mayoría por especímenes del género *Anagrus*, el cual se ha utilizado ampliamente como un agente de control biológico contra plagas de importancia económica debido a su carácter cosmopolita (Hesami *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 1996). En España, este parasitoide se ha relacionado con el cultivo de maíz, destacando a *Z. scutellaris* como uno de sus principales huéspedes (Baquero, 1997). Al contrastar las dinámicas de *Z. scutellaris* y *Anagrus* se observó que en los tres años de estudio, el segundo pico de abundancias de adultos de *Z. scutellaris* fue seguido por la aparición de grandes densidades de *Anagrus*. Al analizar la distribución vertical a lo largo de la planta de maíz, *Z. scutellaris* y *Anagrus* se comportaron de manera diferente. Mientras *Z. scutellaris* se fue desplazando hacia la parte superior de la planta a medida que esta fue creciendo, el parasitoide fue capturado principalmente en las trampas situadas más próximas al suelo durante toda la campaña. Este comportamiento de *Z. scutellaris* podría estar relacionado con el aprovechamiento de las hojas más verdes de la parte superior del maíz, o para facilitar su dispersión en el cultivo, ya que el vuelo se ve dificultado por las grandes densidades de vegetación (Rauschen *et al.*, 2008b). Igualmente, se ha observado en la especie *Empoasca vitis* Goethe (Hemiptera: Cicadellidae) una primera generación próxima al suelo, mientras que la segunda se desplaza hacia las partes superiores de la planta (Lehmann *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos a este respecto (captura de distintas densidades de insectos en función de la altura de la trampa) indican que es necesario tener un buen conocimiento de la biología de los grupos de interés para poder planificar un diseño adecuado del muestreo.

#### 2.4.2. Efectos del maíz Bt sobre los microartrópodos edáficos

El impacto potencial que puede tener el maíz Bt sobre los microartrópodos edáficos depende, al menos en parte, de la persistencia de la toxina y de su actividad insecticida en el suelo. En este trabajo se ha detectado la toxina Cry1Ab que expresa el maíz MON810 en la materia orgánica parcialmente degradada (MO) extraída de la rizosfera, hasta tres meses después de la cosecha. La persistencia de la toxina Cry1Ab en los residuos vegetales en descomposición procedentes del cultivo de maíz Bt también se ha citado en otros trabajos llevados a cabo en diferentes condiciones agronómicas (Baumgarte y Tebbe, 2005; Muchaonyerwa *et al.*, 2004; Hopkins y Gregorich, 2003; Zwahlen *et al.*, 2003). Sin embargo, en otros casos se ha demostrado que la cantidad de toxina Cry1Ab que incorporan los residuos de maíz Bt al suelo disminuye drásticamente durante el período posterior a la cosecha (Zurbrügg *et al.*, 2010; Daudu *et al.*, 2009). Se ha sugerido que un factor que podría influir en esta degradación es la temperatura, muy probablemente debido a la correlación que tiene con la actividad microbiana del suelo (Zurbrügg *et al.*, 2010). En nuestro estudio, al analizar la cantidad de toxina en la MO en tres periodos diferentes (36, 78 y 99 días después de la cosecha), no se encontró que existiera una tendencia decreciente a lo largo del tiempo, indicando que la exposición de los organismos detritívoros del suelo podría ser persistente, incluso en regiones con elevadas temperaturas en determinados momentos del año, como sucede en el sur de Europa. El mantenimiento del nivel de toxina Cry1Ab durante en el período de tiempo analizado es un resultado previsible, ya que la fracción de MO analizada procedía de la rizosfera, por lo que principalmente contendrá restos parcialmente degradados de la raíz, que es la parte de la planta que más tiempo tarda en descomponerse (Amín *et al.*, 2014). Además, cuando se probó la actividad insecticida de la toxina Cry1Ab extraída de la MO en larvas neonatas de la especie susceptible *O. nubilalis*, la mortalidad obtenida después de 7 días de exposición (12,8%) fue menor que la mortalidad esperada (49,5%) de acuerdo con la obtenida en un bioensayo con toxina Cry1Ab purificada. Lutz *et al.* (2005) demostraron que el anticuerpo del kit de ELISA utilizado en este trabajo reacciona con fragmentos de la proteína Cry1Ab de hasta 17 kDa, siendo el tamaño de la toxina activa de  $\approx 70$  kDa. Por lo tanto, la reducción de la toxicidad observada en la toxina extraída de la MO podría ser debida a que el kit ELISA está cuantificando tanto la proteína activa como los productos parcialmente degradados que han perdido su actividad insecticida. Esto podría haber dado lugar a una sobreestimación de la concentración de la toxina activa en la MO utilizada en el bioensayo. Zurbrügg *et al.* (2010) también demostraron en un estudio de campo con *litterbags* (bolsas de hojarasca), que a pesar de que la toxina

Cry1Ab fuera detectada en los residuos de hojas de maíz Bt hasta 8 meses después de la cosecha, la toxicidad se perdía a los 4 meses. En definitiva, de nuestros resultados se puede concluir que la toxina Cry1Ab expresada en el maíz MON810 se incorpora al suelo y puede persistir en la MO durante meses.

Uno de los factores que parece determinante a la hora de cuantificar la toxina en el suelo es la fracción analizada. Distintos estudios han cuantificado con éxito la toxina Cry1Ab en las fracciones de suelo con un tamaño de partícula  $>2$  mm, probablemente porque contenían fragmentos vegetales relativamente grandes de las plantas de maíz Bt, mientras que solo se han detectado trazas de la toxina en las fracciones de suelo  $<2$  mm, en las cuales los residuos vegetales están más fragmentados (Gruber *et al.*, 2012; Hopkins y Gregorich, 2003). Los microartrópodos edáficos estudiados en este trabajo pertenecen al grupo de la mesofauna que tiene un tamaño entre los 0,2 y 2 mm (Coleman *et al.*, 2004). Debido a su tamaño, estos organismos detritívoros podrían ingerir la toxina Cry1Ab principalmente al alimentarse de los residuos vegetales más fragmentados. Por ello, el objetivo de este trabajo fue cuantificar la toxina Cry1Ab en la fracción  $<0,84$  mm de la rizosfera. No hemos podido detectar la toxina Cry1Ab en las muestras de la fracción  $<0,84$  mm (RS) de las parcelas de maíz Bt, habiendo sido necesaria la extracción de la materia orgánica parcialmente degradada (fragmentos de MO comprendidos entre 0,84 y 0,2 mm) para detectarla. Esta discrepancia en la cuantificación de la toxina Cry1Ab entre la MO y RS podría explicarse por el hecho de que la MO representó de media el 0,22% del peso seco de RS. Conociendo este porcentaje, hemos estimado la cantidad de toxina que habría en RS obteniendo unos valores de entre 0,18 y 0,48 ng Cry1Ab/g RS, que estarían por debajo de la cantidad mínima de toxina necesaria en RS para que pudiera haber sido detectada en el ELISA con la metodología empleada (0,85 ng Cry1Ab/g RS). Otro factor que podría haber dificultado la cuantificación de la toxina en RS es la posible unión de la toxina Cry1Ab liberada en el suelo a minerales de arcilla y ácidos húmicos, impidiendo su extracción. Gruber *et al.* (2012) describieron una fuerte correlación entre la recuperación de la proteína Cry1Ab de los suelos a los que se había añadido cantidades conocidas de dicha proteína y su contenido en arcilla. A la vista de nuestros resultados, proponemos un método sencillo para la detección de toxina Cry1Ab en el suelo, a partir de la concentración de los fragmentos parcialmente degradados de MO comprendidos entre 0,84 y 0,2 mm presentes en la rizosfera, que permite estandarizar la cuantificación de la toxina en esta fracción.

En este estudio se demuestra por primera vez que los colémbolos están expuestos a la toxina Cry1Ab de plantas de maíz Bt en el campo. Hasta el momento no había estudios de detección de toxinas Cry en los microartrópodos edáficos, probablemente debido a la dificultad para obtener un gran número de especímenes vivos de la misma especie, unido a que deben ser rápidamente identificados y congelados para evitar la metabolización y/o secreción de la toxina. Los colémbolos analizados pertenecen al género *Entomobrya*, el más abundante encontrado en las muestras de suelo, aunque se recogieron sobre las plantas de maíz aprovechando que estaban en grandes cantidades en las mazorcas al final del cultivo. Las especies de este género presentan hábitos saprófagos y fungívoros, por lo que su presencia en las plantas de maíz senescentes puede ser debida a una búsqueda de materia orgánica en descomposición y hongos acumulados en la etapa final del cultivo o para evitar condiciones ambientales adversas (Frampton *et al.*, 2001). Los colémbolos, y específicamente *Entomobrya* spp., parecen ser una importante fuente de alimento para las arañas que habitan en la planta (Peterson *et al.*, 2010; McNabb *et al.*, 2001) y para depredadores epigeos generalistas, como los carábidos (Bilde *et al.*, 2000), por lo que este colémbolo podría actuar como un vehículo para trasladar la toxina a otros niveles tróficos. De hecho, la toxina se ha detectado en depredadores capturados en la superficie edáfica como el carábido *Poecilus cupreus* (Álvarez-Alfageme, *et al.*, 2009) y en la araña epígea *Pardosa occidentalis* (datos no publicados) recogidos en campos de maíz Bt en el centro de España. No podemos concluir si la exposición a la toxina de este grupo tiene lugar mientras están en el suelo, cuando sube a la planta de maíz o en ambas situaciones, pero en cualquier caso su papel en la cadena trófica y la posibilidad de ocupar diferentes nichos espaciales podría suponer el paso de la toxina.

No se han encontrado efectos negativos en la comunidad de microartrópodos del suelo tras tres años de cultivo de maíz Bt. El examen de las dinámicas de ácaros y colémbolos mostró que los patrones de abundancia fueron muy similares dentro de cada año en los dos tratamientos, maíz Bt y no-Bt, con la excepción de *P. notabilis* que fue más abundante en el maíz Bt. Sin embargo, diferencias significativas en la abundancia entre los años de estudio fueron comunes dentro de los subórdenes de ácaros y en las especies colémbolos, lo que indica que los factores abióticos podrían ser los responsables de esta variación, independientemente del tipo de maíz cultivado. Del mismo modo, la composición de especies de colémbolos entre las muestras fluctuó de un año a otro, pero la frecuencia de aparición fue la misma en los campos de Bt y no-Bt, excepto para *P. notabilis*. Bitzer *et al.* (2005) encontraron que esta *P. notabilis* fue más abundante en el maíz Bt que expresaba la toxina Cry3Bb1, aunque solo en una de las

fechas de muestreo. Este incremento en el maíz Bt podría ser debido a la presencia de una mayor cantidad de biomasa, ya que se ha visto que este factor puede ser determinante para ciertas especies hemi-epiedáficas de colémbolos (Debeljak *et al.*, 2007). Nuestros resultados también indican que la exposición a la toxina por diferentes vías (exudación radicular, material vegetal en descomposición, etc.) no afecta a la abundancia de las especies que viven a diferentes profundidades en el suelo, ya que entre las especies más abundantes encontradas, hubo especies asociadas a distintos nichos espaciales dentro del perfil edáfico (especies epiedáficas, hemiedáficas y euedáficas). En el caso de las dos especies predominantes, *E. schoetti* y *P. notabilis*, han sido descritas en diferentes niveles de suelo, siendo la primera epiedáfica y la segunda hemiedáfica (Álvarez *et al.*, 2001). Un trabajo de campo llevado a cabo en las mismas parcelas experimentales utilizadas en nuestro estudio, mostró que el cultivo de maíz Bt durante un período de cuatro años (2008-2011) no afectó a la comunidad de rizobacterias (Barriuso *et al.*, 2012), lo cual también apoyaría que los ácaros y colémbolos que se alimentan de ellas no se vean afectados.

En general, los resultados sugieren que las diferencias en la abundancia encontradas en los grupos estudiados son debidas a factores estacionales o ambientales. Algunos experimentos de campo llevados a cabo en diferentes condiciones agroecológicas han llegado a la conclusión de que los efectos del maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab en los microartrópodos fueron comparables a los efectos producidos por otras prácticas agrícolas comunes, tales como tratamientos insecticidas o el uso de diferentes variedades de maíz no-Bt (Cortet *et al.*, 2007; Candolfi *et al.*, 2004). De igual modo, en un ensayo de campo realizado durante dos años en un cultivo de maíz que expresaba la toxina Cry3Bb1 tan solo se detectaron pequeñas diferencias en la abundancia de algunas especies de colémbolos con respecto a la línea isogénica (Bitzer *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos estudios han revelado que la degradación de esta proteína en el suelo es más rápida que la de la toxina Cry1Ab, por lo que el nivel de exposición de los organismos del suelo a Cry3Bb1 probablemente sea bajo y transitorio (Xue *et al.*, 2014; Zurbrügg *et al.*, 2010). Por otra parte, se han realizado estudios de laboratorio con los colémbolos *Folsomia candida* y *Xenylla grisea*, los cuales no se vieron afectados negativamente al ser alimentados con dieta tratada con diferentes toxinas Cry purificadas (Sims y Martin, 1997). Tampoco disminuyó la supervivencia de *F. candida* tras alimentarse con hojas de maíz Bt que expresan Cry1Ab, aunque en este caso sí se encontraron diferencias en parámetros nutricionales (Clark y Coats, 2006).

Al analizar la riqueza y la diversidad de las especies de colémbolos en los dos tipos de maíz se encontró que los valores de ambos índices fueron mayores en las parcelas de maíz Bt. Nuestros resultados podrían explicarse bajo diferentes escenarios. En primer lugar, algunos estudios han demostrado que el maíz Bt contiene mayor concentración de lignina que sus líneas isogénicas (Flores *et al.*, 2005; Poerchmann *et al.*, 2004; Saxena y Stotzky, 2001b), hecho que se ha relacionado con una mayor resistencia del maíz Bt a la descomposición en comparación con el maíz no-Bt (Stotzky, 2004). Este hecho podría contribuir a la acumulación de materia orgánica en la capa superficial del suelo, mejorando de este modo la estructura del suelo al reducirse la erosión, pudiendo impulsar la creación de un mayor número de microambientes que podrían ser explotados por diferentes especies. Sin embargo, otros estudios de campo utilizando diferentes metodologías han concluido que la tasa de descomposición del maíz Bt y no-Bt es la misma (Lehman *et al.*, 2010; Daudu *et al.*, 2009). Por lo tanto, las diferencias en la velocidad de degradación entre el maíz Bt y su correspondiente línea isogénica aún no están claras. El aumento de diversidad podría ser también una consecuencia de posibles impactos del maíz Bt sobre otras comunidades involucradas en la cadena trófica de los colémbolos, como los depredadores (Bitzer *et al.*, 2005; Dively, 2005). Por ejemplo, se ha observado en varios trabajos llevados a cabo en el centro de España que en algunos años se produce una disminución del número de estafilínidos, depredadores potenciales de microartrópodos del suelo, en el cultivo de maíz Bt (de la Poza *et al.*, 2005; Farinós *et al.*, 2008). En cualquier caso, serían necesarias más investigaciones en condiciones controladas para explorar las posibles alteraciones en los vínculos tróficos debido al cultivo de maíz Bt.

#### **2.4.3. Selección de artrópodos no-diana para la evaluación de riesgo ambiental del maíz Bt**

A la hora de realizar una evaluación de riesgo medioambiental de una planta GM no es posible estudiar los efectos sobre todas las especies presentes en un agroecosistema, por lo que es importante la identificación de especies indicadoras, las cuales actuarían como representativas de una comunidad o de un grupo funcional de artrópodos determinado. Además, es importante adaptar este tipo de evaluaciones a la zona de estudio y a las especies no-diana presentes en el agroecosistema en concreto para poder llegar a conclusiones fiables (Andow y Hilbeck, 2004). Existen diversos criterios a tener en cuenta para esta selección, como su función ecológica (por ejemplo, herbívoros,

depredadores, parasitoides, descomponedores), distribución geográfica, la facilidad para ser detectada e identificada, su importancia desde un punto de vista antropocéntrico, así como la exposición a la toxina en campo (Romeis *et al.*, 2008, Todd *et al.*, 2008). Además, mediante el cálculo de la potencia de los análisis estadísticos llevados a cabo para detectar diferencias, se puede determinar de una forma cuantitativa la capacidad de cada taxón para detectar pequeñas variaciones entre tratamientos, medida que puede ser utilizada para orientar la selección de estas especies indicadoras. De este modo, se ha establecido que un determinado taxón es adecuado para evaluar las diferencias entre plantas GM y convencionales si el análisis estadístico correspondiente presenta un valor mínimo de la potencia de 0,8 (EFSA, 2010b; Perry *et al.*, 2003).

Bajo esta premisa, con la mayoría de los artrópodos capturados con trampas amarillas se pudieron detectar diferencias del 50% entre el maíz Bt y no-Bt, pero solo los grupos más abundantes permitieron distinguir diferencias del 25%. De entre los herbívoros, a nivel específico únicamente *Z. scutellaris* mostró una potencia superior a 0,8 para detectar una variación del 25% entre tratamientos, lo que la convertiría en una candidata idónea para ser seleccionada como indicadora en evaluaciones de riesgo del maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab en el área mediterránea. Varios trabajos ya habían propuesto a este cicadélido como especie representativa debido a sus características (especie abundante en el maíz, cosmopolita, fácilmente detectable, etc.) (Albajes *et al.*, 2013; Rauschen, 2008a) y los resultados de la potencia obtenidos en esta Tesis confirman su idoneidad. Además, en este trabajo se demuestra que *Z. scutellaris* está expuesta a cantidades considerables de toxina Cry1Ab en campos MON810 y que es el único cicadélido presente a lo largo de toda la etapa de crecimiento del maíz en el área de estudio, factores que contribuyen a aumentar su relevancia. Su número de capturas varió entre años, lo cual parece ocurrir en respuesta a las condiciones climáticas u otros factores abióticos, pero a pesar de estas diferencias siempre se capturó en altas densidades, principalmente al comienzo de la campaña. Otro grupo que también presentó una potencia superior a 0,8 para detectar diferencias del 25% en las trampas adhesivas fue la familia Mymaridae, destacando entre ellos el género *Anagrus* por su relación trófica con *Z. scutellaris*. En general, los mimáridos tienen una reducida gama de huéspedes, siendo principalmente parasitoides de huevos de cicadélidos y delfácidos (Gauld y Bolton, 1988). Este hecho, unido a la estrecha conexión existente entre dichos herbívoros y el maíz, hace que la familia Mymaridae sea más relevante que otros representantes del grupo Chalcidoidea a la hora de detectar posibles efectos indirectos del maíz Bt en sus abundancias (Albajes *et al.*, 2013). Nuestro trabajo supone una aportación al

conocimiento de uno de los grupos funcionales (parasitoides) que se consideran necesarios en la evaluación de los efectos de las plantas GM sobre artrópodos no-diana (EFSA, 2010a). La familia Chloropidae también parece ser un grupo apropiado para la detección de efectos del maíz Bt dentro de los artrópodos presentes en la parte aérea de la planta, a tenor de los resultados de la potencia obtenidos. Sin embargo, su exposición a la toxina Cry1Ab no se ha demostrado y su relación trófica con el maíz está poco estudiada, por lo que serían necesarios estudios más específicos sobre este grupo.

Dentro de los microartrópodos edáficos, a través del estudio de las abundancias de los colémbolos sería posible detectar los efectos potenciales de las plantas de maíz Bt, pudiéndose considerar en conjunto un grupo adecuado dentro de la fauna del suelo para ser utilizado como indicadores. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Albajes *et al.* (2013), quienes, utilizando trampas de caída, determinaron que este grupo no era un taxón adecuado para representar a los descomponedores edáficos. La discordancia entre ambos resultados se podría deber a los diferentes métodos de captura empleados en los distintos estudios. Además, al evaluar la presencia de toxina en ejemplares del género *Entomobrya* se pudo detectar por primera vez la presencia de la toxina Cry1Ab en ejemplares de campo. Al analizar los resultados obtenidos para cada especie de colémbolo por separado se vio que ninguna de ellas mostraba valores que permitieran considerarlas individualmente como especies indicadoras válidas de posibles efectos de las plantas GM. Esto podría deberse a la distribución en agregados que presenta esta comunidad, que provocaría una gran variabilidad en la abundancia de cada especie entre muestras (Detsis, 2009). En cambio, los índices de riqueza y diversidad se ven menos afectados por esta alta variabilidad entre muestras, siendo más adecuados para detectar diferencias. En función de lo expuesto, consideramos que la utilización de los valores de abundancia total de colémbolos o de sus índices de riqueza y diversidad, brindarían resultados más fiables a la hora de realizar estudios destinados a evaluar efectos de las plantas GM sobre estos microartrópodos de suelo. También la comunidad de ácaros, y en concreto los subórdenes Oribatida, Actinedida y Gamasida, se encontraron entre los organismos con mayor fiabilidad para ser utilizados como indicadores, debido a que presentaron una alta capacidad para detectar diferencias. Sin embargo, debemos tener en cuenta que existen otros criterios, como la posibilidad de estar expuestos a la toxina, que deben ser tenidos en cuenta a la hora de elegir los organismos indicadores de efectos de las plantas GM sobre la fauna no-diana. En este sentido, se desconoce la exposición de los ácaros del suelo a la toxina debido a las dificultades para cuantificarla en los microartrópodos edáficos. Sin embargo, esta

exposición podría producirse, ya que la proteína Cry1Ab ha sido detectada en el ácaro herbívoro *Tetranychus urticae*, perteneciente al suborden Actinedida (García *et al.*, 2010; Obrist *et al.*, 2006).

Mediante la comparación de los valores de potencia de los análisis agrupando los datos obtenidos durante varios años con respecto a los datos analizados cada año por separado se puede determinar la utilidad de la repetición de un estudio durante varios años (Comas *et al.*, 2013). En este sentido, sería de esperar que los análisis combinados presentaran potencias más altas debido a que el tamaño de la muestra es mayor (Duan *et al.*, 2006). En general, en la mayoría de los grupos se obtuvo este resultado, a excepción de aquellos con las densidades más altas: en la parte aérea de la planta *Z. scutellaris* y *Anagrus* spp. y en las muestras de suelo la comunidad de colémbolos y de ácaros. Estos grupos presentaron potencias muy altas en los análisis individuales, siendo estos valores muy similares a los obtenidos en el análisis combinado. Estos resultados ponen de manifiesto que la adición de años a los ensayos individuales no garantiza necesariamente una mayor potencia para las especies más abundantes. Resultados similares se han publicado recientemente en el trabajo de Comas *et al.* (2015), en el que analizaron el número adecuado de muestreos en los ensayos de campo para evaluar los efectos del maíz Bt, concluyendo que en los grupos que presentaron una mayor abundancia, no había una mejora sustancial de la potencia al aumentar el número de fechas de muestreo.

Como conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que no existen efectos negativos del cultivo continuado del maíz MON810 que expresa la toxina Cry1Ab sobre los artrópodos que habitan en las partes aéreas de la planta, ni sobre los microartrópodos del suelo, a pesar de que se ha demostrado la exposición de especies pertenecientes a ambas comunidades a la toxina Cry1Ab en condiciones de campo. Además, se proponen al herbívoro *Z. scutellaris*, al parasitoide *Anagrus* spp., y a las comunidades de detritívoros de ácaros y colémbolos del suelo como taxones idóneos para ser utilizados como indicadores de los posibles efectos del maíz Bt, por su exposición a la toxina Cry1Ab en condiciones de campo, su presencia habitual en el cultivo de maíz, la asequibilidad que presentan para ser muestreados e identificados y su idoneidad para detectar diferencias entre el maíz Bt y no-Bt.



### 3. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICOTOXÍGENOS Y MICOTOXINAS EN EL MAÍZ Bt Y CONVENCIONAL



### 3.1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los alimentos básicos en la dieta humana y animal, siendo actualmente el cultivo de cereal más importante a nivel mundial por su producción. Sin embargo, es un producto agrícola particularmente propenso a sufrir infecciones por hongos productores de micotoxinas y por tanto a estar contaminado con estos metabolitos tóxicos. La acumulación de toxinas en los alimentos representa un riesgo para la salud de los seres humanos y los animales, además de producir pérdidas económicas en la industria agroalimentaria al disminuir la calidad de la materia prima (Wu, 2006). Diversos países han desarrollado normativas específicas que marcan los niveles máximos permitidos de micotoxinas en diferentes productos alimenticios (ver Cheli *et al.*, 2014 para una revisión de las normativas de la UE), siendo la determinación analítica de las micotoxinas el único método válido para certificar su presencia en productos alimenticios de acuerdo con la normativa vigente (Comisión Europea, 2006a). La imposibilidad de eliminar las micotoxinas de forma eficaz sin afectar a las propiedades de la materia prima con un bajo coste, hacen que una de las estrategias para controlar su aparición sea la prevención de la contaminación con los hongos productores de las mismas. Las distintas especies fúngicas que aparecen en un cultivo pueden tener perfiles toxígenos diferentes, por lo que la identificación de los hongos productores presentes en un alimento puede ser útil para predecir qué toxinas podrían aparecer. De este modo varios autores han señalado que la presencia de ciertas especies de hongos productores de micotoxinas podría utilizarse como un buen indicador de la contaminación por micotoxinas (Gil-Serna *et al.*, 2013; Jurado *et al.*, 2006a).

En el sur de Europa, las principales especies de hongos micotoxígenos que aparecen en el cultivo de maíz pertenecen a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* (Meissle *et al.*, 2010). Las especies del género *Fusarium* se consideran hongos de precosecha, ya que es durante el cultivo cuando se produce el crecimiento del mismo y la producción de micotoxinas. Las especies de este género son esencialmente hongos fitopatógenos que causan las enfermedades conocidas como podredumbre o fusariosis, y pueden atacar a la raíz, el tallo o la mazorca. La colonización de la mazorca por *Fusarium* tiene una especial importancia, ya que puede implicar la acumulación de toxinas en el grano que posteriormente se destinará a la alimentación humana o animal. Las podredumbres de la mazorca están ocasionadas generalmente por varias especies de *Fusarium* que, o bien coexisten, o bien se suceden rápidamente en el tiempo (Chelkowski, 1989). Los dos tipos de podredumbre más importantes que afectan al maíz en Europa son la podredumbre

rosada de la mazorca o *pink ear rot*, causada principalmente por especies de la sección *Liseola* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*) y la podredumbre roja de la mazorca o *red ear rot* causada principalmente por especies de la sección *Discolor* (*F. graminearum* y *F. culmorum*). Además, otras especies menos frecuentes que se aíslan en ambos tipos de podredumbre son *F. equiseti*, *F. poae*, y *F. sporotrichioides*. La distribución y la prevalencia de las diferentes especies de *Fusarium* que causan los dos tipos de podredumbre se rigen en gran medida por las condiciones ambientales, principalmente la temperatura y la humedad (Logrieco *et al.*, 2002).

*Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum* son productoras de fumonisinas, en particular de B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) y B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>), mientras que el resto de estas especies de *Fusarium* sintetizan principalmente zearalenona (ZEA) y tricotecenos de tipo A (T-2, HT-2) y tipo B (DON), estando los contenidos máximos de todas estas toxinas legislados por la UE para los alimentos a base de maíz destinados al consumo humano (ver tabla 1.3 de la introducción general). *Fusarium subglutinans* se ha descrito como productor de diferentes micotoxinas como beauvericina, fusaproliferina, moniliniiformina (MON) (Wang *et al.*, 2013; Logrieco *et al.*, 2003), no existiendo en la actualidad normativas sobre los contenidos máximos en los alimentos para estas micotoxinas. A pesar de ello, la EFSA ha alertado del peligro de la presencia de alguna de ellas en los alimentos como es el caso de la MON (EFSA, 2010c) (**Tabla 3.1**).

Dentro del género *Aspergillus*, las especies que se han citado como frecuentes en el maíz, son *A. flavus*, *A. parasiticus*, ambas productoras de aflatoxinas y, en menor medida, *A. niger*, productora de ocratoxina A (OTA) OTA (**Tabla 3.1**) (Marín *et al.*, 2012; Sala, 1993). Otras especies productoras de OTA son *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae*, cuya presencia ha sido descrita en diversos cereales como la cebada (Gil-Serna *et al.*, 2011; Mateo *et al.*, 2011; Pardo *et al.*, 2004). Aunque se desconoce la importancia de estas especies en el cultivo de maíz, ensayos *in vitro* con medios de cultivo elaborados con maíz han demostrado que estos hongos son capaces de proliferar y producir OTA en ellos (Gil-Serna *et al.*, 2015). La contaminación con los hongos del género *Aspergillus* se produce generalmente durante el cultivo, pero la proliferación y producción de micotoxinas tiene lugar principalmente durante el almacenamiento, cuando hay una baja humedad y las temperaturas son altas, conociéndose a estas especies como hongos de postcosecha. Sin embargo, debido al aumento de temperaturas junto a los periodos de sequía más largos que se prevén que sucedan por el cambio climático en el sur de Europa, y en concreto en el área

mediterránea, las micotoxinas sintetizadas por estos hongos podrían aparecer durante el periodo de precosecha (Magan *et al.*, 2011).

**Tabla 3.1.** Principales micotoxinas producidas por las especies de *Fusarium* y *Aspergillus* en el cultivo de maíz en Europa. Las micotoxinas indicadas en negrita son las que principalmente producen. Modificado de Logrieco *et al.*, (2002).

Hongo productor	Micotoxina
<i>F. verticillioides</i>	<b>FB<sub>1</sub></b> , <b>FB<sub>2</sub></b> , <b>FB<sub>3</sub></b>
<i>F. proliferatum</i>	<b>FB<sub>1</sub></b> , <b>BEA</b> , <b>MON</b> , <b>FUS</b> , <b>FB<sub>2</sub></b>
<i>F. graminearum</i>	<b>DON</b> , <b>ZEA</b> , <b>NIV</b> , <b>FUS</b>
<i>F. sporotrichioides</i>	<b>T-2</b> , <b>HT-2</b>
<i>F. equiseti</i>	<b>ZEA</b> , <b>T-2</b> , <b>H-T2</b>
<i>F. poae</i>	<b>NIV</b> , <b>FUS</b> , <b>T-2</b> , <b>HT-2</b> ,
<i>F. culmorum</i>	<b>DON</b> , <b>ZEA</b> , <b>NIV</b> , <b>FUS</b>
<i>F. subglutinans</i>	<b>MON</b> , <b>BEA</b> , <b>FUS</b>
<i>A. niger</i>	<b>OTA</b>
<i>A. flavus</i>	<b>AFB<sub>1</sub></b> , <b>AFB<sub>2</sub></b> , <b>AFG<sub>1</sub></b> , <b>AFG<sub>2</sub></b>
<i>A. parasiticus</i>	<b>AFB<sub>1</sub></b> , <b>AFB<sub>2</sub></b> , <b>AFG<sub>1</sub></b> , <b>AFG<sub>2</sub></b>

AF: aflatoxinas, BEA: beauvericina, DON: deoxinivalenol, FB: fumonisinas, FUS: fusaproliferina, MON: moniliformina, NIV: nivalenol, OTA: ocratoxina A, T-2: toxina T-2, HT-2: toxina HT-2, ZEA: zearalenona.

En España, los principales hongos asociados durante el cultivo al maíz que se han descrito son las especies productoras de fumonisinas, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Butrón *et al.*, 2006; Sala *et al.*, 1994). Por ello, los trabajos que han analizado el contenido de micotoxinas en muestras de maíz de campos españoles se han centrado en el estudio de los niveles de fumonisinas. Según un estudio multianual que analizó el contenido de fumonisinas de diferentes áreas desde 2003 a 2006, el 22,6% de las muestras de maíz grano tomadas en campo superaron los 2.000 µg/kg de fumonisinas, observándose diferencias entre las regiones y los años analizados debidas, entre otros factores, a las distintas condiciones climáticas (GENVCE, 2007). Sin embargo, los datos epidemiológicos referentes a otras especies de hongos y a la contaminación con otras micotoxinas en diferentes aéreas maiceras de España son escasos. La incidencia de las especies de hongos, así como la severidad de las enfermedades y la producción de micotoxinas puede variar de un año a otro en una misma región, o entre regiones diferentes en un mismo año, dependiendo de las condiciones climáticas (temperatura,

humedad, actividad de agua, etc.) o las prácticas agronómicas (rotación de cultivos, tipo de riego, etc.). Además, el daño producido por los insectos en la planta es otro de los factores que afecta a la proliferación de los hongos micotoxígenos y la producción de micotoxinas. En concreto, la severidad de la podredumbre rosada de la mazorca está estrechamente relacionada con los daños mecánicos provocados por los taladros del maíz (Marín *et al.*, 2012). En España el cultivo de maíz se ve afectado por dos especies de taladros, *Ostrinia nubilalis* y *Sesamia nonagrioides*. Diversos trabajos han estudiado la relación entre la concentración de micotoxinas y los daños producidos por *O. nubilalis*, al ser una de las principales plagas del maíz en EE.UU. y en Europa (Alma *et al.*, 2005; Magg *et al.*, 2002; Munkvold *et al.*, 1999). Sin embargo, debido a la limitada distribución de *S. nonagrioides*, restringida a los países del área mediterránea, apenas hay trabajos de campo que hayan estudiado su implicación en la contaminación del maíz con micotoxinas (de Curtis *et al.*, 2011; Folcher *et al.*, 2010). Una de las hipótesis que explica la relación de los taladros con las infecciones fúngicas es que las larvas actuarían como vectores de la infección, transportando las esporas en su cutícula o intestino. Sin embargo, los escasos trabajos llevados a cabo hasta el momento para esclarecer esta hipótesis se han centrado en *O. nubilalis* y en *F. verticillioides* (Darvas *et al.*, 2011; Sobek y Munkvold, 1999), desconociéndose la implicación que podría tener también *S. nonagrioides* en el transporte de diferentes especies de hongos micotoxígenos.

Diversos estudios han mostrado que el control de los taladros en el cultivo del maíz disminuye el contenido de algunas micotoxinas en las mazorcas, al reducir los daños producidos por estos insectos. En concreto, la utilización de maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab, altamente efectivo frente a los taladros, produce una reducción en las concentraciones de fumonisinas con respecto a los niveles encontrados en los granos de los híbridos convencionales (Ostry *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2007; Pazzi *et al.*, 2006). Sin embargo, esta íntima asociación entre el ataque de taladros y presencia de micotoxinas no siempre está tan clara, y así lo demuestra la gran variabilidad de resultados obtenidos en estudios en Estados Unidos (Clements *et al.*, 2003; Munkvold *et al.*, 1999), en Argentina (Barros *et al.*, 2009) y en Europa (Magg *et al.*, 2002; Papst *et al.*, 2005). España es el único país dentro de la UE que ha adoptado de forma significativa el cultivo de maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab para el control de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides*. Los escasos trabajos llevados a cabo en campos españoles que han evaluado el efecto del maíz Bt en la contaminación con hongos micotoxígenos y los niveles de micotoxinas se han centrado en ciertas especies del género *Fusarium* y en las fumonisinas. Bakan *et al.* (2002) examinaron los niveles de infección de cuatro especies de *Fusarium* en el maíz

Bt (MON810) frente parcelas experimentales de maíz no-Bt en dos regiones (Cataluña y Aragón) en 1999, solo un año después de la incorporación del maíz Bt a la agricultura española y encontraron que el maíz Bt presentaba un menor contenido en fumonisinas. Desde entonces no se han publicado trabajos científicos de campo en España a excepción de algunos datos aportados en los informes elaborados por el Grupo para la Evaluación de Nuevas Variedades de Cultivos Extensivos en España (GENVCE, 2011; 2007).

Por todo lo anteriormente expuesto, nuestro objetivo es estudiar la influencia que podría ejercer el maíz Bt, que ejerce un control sobre los taladros que dañan la planta, en la contaminación con hongos micotoxígenos de precosecha y postcosecha y con las micotoxinas que sintetizan, y evaluar si la identificación de los hongos productores puede ser útil para predecir las toxinas podrían aparecer. Por ello se han planteado los siguientes objetivos:

1. Comparar la contaminación fúngica con las especies de hongos productoras de micotoxinas de los género *Fusarium* y *Aspergillus* y la concentración de micotoxinas (fumonisinas, DON, T-2, H-T2, ZEA, aflatoxinas y OTA) entre mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y mazorcas de maíz Bt.
2. Estudiar si la presencia de hongos micotoxígenos en las mazorcas es un buen indicador de la contaminación con micotoxinas.
3. Analizar el papel de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* como portadores de hongos productores de micotoxinas.

## **3.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Recogida y procesamiento de muestras**

Entre los años 2011 y 2013 se llevaron a cabo muestreos en campos comerciales de maíz Bt y no-Bt. En cada campo se seleccionaron 5 plantas, distribuidas por toda la parcela, separadas entre sí y con el borde por un mínimo de 20 metros. En los campos Bt la selección fue al azar, ya que ninguna planta presenta daño de taladro, mientras que en los en los campos no-Bt el muestreo fue dirigido seleccionando plantas con daño visible de taladro en la mazorca, ya que nuestro interés era ver la posible influencia del daño de los taladros en la presencia de hongos micotoxígenos y en el contenido en micotoxinas.

De cada planta se recogió la mazorca, guardándola una bolsa de plástico. Además, en los campos no-Bt se revisó la caña de la planta en busca de larvas de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* para su recolección y la posterior identificación de los hongos que pudieran portar. Los insectos se guardaron individualmente en pequeñas cajas de plástico con un trozo de caña de la misma planta en la que se encontraron para que llegaran vivos al laboratorio. En las plantas seleccionadas de los campos de maíz Bt se comprobó la expresión de la toxina Cry1Ab mediante su detección con el test Bt-Cry1Ab/1Ac ImmunoStrip® (Agdia, Elkhart, IN, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, en ciertos campos se recogieron también mazorcas no-Bt sin daño de taladro (en los **anexos 7 y 8** se indican los campos y la campaña en los que recogieron).

Los muestreos se llevaron a cabo en distintos campos situados en diferentes localidades de tres regiones maiceras de la Península Ibérica en las que el cultivo de maíz Bt está ampliamente adoptado: Extremadura (**Tabla 3.2**), Albacete (**Tabla 3.3**) y Valle del Ebro (**Tabla 3.4**). Los muestreos tuvieron lugar justo antes de la cosecha, la cual se produjo aproximadamente a mediados de septiembre en Extremadura, primeros de octubre en Albacete y mediados de octubre en el Valle del Ebro.

En el laboratorio, las mazorcas se desgranaron e inspeccionaron en busca de taladros. Los granos de cada mazorca se secaron en una estufa (T 6060, Heraeus instruments, Hanou, Alemania) a 65 °C durante 24 horas para después molerlos con un molinillo de piedra de granito (Fidibus XL, Conasi, España), que era exhaustivamente lavado entre la molienda de cada muestra. La harina se almacenaba en bolsas de papel a 4 °C. Los insectos recogidos en la caña y en la mazorca se congelaron individualmente a -20 °C.

**Tabla 3.2.** Localización de los campos de maíz Bt y no-Bt muestreados en Extremadura durante los años 2011 y 2012 y prácticas agronómicas llevadas a cabo en ellos.

Año	Campo <sup>a</sup>	Fecha de muestreo	Maíz			Riego		Tratamientos insecticidas <sup>b</sup>		Cultivo campaña anterior
			Tipo	Varietal (ciclo)	Fecha de siembra	Tipo	Último riego	Semilla	Aplicación foliar	
2011	Riolobos (CC)	15-sep	no-Bt Bt	DKC6666 (700) DKC6667YG (700)	15-may	A manta	05-sep	No No	No No	Maíz
	Don Benito (BA)	15-sep	no-Bt Bt	PR33Y74 (600) PR33Y72 (600)	29-abr	A manta	25-ago	Clotianidina Clotianidina	Abamectina Abamectina	-
	Madrigalejo (CC)	15-sep	no-Bt Bt	PR33Y74 (600) PR33Y72 (600)	20-abr	A manta	26-ago	No No	Abamectina Abamectina	Cereal
	Moheda de Gata (CC)	16-sep	no-Bt Bt	P1758 (700) DKC6667YG (700)	12-may	A manta	13-sep	No No	Clorpirifos No	Maíz
2012	Navalvillar de Pela (BA)	18-sep	no-Bt Bt	DKC6666 (700) DKC6667YG (700)	23-abr	A manta	25-ago	Clotianidina Clotianidina	Clorpirifos No	Maíz
	Villar de Rena (BA)	19-sep	no-Bt Bt	PR31D58 (700) PR33D48 (700)	08-may	A manta	09-sep	No No	Clorpirifos, zetametrina, abamectina Abamectina	Maíz
	Obando (BA)	19-sep	no-Bt Bt	PR31D58 (700) PR33D48 (700)	20-abr	A manta	31-ago	Clotianidina Clotianidina	Abamectina Abamectina	Cereal

<sup>a</sup> Se indica la localidad en la que se encontraba el campo, mostrándose entre paréntesis la provincia [Cáceres (CC), Badajoz (BA)].

<sup>b</sup> Se indica el principio activo.

**Tabla 3.3.** Localización de los campos de maíz Bt y no-Bt muestreados en la provincia de Albacete durante los años 2011 y 2012 y prácticas agronómicas llevadas a cabo en ellos.

Año	Campo <sup>a</sup>	Fecha de muestreo	Maíz			Riego		Tratamientos insecticidas <sup>b</sup>		Cultivo campaña anterior
			Tipo	Variedad (ciclo)	Fecha de siembra	Tipo	Último riego	Semilla	Aplicación foliar	
2011	Motilleja	04-oct	no-Bt	PR34N43 (500)	15-abr	Aspersión	10-sep	Fipronil	No	Maíz
			Bt	PR31N28 (700)				Fipronil	No	
	Barrax	04-oct	no-Bt	DKC6721 (700)	07-abr	Aspersión	10-sep	Clotianidina	No	Maíz
Bt	DKC6667YG (700)	Clotianidina	No							
2012	El Salobral	05-oct	no-Bt	DKC6721 (700)	06-abr	Aspersión	11-sep	Clotianidina	No	Cereal
			Bt	DKC6667YG (700)				Clotianidina	No	
	La Gineta	02-oct	no-Bt	DKC6450 (700)	18-abr	Aspersión	06-sep	Clotianidina	No	Maíz
Bt	DKC6451YG (700)	Clotianidina	No							
2012	Santa Ana	02-oct	no-Bt	DKC6450 (700)	20-abr	Aspersión	05-sep	Clotianidina	No	Maíz
			Bt	DKC6451YG (700)				Clotianidina	No	
	La Herrera	03-oct	no-Bt	-	09-abr	Aspersión	02-sep	Fipronil	No	Maíz
Bt	PR34N44 (600)	Fipronil	No							
2012	Motilleja	03-oct	no-Bt	Helen (700)	05-abr	Aspersión	02-sep	No	No	Maíz
			Bt	Helen Bt (700)				No	No	

<sup>a</sup> Se indica la localidad en la que se encontraba el campo.

<sup>b</sup> Se indica el principio activo.

**Tabla 3.4.** Localización de los campos de maíz Bt y no-Bt muestreados en El Valle del Ebro durante los años 2012 y 2013 y prácticas agronómicas llevadas a cabo en ellos.

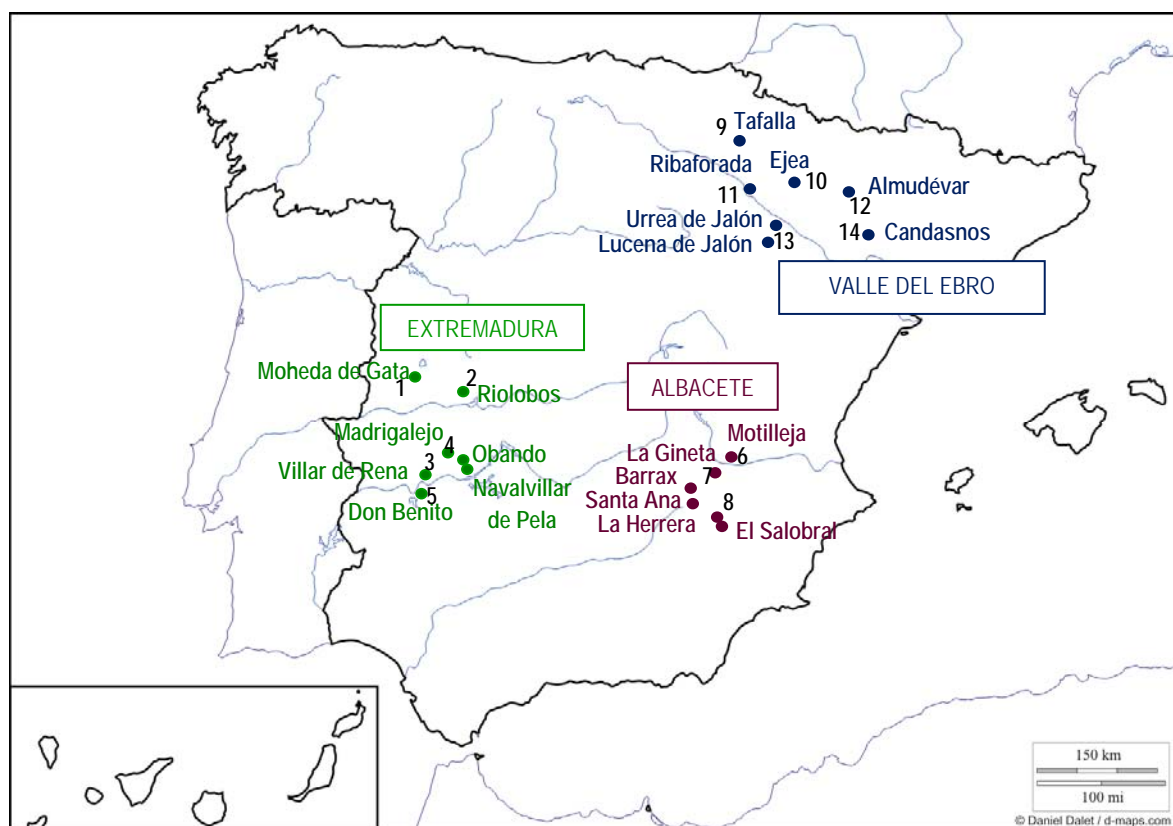
Año	Campo <sup>a</sup>	Fecha de muestreo	Maíz			Riego		Tratamientos insecticidas <sup>b</sup>		Cultivo campaña anterior
			Tipo	Varietal (ciclo)	Fecha de siembra	Tipo	Último riego	Semilla	Aplicación foliar	
2012	Ejea de los Caballeros (HU)	16-oct	no-Bt Bt	DKC6677 (600) DKC6678YG (600)	13-abr	Aspersión	10-sep	Clotianidina Clotianidina	Clorpirifos Clorpirifos	Maíz
	Candasnos (HU)	16-oct	no-Bt Bt	DKC6717 (700) DCK5277YG (400)	25-abr	Aspersión	15-sep	Clotianidina Clotianidina	No No	Maíz
	Urrea de Jalón (Z)	17-oct	no-Bt Bt	DKC6717 (700) -	09-abr	A manta	31-ago	Clotianidina Clotianidina	No No	-
	Lucena de Jalón (Z)	17-oct	no-Bt Bt	DKC6717 (700) DKC6667YG (700)	11-abr	Aspersión	12-sep	Clotianidina Clotianidina	No No	Maíz
2013	Almudévar (HU)	15-oct	no-Bt Bt	DKC6450 (700) DKC6451YG (700)	22-abr	Aspersión	15-sep	Clotianidina Clotianidina	No No	Maíz
	Candasnos (HU)	15-oct	no-Bt Bt	DKC6717 (700) DKC6667YG (700)	15-abr	Aspersión	01-sep	Clotianidina Clotianidina	No No	Maíz
	Ribaforada (NA)	16-oct	no-Bt Bt	DKC6630 (700) DKC6451YG (700)	06-abr	A manta	05-sep	Clotianidina Clotianidina	No No	Maíz
	Tafalla (NA)	16-oct	no-Bt Bt	DKC5401 (500) PR33W86 (600)	20-abr	A manta	11-sep	Clotianidina Clotianidina	No No	Maíz

<sup>a</sup> Se indica la localidad en la que se encontraba el campo, mostrándose entre paréntesis la provincia [Zaragoza (Z), Huesca (HU), Navarra (NA)].

<sup>b</sup> Se indica el principio activo.

### 3.2.2. Variables ambientales

Los datos de precipitación y temperatura se obtuvieron diariamente de diferentes estaciones meteorológicas situadas próximas a los campos muestreados (**Figura 3.1**). Todos los datos registrados y la información relativa a los equipos de medición de cada estación meteorológica se encuentran en la web del Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) <http://eportal.magrama.gob.es/websiar/SeleccionParametrosMap.aspx?dst=1>



**Figura 3.1.** Mapa con las localidades en las que se encontraban los campos muestreados en Extremadura (●), Albacete (●) y Valle del Ebro (●) y situación de las estaciones meteorológicas de las cuales se han obtenido los datos climatológicos (1 Moraleja; 2 Aldehuela del Jerte; 3 Palazuelo; 4 Madrigalejo; 5 Don Benito; 6 Motilleja; 7 La Gineta; 8 Albacete; 9 Artejena; 10 Luna; 11 Ablitas; 12 Tartienta; 13 Épila; 14 Candasnos).

### 3.2.3. Identificación molecular de hongos productores de micotoxinas

Los hongos micotoxígenos presentes en la harina de maíz y en las larvas de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* recogidas se identificaron mediante métodos moleculares. Para ello, un gr de harina de cada mazorca o una larva individualizada se incubaron en matraces de 250 ml con 50 ml medio líquido Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 0,5% (Pronadisa, Madrid), durante 24 horas (en el caso de la harina) y 48 (en el caso de las larvas) a  $28 \pm 1$  °C en agitación (120 rpm) (711, VDRL, Asal, Milan, Italia). Tras la incubación, los cultivos se filtraron a través de papel Whatman N°1 (Whatman International Ltd. Maidstone, Reino Unido) y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Para la extracción del DNA, cada muestra se trituró y homogeneizó con nitrógeno líquido en un mortero de cerámica. La extracción del DNA a partir del micelio obtenido de los taladros se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Liu *et al.* (2000), partiendo de aproximadamente 100 mg de micelio. El protocolo se modificó añadiendo 50 µl de Zimoliasa 20T (1,5 mg/ml) (ICN Biomedicals, EE.UU.) y 50 µl de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (2 mg/ml) (Sigma Aldrich, Alemania) al correspondiente tampón de lisis e incubando posteriormente durante 1 hora a 37 °C. Para las muestras de harina de maíz, la extracción del DNA se realizó con el "kit" DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, llevándose a cabo tres extracciones independientes para cada muestra. La concentración de DNA se estimó por absorción a 260 nm usando el espectrofotómetro NanoDrop® N-D 1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.), y dicho DNA se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Para la identificación molecular de los hongos micotoxígenos se siguieron los protocolos de amplificación del DNA descritos en la **tabla 3.5**. Cada una de las reacciones de PCR contenía 100 ng de DNA molde, 1 µl de cada uno de los cebadores (20 µM) (Sigma Aldrich, Alemania), 0,2 µl de dNTPs (100 mM) (Ecogen, España), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,15 µl de Taq DNA polimerasa (5U/µl) (Biotools, España), 2,5 µl de tampón PCR 10X (Biotools, España). El volumen se completó con agua para biología molecular estéril (MO-BIO, EE.UU.) hasta 25 µl. En todas las reacciones de amplificación se incorporaron un control positivo con DNA extraído de la correspondiente especie de hongo y un control negativo al que, en sustitución del DNA, se incorporó agua para biología molecular estéril. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania).

**Tabla 3.5.** Secuencias de los cebadores utilizados para la identificación específica mediante PCR de las especies de *Fusarium* y *Aspergillus* de interés y referencias en las que están descritos los protocolos.

Hongo micotoxígeno	Nombre de los cebadores	Secuencia de los cebadores	Referencia
Productoras de tricotecenos	Tct-F	5'-CACTGCGTGCTGATTCACTGG-3'	Jurado <i>et al.</i> (2006a)
	Tct-R	5'-GAGACAAGCATATGACTACTGGCAG-3'	
<i>F. graminearum</i>	Fgr-F	5'-GTTGATGGGTAAAAGTGTG-3'	Jurado <i>et al.</i> (2005)
	Fgc-R	5'-CTCTCATATACCCTCCG-3'	
<i>F. culmorum</i>	Fcu-F	5'-GACTATCATTATGCTTGCGAGAG-3'	Jurado <i>et al.</i> (2005)
	Fgc-R	5'-CTCTCATATACCCTCCG-3'	
<i>F. equiseti</i>	Feq-F	5'-GGCCTGCCGATGCGTC-3'	Jurado <i>et al.</i> (2005)
	Feq-R	5'-CGATACTGAAACCGACCTC-3'	
<i>F. sporotrichioides</i>	Fps-F	5'-CGCACGTATAGATGGACAAG-3'	Jurado <i>et al.</i> (2005)
	Fsp-R	5'-GT CAGAAGAGACGCATCCGCC-3'	
<i>F. poae</i>	Fps-F	5'-CGCACGTATAGATGGACAAG-3'	Jurado <i>et al.</i> (2005)
	Fpo-R	5'-CAGCGCACCCCTCAGAGC-3'	
<i>F. proliferatum</i>	Fpr3-F	5'-CGGCCACCAGAGGATGTG-3'	Jurado <i>et al.</i> (2006a)
	Fpr4-R	5'-CAACACGAATCGCTTCCTGAC-3'	
<i>F. verticillioides</i>	VERT-1	5'-GT CAGAATCCATGCCAGAACG-3'	Patiño <i>et al.</i> (2004)
	VERT-2	5'-CACCCGCAGCAATCCATCAG-3'	
<i>F. subglutinans</i>	SUB1	5'-CTGTGCTAACCTCTTTATCCA-3'	Mulé <i>et al.</i> (2004)
	SUB2	5'-CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA-3'	
<i>A. parasiticus</i>	PAR1	5'-GTCATGGCCGCCGGGGCGTC-3'	Sardiñas <i>et al.</i> (2010)
	PAR2	5'-CCTGGAAAAATGGTTGTTTTGCG-3'	
<i>A. flavus</i>	FLA1	5'-GTAGGGTTCCTAGCGAGCC-3'	González-Salgado <i>et al.</i> (2008)
	FLA2	5'-GGAAAAAGATTGATTTGCGTTC-3'	
<i>A. carbonarius</i>	CAR1	5'-GCATCTCTGCCCTCGG-3'	Patiño <i>et al.</i> (2005)
	CAR2	5'-GGTTGGAGTTGTCGGCAG-3'	
Agregado <i>A. niger</i> *	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	González-Salgado <i>et al.</i> (2005)
	NIG2	5'-CCGGAGAGAGGGGACGGC-3'	
<i>A. ochraceus</i>	OCRAQ1	5'-GCACAGCGCTCGCCG-3'	Gil-Serna <i>et al.</i> (2009)
	OCRAQ2	5'-CTGATTGCGATACAATCG-3'	
<i>A. westerdijkiae</i>	WESTF	5'-CTTCCTTAGGGGTGGCACAG-3'	Gil-Serna <i>et al.</i> (2009)
	WESTR	5'-CAACCTGATGAAATAGATTGGTTG-3'	
<i>A. steynii</i>	STEYF	5'-CCACGCGGCCCGGGGGAG-3'	Gil-Serna <i>et al.</i> (2009)
	STEYR	5'-CGGGGGGGACGAGGACCCAAC-3'	

\* incluye las especies *A. niger* y *A. tubingensis*. En muestras con mezcla de hongos no es posible la identificación por separado de ambas especies, ya que es necesario realizar una digestión posterior con una enzima de restricción específica.

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad, EEUU) al 2% en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM y EDTA 1X), teñidos con 1 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml) (Sigma Aldrich, Alemania) por cada 20 ml de tampón. Las muestras se disolvieron en tampón de carga [sacarosa (40%, w/v), azul de bromofenol (0,25%, w/v) y agua] y se aplicaron 20 µl de muestra al gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1X a voltaje constante y, una vez finalizada, los geles se visualizaron mediante irradiación con luz UV (Sambrook y Russell, 2001) en un sistema de captación de imágenes E-BOX (Vilber-Lourmat, Alemania). El marcador de peso molecular utilizado fue 100 bp DNA Ladder (Biotools, España) con un rango de tamaños de entre 100 pb y 1 kb.

### 3.2.4. Cuantificación de micotoxinas en el maíz Bt y no-Bt

La cuantificación de las micotoxinas en las mazorcas se llevó a cabo siguiendo diferentes protocolos en función del laboratorio donde se realizó el análisis (**Tabla 3.6**).

**Tabla 3.6.** Centros donde se llevó a cabo el análisis de las micotoxinas, indicándose el protocolo seguido y las muestras analizadas en cada uno de ellos.

Centro	Micotoxinas analizadas	Protocolo <sup>a</sup>	Muestras analizadas <sup>b</sup>
Institute of Sciences of Food Production (ISPA-CNR) (Bari, Italia)	Fumonisin	de Girolamo <i>et al.</i> (2010)	2011, Extremadura y Albacete
	DON, T-2, HT-2, ZEA, OTA, Aflatoxinas	Lattanzio <i>et al.</i> (2011)	2011, Extremadura y Albacete
Laboratorio Arbitral Agroalimentario (MAGRAMA) (Madrid)	DON, T-2, HT-2, ZEA	Klötzel y Lauber (2006)	2012, Extremadura, Albacete y Valle del Ebro 2013, Valle del Ebro
Universitat de Lleida, Departamento de Tecnología de los Alimentos (Lleida)	Fumonisin	Cao <i>et al.</i> (2014)	2012, Extremadura, Albacete y Valle del Ebro 2013, Valle del Ebro

<sup>a</sup> Protocolos utilizados con algunas modificaciones.

<sup>b</sup> Se indica el año y la región en la que se recogieron.

#### 3.2.4.1. Análisis de fumonisinas (FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>)

El análisis de las fumonisinas se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FD), añadiendo una disolución derivatizante (orto-

ftalaldehído con 2-mercaptoetanol) para formar los derivados fluorescentes de las fumonisinas y detectarlos por fluorescencia.

**a) Institute of Sciences of Food Production (ISPA-CNR)**

Preparación de las muestras (extracción y lavado): para la extracción, 12,5 g de harina de cada muestra se homogenizaron con 50 ml de metanol/agua (75/25, v/v) con un agitador orbital a 250 rpm durante 60 min. El extracto se filtró a través de papel Whatman N°4, y se ajustó el pH en un rango 5,8-6,5 con hidróxido de sodio 0,1 M o con ácido clorhídrico 0,1 M. Diez mililitros del filtrado (equivalente a 2,5 gr de muestra) se pasaron a través de columna de intercambio aniónico fuerte (500 mg SAX, Varian Inc., CA, EE.UU.) con un flujo de una gota por segundo, que previamente había sido acondicionada con 5 ml de metanol y con 5 ml de metanol/agua (75/25, v/v). Para lavar la columna se utilizaron 8 ml de metanol/agua (75/25, v/v) y 3 ml de metanol. Las fumonisinas se eluyeron con 10 ml de metanol/ácido acético (99/1, v/v). La elución se evaporó bajo una corriente de nitrógeno a 50 °C y los residuos se disolvieron con 500 µl de acetonitrilo/agua (30/70, v/v).

Análisis por HPLC: el equipo utilizado fue el HPLC ProStar system (Varian Inc., CA, EE.UU.) equipado con un inyector automático Rheodyne modelo 7125 (Cotati, CA, EE.UU.), espectrofluorímetro fijado en excitación=335 nm, emisión=440 nm, y un sistema de datos Star versión 6.20 (Varian Inc.). La columna cromatográfica utilizada fue SymmetryShield C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm tamaño de partícula), con un pre-filtro (0.5 µm x 3 mm diámetro, Rhodyne Inc. CA, EE.UU.), la cual se mantuvo a 30 °C constantes. El inyector automático se programó para mezclar 110 µl del extracto de cada muestra con 110 µl de solución derivatizante durante 30 s y 50 µl fueron inyectados 3 min después de agregar dicha solución. La fase móvil consistía en un gradiente binario con un flujo de 1ml/min que seguía la siguiente rutina: composición inicial de fase móvil 60% de acetonitrilo/agua/ácido acético (30/69/1, v/v/v) (solvente A) y 40% de acetonitrilo/agua/ácido acético (60/39/1, v/v/v) (solvente B) que se mantuvo constante durante 5 min; después el solvente B se incrementó linealmente hasta el 88% en 21 min, manteniéndose constante 4 min. Finalmente, para limpiar la columna se aumentó el porcentaje de acetonitrilo (solvente C) al 100% y se mantuvo constante durante 4 min.

Cuantificación: se construyó una curva de calibración con diferentes concentraciones de fumonisinas FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> (10, 25, 50, 100, 250 y 500 ng/ml). Las diferentes concentraciones de la curva de calibración se realizaron a partir de una solución comercial con 50 µg/ml

de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, disueltas en acetonitrilo/agua (1/1, v/v) (Biopure, Modena, Italia). Las fumonisinas fueron cuantificadas midiendo las áreas de los picos, y comparando este valor con la recta de calibración obtenida de las soluciones de los estándares. El límite de detección (LOD) fue de 2 µg/kg.

**b) Departamento de Tecnología de los Alimentos (UdL)**

Este laboratorio analizó las fumonisinas usando el método descrito en Cao *et al.*, 2014, Las fumonisinas se extraen del maíz empleando una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (50/25/25, v/v), el extracto filtrado se purifica a través de una columna de inmunoafinidad (Fumoniprep, R-Biopharm Rhône Ltd, Reino Unido), y las fumonisinas se eluyen posteriormente con una mezcla de metanol/agua (50/50, v/v). La cuantificación se lleva a cabo utilizando un Waters HPLC-system (Waters 2695, Waters Corporation, Milford, EE.UU.), equipado con un detector de fluorescencia (Waters Multi λ Fluorescence Detector 2475, fijado en excitación=335 nm, emisión=440 nm) y una columna Spherisorb® OSD2 C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm tamaño de partícula, Waters Corporation, Milford, EE.UU.) conectada a un pre-filtro Spherisorb® S5OSD2 (100 mm x 4,6 mm, Waters Corporation, Milford, EE.UU.). El LOD fue de 10 µg/kg para las fumonisinas FB<sub>1</sub> y 19 µg/kg para las FB<sub>2</sub>.

**3.2.4.2. Análisis de deoxinivalenol (DON), T-2, HT-2, zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) y aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>)**

El análisis de estas micotoxinas se llevó a cabo por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS).

**a) Institute of Sciences of Food Production (ISPA-CNR)**

Preparación de las muestras (extracción y lavado): para la extracción, 5 gr de harina se homogeneizaron con 25 ml de acetonitrilo/agua (84/16, v/v) con un agitador orbital a 250 rpm durante 60 min. El extracto se filtró (Whatman N° 4) y 5 ml (equivalente a 0,5 gr de muestra) se evaporaron con aire a 50 °C. Los residuos se disolvieron añadiendo 100 µl de metanol y agitando durante 1 min, y 900 µl de agua, agitando de nuevo otro minuto, obteniéndose una relación final de metanol/agua (10/90, v/v). La totalidad del extracto reconstruido se pasó por una columna de purificación de extracción en fase sólida (Oasis® HLB, Romer, Romer Labs, Austria), con un flujo de una gota por segundo, que previamente fue activada y acondicionada con 2 ml de metanol y 2 ml de metanol/agua (10/90, v/v). Las columnas se lavaron con 1 ml de metanol/agua (20/80, v/v) y se secaron

pasando un flujo de aire a través de la columna. Posteriormente, las micotoxinas se eluyeron con 1 ml de metanol. El extracto purificado se evaporó con aire a 50 °C y los residuos se resuspendieron en 500 µl de metanol/agua (20/80, v/v) agitando durante 1 min. Finalmente el extracto se pasó a través de un filtro de 0,45 µm de celulosa regenerada (Minisart®, Sartorius Stedim, Alemania).

Análisis LC/MS/MS: se utilizó un sistema QTrap MS/MS de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.) equipado con un ionizador electrospray (ESI) de interfase (fuente de iones) y un sistema 1100 serie micro-LC que comprende una bomba binaria y un microinyector automático de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). La columna cromatográfica utilizada fue Kinetex C18 (100 mm x 2,10 mm, 2,6 µm tamaño de partícula, Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) que estaba precedida por un filtro KrudKatcher Ultra (0,5 µm x 4 mm, Phenomenex, EE.UU.). La columna se mantuvo a 40 °C. El volumen de inyección fue de 20 µl (equivalente a 0,04 gr de muestra). El eluyente A fue agua, y el B metanol, ambos con ácido acético 0,5% y acetato de amonio 1 mM. El gradiente de elución se realizó cambiando la composición de la fase móvil de la siguiente forma: la proporción del eluyente B se aumentó linealmente desde el 10% hasta el 40% en 4 min, después al 63% en 27 min, se volvió a las condiciones iniciales en 1 min y se mantuvo constante durante 7 min, para reequilibrar la columna. El flujo de la fase móvil fue de 200 µl/min.

Cuantificación: para la cuantificación se construyó una curva de calibración en matriz. Para ello, una muestra blanco de maíz previamente analizada se purificó por quintuplicado utilizando el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se elaboró una solución madre a partir de soluciones comerciales de cada toxina (Biopore Referenzsubstanzen GmbH, Tulln, Austria) que contenía 10 µg/ml de DON, 0,25 µg/ml de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y OTA y 2,5 µg/ml de HT-2, T-2, y ZEA. Para construir la curva de calibración, distintas alícuotas de la solución madre (10, 50, 100, 150, 200 µl) se añadieron al extracto de la muestra blanco. Las muestras se evaporaron, resuspendieron y se filtraron siguiendo el mismo protocolo descrito para las muestras problema. La cuantificación se realizó midiendo las áreas de los picos de los cromatogramas *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) y comparándolas con la correspondiente recta de calibración obtenida con los estándares. El LOD fue de 0,25 µg/kg para OTA, 0,5 µg/kg para AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>, 1,0 µg/kg para AFB<sub>2</sub>, 1,5 µg/kg para AFG<sub>2</sub>, 3 µg/kg para ZEA, 5 µg/kg para T-2, 10 µg/kg para HT-2 y 35 µg/kg para DON.

**b) Laboratorio Arbitral Agroalimentario (MAGRAMA)**

Preparación de las muestras (extracción y lavado): para la extracción, 12,5 gr de harina se homogenizaron con 100 ml de acetonitrilo/agua (80:20 v/v) en un agitador orbital (Excella® E24, New Brunswick Scientific, Eppendorf, Alemania) a 250 rpm durante 30 min. El extracto se pasó a través de papel de filtro estándar. A 4 ml del filtrado (equivalente a 0,5 gr de muestra) se le añadieron 25 µl de patrón interno de Zearalanona (ZAN) 1 µg/ml preparado en acetonitrilo/agua (80:20 v/v), obtenido por dilución a partir de la solución comercial de 10 µg/ml (Romer Labs, Austria). La totalidad del extracto se pasó por una columna de purificación de extracción en fase sólida (Bond Elut-Mycotoxin (Agilent Technologies, EE.UU.) con un flujo de una gota por segundo. El extracto se evaporó en un *speed vac* (Savant SC100, Thermo Fisher Scientific, Austria) a 50 °C y los residuos se resuspendieron en 100 µl de metanol agitando durante 1 min. Posteriormente, se añadieron 1900 µl de eluyente A/metanol (1/1, v/v), siendo el eluyente A agua con ácido acético 0,1% y acetato de amonio 5 mM. Para finalizar, el extracto se pasó a través de un filtro de 0,22 µm de celulosa regenerada (Minisart®, Sartorius Stedim, Alemania).

Análisis LC/MS/MS: se utilizó un sistema 325 LC/MS (Varian Inc.) equipado con un ESI de interfase (fuente de iones) y un sistema de HPLC que comprende una bomba binaria 212 LC y un microinyector automático 460 LC de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). La columna cromatográfica utilizada fue Luna C18 (150 mm x 2 mm, 3 µm tamaño de partícula, Phenomenex, Torrance, CA, USA) con un pre-filtro (4 mm x 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) la cual se mantuvo a temperatura ambiente. El volumen de inyección fue de 20 µl (equivalente a 0,005 gr de muestra). El eluyente A fue agua con ácido acético 0,1% y acetato de amonio 5 mM, y el B metanol con un 2% de eluyente A. El gradiente de elución se realizó cambiando la composición de la fase móvil de la siguiente forma: la proporción del eluyente B se aumentó linealmente desde el 30% hasta el 100% en 5 min manteniéndose esta proporción durante 6 min, después se volvió a las condiciones iniciales en 6 s y se mantuvo constante durante 5 min y 54 s, para reequilibrar la columna. El flujo de la fase móvil fue de 200 µl/min.

Cuantificación: para la cuantificación también se realizó una curva de calibración en matriz. Primero se elaboró una solución madre a partir de soluciones comerciales de cada toxina (Biopore Referenzsubstanzen GmbH, Tulln, Austria) que contenía 2,5 µg/ml de DON y 0,25 µg/ml de HT-2, T-2 y ZEA, disueltas en eluyente A/metanol (1/1, v/v). Para construir la curva de calibración, 4 ml del filtrado de un extracto de maíz blanco (libre de

micotoxinas) sin adición previa de ZAN se secó a 50 °C y se redisolvió en 100 µl de metanol. Posteriormente se añadieron 25 µl de ZAN 1 µg/ml y volúmenes variables (20, 40, 200, 400 y 600 µl) de la solución madre. A continuación cada patrón se completó hasta 2 ml con eluyente A/metanol (1/1, v/v). La cuantificación se realizó midiendo las áreas de los picos de los cromatogramas MRM y comparándolas con la correspondiente recta de calibración obtenida con los estándares. El LOD fue de 3 µg/kg para ZEA, 5 µg/kg para T-2 y HT-2, 5 µg/kg para DON.

### 3.2.5. Análisis estadísticos

Para analizar las diferencias en la presencia de las especies de hongos micotoxígenos en las mazorcas de maíz Bt y no-Bt con daño de taladro se utilizó un modelo lineal general (MLG) con factores fijos y aleatorios. Debido a que las muestras recogidas de un mismo campo estuvieron sometidas a las mismas prácticas agronómicas y condiciones climatológicas, se calculó un porcentaje de contaminación de cada especie de hongo para cada muestreo por campo, el cual se transformó con el arcoseno  $\sqrt{x}$  para normalizarlo. Los factores fijos que se analizaron fueron el año y el tratamiento (Bt y no-Bt), y su interacción, incorporándose como factor aleatorio el campo anidado al año, ya que no se muestrearon los mismos campos en todos los años. Con este mismo modelo se analizaron las diferencias en la concentración de fumonisinas entre las muestras de mazorcas procedentes de campos de maíz Bt y no-Bt, ya que sólo se obtuvo un número considerable de muestras contaminadas en el caso de estas micotoxinas. Los datos se transformaron previamente con el  $\ln(x+1)$  para normalizarlos. Por último, con el mismo modelo se analizaron las diferencias en la presencia de las especies de hongos micotoxígenos entre las larvas de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* recogidas de plantas de maíz no-Bt. Para ello, se calculó un porcentaje de contaminación de cada especie de hongo para cada muestreo por campo y especie de taladro, y este valor se transformó con el arcoseno  $\sqrt{x}$ . Para este análisis los factores fijos que se analizaron fueron el año y la especie de taladro (*O. nubilalis* y *S. nonagrioides*), y su interacción, incorporándose como factor aleatorio el campo anidado al año. Para todos los análisis cuando se encontró una interacción significativa entre los factores año y tratamiento o año y especie de taladro, se analizaron las diferencias entre tratamientos o especies en cada año por separado.

Para analizar, desde un punto de vista gráfico, la relación entre la presencia de los hongos micotoxígenos y de fumonisinas en las mazorcas se realizó un análisis de correspondencias múltiples (ACM). Este análisis es una técnica multivalente descriptiva para variables categóricas que descompone la  $\chi^2$  total de tal forma que identifica el menor número de dimensiones en las que son representadas las desviaciones de los valores esperados respecto a los observados (Greenacre y Hastei, 1987). La representación gráfica reproduce la distancia entre las frecuencias relativas de las variables a lo largo de todas las observaciones. Así, dos categorías de variables distintas estarán muy relacionadas cuando estas categorías tiendan a aparecer próximas en las observaciones. Las variables que se incluyen para el cálculo de las  $\chi^2$  (variables activas) fueron la presencia o ausencia de fumonisinas y de las especies del género *Fusarium*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, y las especies del género *Aspergillus*, agregado *A. niger* y *A. flavus*. Como variables suplementarias se incluyeron el área (Extremadura, Albacete y Valle del Ebro) y el tipo de maíz (Bt y no-Bt). Además, con este mismo análisis se estudió la relación entre la presencia de los hongos más abundantes identificados en los taladros con los encontrados en la mazorcas. Para ello, se relacionó la presencia de las especies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. graminearum* en alguna de las larvas de taladro recogidas en cada planta con su presencia en la mazorca de esa misma planta.

Todos los análisis se realizaron con el software SAS (Versión 9.4), utilizándose un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. Variables ambientales**

Las condiciones meteorológicas de precipitación y temperatura durante el periodo del cultivo de maíz en los dos años en los que se llevó a cabo el estudio se registraron en las tres áreas seleccionadas (Extremadura, Albacete y Valle del Ebro).

Extremadura registró escasas precipitaciones durante los meses de junio, julio y agosto, y presentó los periodos más largos en los que no se produjo ninguna precipitación. Desde junio hasta el 15 de septiembre las temperaturas máximas diarias superaron de media los 30 °C en los dos años. Las temperaturas mínimas medias oscilaron entre los 13,2 y 16,0

°C en 2011, y 9,8 y 14,7 °C en 2012. En la primavera de 2012 apenas llovió, a lo que se unió posteriormente un periodo prolongado de escasez de precipitaciones durante el verano (**Tabla 3.7**).

**Tabla 3.7.** Condiciones climáticas desde mayo hasta la fecha de muestreo en 2011 y 2012 en los campos de maíz situados en Extremadura, registradas por diferentes estaciones meteorológicas próximas a los puntos de muestreo.

Extremadura (media ± error estándar) <sup>a</sup>						
Año	Mes	Precipitación total (mm)	Días de lluvia	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)
2011	Mayo	57,7 ± 14,9	12,8 ± 1,8	20,0 ± 0,2	26,6 ± 0,2	13,4 ± 0,4
	Junio	4,0 ± 2,3	2,0 ± 0,7	22,7 ± 0,1	30,5 ± 0,1	14,3 ± 0,3
	Julio	0	0,3 ± 0,3	24,4 ± 0,2	32,6 ± 0,1	15,5 ± 0,3
	Agosto	13,0 ± 4,6	4,5 ± 0,9	24,1 ± 0,2	32,4 ± 0,2	16,0 ± 0,2
	Septiembre <sup>b</sup>	16,2 ± 4,8	1,75 ± 0,5	21,9 ± 0,1	31,1 ± 0,3	13,2 ± 0,2
2012	Mayo	39,4 ± 0,4	8,5 ± 0,5	19,9 ± 0,2	27,0 ± 0,5	11,0 ± 0,5
	Junio	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,5	23,1 ± 0,1	30,8 ± 0,6	14,3 ± 0,6
	Julio	0	0	24,3 ± 0,4	32,7 ± 0,3	14,7 ± 0,6
	Agosto	0	0	24,1 ± 0,5	32,8 ± 0,3	12,3 ± 0,2
	Septiembre <sup>b</sup>	27,7 ± 10,3	1,0 ± 0	22,4 ± 0,6	31,3 ± 0,3	9,8 ± 0,4

<sup>a</sup> Valores medios calculados a partir de los datos registrados en las estaciones meteorológicas de Moraleja, Aldehuela del Jerte y Don Benito para 2011 y de Palazuelo y Madrigalejo en 2012.

<sup>b</sup> Valores considerados hasta la fecha de muestreo (15 de septiembre para 2011 y 18 de septiembre para 2012).

En Albacete las temperaturas máximas superaron de media los 30 °C en junio de 2012 y en julio y agosto de 2011 y 2012, aunque en ninguno de los años se superó este valor en el mes de septiembre. Los meses en los que se registraron las menores precipitaciones de todo el cultivo fueron julio y agosto en ambos años, siendo las precipitaciones inferiores a los 4 mm en total por mes. En el año 2012 se produjeron menores lluvias en mayo que en el año 2011. Las temperaturas mínimas y máximas fueron muy similares en los dos años (**Tabla 3.8**).

**Tabla 3.8.** Condiciones climáticas desde mayo hasta la fecha de muestreo en 2011 y 2012 en los campos de maíz situados en Albacete, registradas por diferentes estaciones meteorológicas próximas a los puntos de muestreo.

Albacete (media $\pm$ error estándar) <sup>a</sup>						
Año	Mes	Precipitación total (mm)	Días de lluvia	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)
2011	Mayo	44,5 $\pm$ 2,7	13,3 $\pm$ 1,5	16,6 $\pm$ 0,2	23,9 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,3
	Junio	15,6 $\pm$ 1,7	4,7 $\pm$ 0,3	21,1 $\pm$ 0,1	29,5 $\pm$ 0,3	12,7 $\pm$ 0,2
	Julio	1,8 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 0,3	23,6 $\pm$ 0,1	32,1 $\pm$ 0,3	14,7 $\pm$ 0,2
	Agosto	3,6 $\pm$ 2,4	2,0 $\pm$ 0	24,3 $\pm$ 0,2	33,4 $\pm$ 0,3	15,3 $\pm$ 0,1
	Septiembre	12,6 $\pm$ 6,5	6,7 $\pm$ 0,9	20,3 $\pm$ 0,1	28,7 $\pm$ 0,2	12,3 $\pm$ 0,03
2012	Mayo	14,4 $\pm$ 1,6	5,7 $\pm$ 0,3	17,4 $\pm$ 0,2	25,3 $\pm$ 0,2	9,0 $\pm$ 0,2
	Junio	8,3 $\pm$ 4,0	4,0 $\pm$ 1,0	22,7 $\pm$ 0,4	31,3 $\pm$ 0,2	13,2 $\pm$ 0,2
	Julio	1,6 $\pm$ 1,2	1,7 $\pm$ 0,3	24,0 $\pm$ 0,6	33,0 $\pm$ 0,2	14,4 $\pm$ 0,2
	Agosto	0,5 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,6	25,3 $\pm$ 0,2	34,6 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,2
	Septiembre	61,7 $\pm$ 1,3	5,7 $\pm$ 1,2	18,9 $\pm$ 0,9	26,7 $\pm$ 0,1	11,0 $\pm$ 0,2

<sup>a</sup> Valores medios calculados a partir de los datos registrados en las estaciones meteorológicas de Motilleja, La Gineta y Albacete.

En el Valle del Ebro los valores de precipitación total fueron, en general, más altos que en las otras dos áreas con las lluvias abundantes a lo largo del cultivo. Las temperaturas máximas superaron de media los 30 °C en julio a agosto, pero debido a que en esta región la recogida del maíz es más tardía (mediados de octubre) que en las otras dos áreas, durante la última fase del cultivo (septiembre y octubre) las temperaturas máximas no superaron de media los 30 °C. El año 2012 fue más cálido y seco debido a las menores precipitaciones que se produjeron durante la primavera (**Tabla 3.9**).

**Tabla 3.9.** Condiciones climáticas desde mayo hasta la fecha de muestreo en 2012 y 2013 en los campos de maíz situados en el Valle del Ebro, registradas por diferentes estaciones meteorológicas próximas a los puntos de muestreo.

Valle del Ebro (media $\pm$ error estándar) <sup>a</sup>						
Año	Mes	Precipitación total (mm)	Días de lluvia	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)
2012	Mayo	13,2 $\pm$ 6,2	9,0 $\pm$ 2,1	18,2 $\pm$ 0,6	25,9 $\pm$ 0,7	10,9 $\pm$ 0,5
	Junio	32,6 $\pm$ 2,8	5,3 $\pm$ 0,3	22,6 $\pm$ 0,3	31,3 $\pm$ 0,2	14,3 $\pm$ 0,6
	Julio	10,8 $\pm$ 9,1	3,7 $\pm$ 1,2	22,8 $\pm$ 0,4	31,5 $\pm$ 0,3	14,7 $\pm$ 0,6
	Agosto	4,6 $\pm$ 3,4	2,7 $\pm$ 1,8	25,0 $\pm$ 0,2	35,2 $\pm$ 1,3	16,9 $\pm$ 0,4
	Septiembre	23,7 $\pm$ 2,7	5,3 $\pm$ 0,9	19,6 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,2	12,3 $\pm$ 0,2
	Octubre <sup>b</sup>	23,0 $\pm$ 4,0	4,7 $\pm$ 0,7	16,5 $\pm$ 0,4	24,6 $\pm$ 0,5	9,8 $\pm$ 0,4
2013	Mayo	40,7 $\pm$ 8,0	14,0 $\pm$ 1,1	12,4 $\pm$ 0,6	18,5 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 0,5
	Junio	58,6 $\pm$ 11,5	7,5 $\pm$ 0,5	18,0 $\pm$ 0,6	25,3 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 0,5
	Julio	24,6 $\pm$ 11,7	10,8 $\pm$ 1,4	24,1 $\pm$ 0,2	32,6 $\pm$ 0,3	15,9 $\pm$ 0,6
	Agosto	5,1 $\pm$ 3,0	2,0 $\pm$ 1,4	22,1 $\pm$ 0,4	30,3 $\pm$ 0,5	14,3 $\pm$ 0,4
	Septiembre	19,8 $\pm$ 4,6	7,0 $\pm$ 0	19,0 $\pm$ 0,4	27,0 $\pm$ 0,4	11,8 $\pm$ 0,5
	Octubre <sup>b</sup>	20,6 $\pm$ 9,2	4,3 $\pm$ 1,9	15,7 $\pm$ 0,4	22,6 $\pm$ 0,6	9,7 $\pm$ 0,3

<sup>a</sup> Valores medios calculados a partir de los datos registrados en las estaciones meteorológicas de Luna, Épila y Candanos en 2012 y de Artejena, Ablitas, Tardienta y Candanos en 2013.

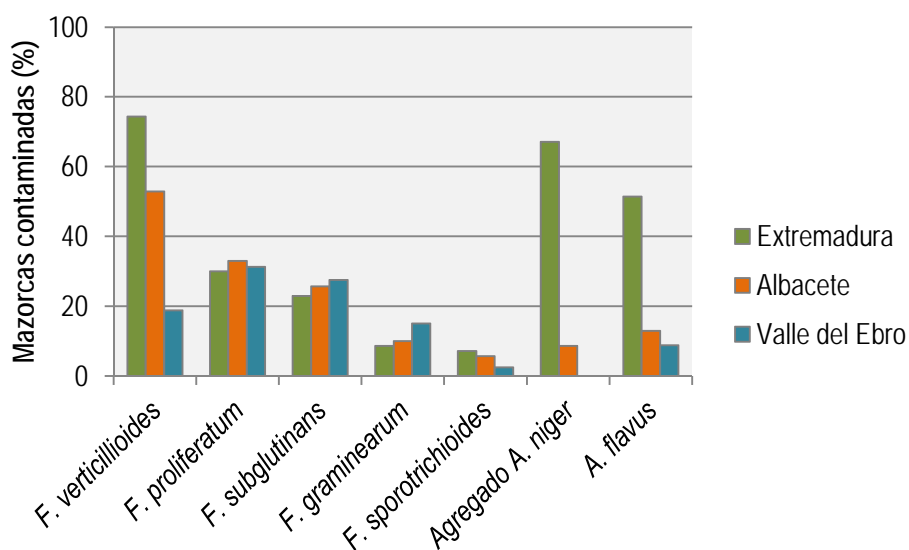
<sup>b</sup> Valores considerados hasta la fecha de muestreo (16 de octubre para 2012 y 15 de octubre para 2013).

### 3.3.2. Presencia de hongos micotoxígenos en las mazorcas de maíz

La presencia de 16 especies diferentes de hongos micotoxígenos de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* se analizó en un total de 219 mazorcas recogidas durante dos años de muestreo en las tres regiones. En el conjunto de las muestras analizadas se detectaron cinco especies diferentes de hongos del género *Fusarium*: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum* y *F. sporotrichioides*. *Fusarium verticillioides* fue la especie que presentó el porcentaje de contaminación más alto, encontrándose en el 47,3% de las mazorcas analizadas. A continuación, las especies más frecuentes fueron *F. proliferatum* (31,4%) y *F. subglutinans* (25,5%), y de forma más esporádica se encontraron mazorcas con *F. graminearum* (11,4%) y *F. sporotrichioides* (5%). Además, se encontraron muestras positivas para los ensayos de PCR específicos del género *Aspergillus*. El 24,2% de las mazorcas estuvieron contaminadas con el agregado *A. niger* (formado por las especies *A. niger* y *A. tubingensis*) y el 23,7% con *A. flavus*. En ninguna mazorca analizada en este estudio se detectaron *F. culmorum*, *F.*

*equiseti*, *F. poae*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii*.

La incidencia de estas especies varió entre las regiones estudiadas, encontrándose que *F. verticillioides* fue la especie dentro del género *Fusarium* más frecuente en Extremadura y Albacete, mientras que en el Valle del Ebro no hubo una clara dominancia de una especie. Extremadura fue la única región en la que se obtuvieron porcentajes altos de contaminación con los hongos de postcosecha identificados, mientras que en Albacete y el Valle del Ebro muy pocas mazorcas presentaron este tipo de hongos (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Porcentaje de mazorcas de maíz contaminadas con cada especie de hongo micotoxígeno recogidas en campos de Extremadura (n=70), Albacete (n=70) y Valle del Ebro (n=79).

En Extremadura, entre el 80 y el 100% de las mazorcas de cada campo estuvieron contaminadas con hongos micotoxígenos, tanto procedentes de cultivos de maíz no-Bt con daño de taladro como Bt, en los dos años de estudio. Al analizar cada hongo por separado se encontró que la interacción entre los factores año y tratamiento fue significativa para las tres especies de precosecha más abundantes, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. Por ello, en estos tres casos se estudiaron las diferencias entre maíz Bt y no-Bt de cada año por separado, detectándose que en el año 2011 las mazorcas con daño estuvieron significativamente más contaminadas con estas tres especies que las de maíz Bt. Solo de forma esporádica se encontró alguna mazorca afectada con *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*, no existiendo diferencias entre

tratamientos. Dentro del género *Aspergillus*, no se encontraron diferencias en el porcentaje de infección entre los dos tipos de maíz. En *A. flavus* se encontraron diferencias significativas entre años, siendo más abundante en 2011 (**Tabla 3.10**).

En Albacete, en el año 2011 el porcentaje de mazorcas contaminadas con alguna especie de hongo micotoxígeno fue del 80% para las de maíz Bt y del 87,7% para las de no-Bt, mientras que para 2012, fue del 25% para las mazorcas de maíz Bt y del 55% para las no-Bt. En las mazorcas de esta área apareció principalmente *F. verticillioides*, encontrándose un porcentaje significativamente más alto en el año 2011, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de maíz. La segunda especie más habitual fue *F. proliferatum*, que fue significativamente más frecuente en el maíz no-Bt. *Fusarium subglutinans* apareció en ambos años de estudio en los dos tipos de maíz sin diferencias significativas. *Fusarium sporotrichioides* solo apareció en cuatro mazorcas, recolectadas todas de un mismo campo de maíz no-Bt. *Fusarium graminearum* y las especies de postcosecha se detectaron principalmente en el año 2011 en el maíz no-Bt, pero debido que los campos analizados mostraron mucha variación en la contaminación con estos hongos, se obtuvo un elevado error y no se encontraron diferencias significativas ni entre tratamientos ni entre años (**Tabla 3.10**).

En el Valle del Ebro, el porcentaje de mazorcas de maíz Bt contaminadas fue de aproximadamente del 30% en ambos años de estudio, mientras que en las mazorcas no-Bt osciló entre el 85% y el 95%. Las especies *F. proliferatum* y *F. subglutinans* fueron significativamente más frecuentes en las mazorcas de maíz no-Bt. El resto de las especies del género *Fusarium* fueron menos habituales y no se encontraron diferencias significativas ni entre años ni entre tratamientos. Solo siete mazorcas de las 80 recogidas en los campos situados en el Valle del Ebro estuvieron contaminadas con *A. flavus*, y ninguna muestra lo estuvo con el agregado *A. niger* (**Tabla 3.10**).

**Tabla 3.10.** Mazorcas de campos de maíz no-Bt con daño de taladro y maíz Bt contaminadas con hongos micotoxígenos recogidas en Extremadura, Albacete y el Valle del Ebro entre los años 2011 y 2013 y resultados del análisis del modelo lineal general (MLG).

		Mazorcas contaminadas por campo (% medio $\pm$ error estándar) <sup>a</sup>						Resultados MLG		
Área	Especie de hongo	2011		2012		2013		Año	T ratamiento	Año x T ratamiento
		Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	F (p) (g.l. = 1)	F (p) (g.l. = 1)	F (p) (g.l. = 1)
Extremadura	<i>F. verticillioides</i>	35,0 $\pm$ 5,0	90,0 $\pm$ 5,8	86,7 $\pm$ 13,3	93,3 $\pm$ 6,7			#	#	8,96 (0,03)*
	<i>F. proliferatum</i>	5,0 $\pm$ 5,0	70,0 $\pm$ 12,9	26,7 $\pm$ 17,6	13,3 $\pm$ 13,3			#	#	13,49 (0,02)*
	<i>F. subglutinans</i>	0	80,0 $\pm$ 20,0	0	0			#	#	15,61 (0,01)*
	<i>F. graminearum</i>	0	15,0 $\pm$ 9,6	0	20,0 $\pm$ 11,6			0,13 (0,73)	6,43 (0,05)	0,13 (0,73)
	<i>F. sporotrichioides</i>	5,0 $\pm$ 5,0	10,0 $\pm$ 10,0	0	13,3 $\pm$ 13,3			0,04 (0,84)	0,7 (0,44)	0,26 (0,63)
	Agregado <i>A. niger</i>	50,0 $\pm$ 12,9	95,0 $\pm$ 5,0	53,3 $\pm$ 29,1	66,7 $\pm$ 17,6			0,68 (0,45)	2,92 (0,15)	0,71 (0,44)
	<i>A. flavus</i>	80,0 $\pm$ 20,0	70,0 $\pm$ 17,3	20,0 $\pm$ 11,6	20,0 $\pm$ 11,6			10,91 (0,02)*	0,22 (0,66)	0,22 (0,66)
Albacete	<i>F. verticillioides</i>	60,0 $\pm$ 23,1	86,7 $\pm$ 13,3	20,0 $\pm$ 8,2	55,00 $\pm$ 9,57			37,51 (<0,00)*	2,37 (0,18)	0,02 (0,90)
	<i>F. proliferatum</i>	0	80,0 $\pm$ 11,6	5,0 $\pm$ 5,0	50,00 $\pm$ 12,91			2,11 (0,21)	31,76 (<0,00)*	2,47 (0,18)
	<i>F. subglutinans</i>	33,3 $\pm$ 24,0	60,0 $\pm$ 23,0	5,0 $\pm$ 5,0	33,33 $\pm$ 9,57			3,7 (0,11)	4,44 (0,09)	0,89 (0,39)
	<i>F. graminearum</i>	6,7 $\pm$ 6,7	40,0 $\pm$ 23,0	0	0			22,66 (0,01)*	1,27 (0,31)	1,27 (0,31)
	<i>F. sporotrichioides</i>	0	26,7 $\pm$ 26,7	0	0			1,43 (0,29)	1,43 (0,29)	1,43 (0,29)
	Agregado <i>A. niger</i>	0	40,0 $\pm$ 20,0	0	0			5,71 (0,06)	5,71 (0,06)	5,71 (0,06)
	<i>A. flavus</i>	0	53,3 $\pm$ 24,0	5,0 $\pm$ 5,0	0			#	#	10,57 (0,03)*
Valle del Ebro	<i>F. verticillioides</i>			5,0 $\pm$ 5,0	15,0 $\pm$ 5,0	31,3 $\pm$ 12,7	25,0 $\pm$ 9,6	1,86 (0,22)	0,83 (0,40)	2,63 (0,16)
	<i>F. proliferatum</i>			10,0 $\pm$ 5,8	65,0 $\pm$ 15,0	0	50,0 $\pm$ 17,3	1,35 (0,29)	19,00 (<0,00)*	0,14 (0,72)
	<i>F. subglutinans</i>			10,0 $\pm$ 5,8	70,0 $\pm$ 12,9	5,0 $\pm$ 5,0	25,0 $\pm$ 18,9	4,15 (0,09)	9,9 (0,02)*	2,48 (0,17)
	<i>F. graminearum</i>			20,0 $\pm$ 14,1	20,0 $\pm$ 14,1	5,0 $\pm$ 5,0	15,0 $\pm$ 9,6	0,71 (0,43)	0,18 (0,69)	0,18 (0,69)
	<i>F. sporotrichioides</i>			0	10,0 $\pm$ 5,8	0	0	3,00 (0,13)	3,00 (0,13)	3,00 (0,13)
	Agregado <i>A. niger</i> <sup>b</sup>			0	0	0	0	-	-	-
	<i>A. flavus</i>			10,0 $\pm$ 10,0	0	0	25,0 $\pm$ 18,9	0,50 (0,51)	0,50 (0,51)	3,25 (0,12)

<sup>a</sup> Calculado con los porcentajes de contaminación obtenidos al analizar 5 mazorcas de cada campo y tratamiento, siendo el número de campos analizados 4 (Extremadura 2011, Albacete 2012 y Valle del Ebro 2012 y 2013) y 3 (Extremadura 2012 y Albacete 2011).

<sup>b</sup> No se pudo realizar el análisis MLG por falta de datos.

# Los resultados de análisis estadístico para los factores año y tratamientos fueron omitidos cuando la interacción entre ambos factores fue significativa. En este caso las diferencias entre tratamientos se analizaron separando los datos de los tres años, siendo este el caso en Extremadura de *F. verticillioides* (F = 24,01;  $p < 0,00$  para 2011 y F = 1,00;  $p = 0,42$  para 2012), *F. proliferatum* (F = 18,05;  $p = 0,01$  para 2011 y F = 2,73;  $p = 0,24$  para 2012) y *F. subglutinans* (F = 21,86;  $p = 0,02$  para 2011) y en Albacete de *A. flavus* (F = 1,00;  $p = 0,42$  para 2011).

\* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3. Presencia de micotoxinas en muestras de mazorcas de maíz

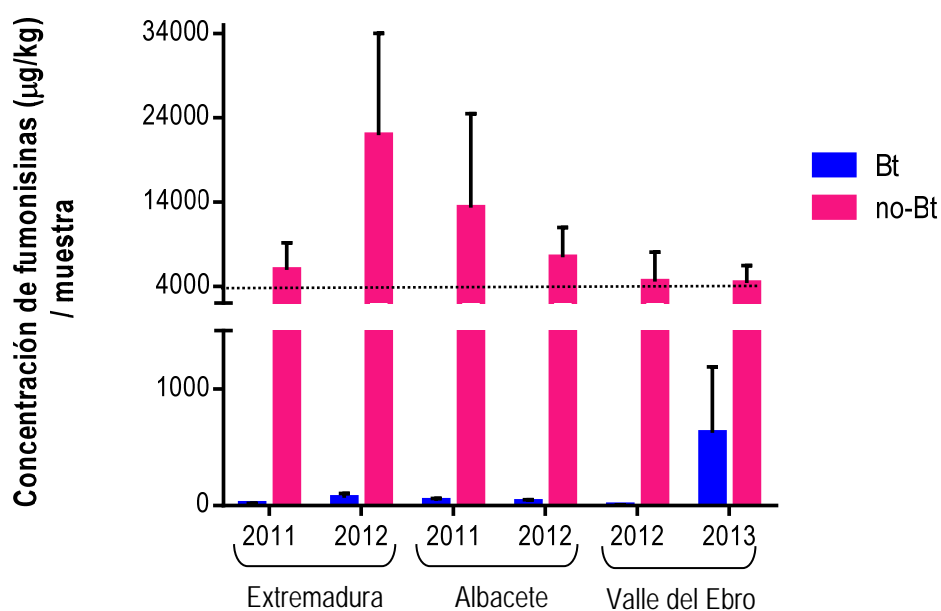
En las tres áreas de estudio, las fumonisinas fueron las micotoxinas que se encontraron con mayor frecuencia en las muestras de mazorcas de maíz Bt y no-Bt. El resto de micotoxinas analizadas (DON, T-2, H-T2, ZEA, aflatoxinas y OTA) se hallaron solo esporádicamente en ambos tipos de maíz (**Tabla 3.11**). En los **anexos 1-6** se adjuntan las tablas con la concentración de micotoxinas que se obtuvo en cada muestra analizada.

**Tabla 3.11.** Porcentaje de muestras de mazorcas de campos de maíz no-Bt con daño de taladro y maíz Bt contaminadas con micotoxinas recogidas en Extremadura, Albacete y Valle del Ebro entre los años 2011 y 2013. Los valores distintos de cero están marcados en negrita.

	Muestras contaminadas (%) <sup>a</sup>											
	Extremadura				Albacete				Valle del Ebro			
	2011		2012		2011		2012		2012		2013	
	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt	Bt	no-Bt
Fumonisin (FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub> )	50,0	100,0	30,0	100,0	46,7	73,3	30,0	100,0	10,0	50,0	31,6	70,0
DON	0	5,0	0	0	0	20,0	0	0	25,0	20,0	5,3	25,0
T-2	10,0	5,0	0	0	6,7	0	0	0	0	0	0	0
H-T2	15,0	10,0	0	0	0	13,3	0	0	0	0	0	0
ZEA	0	0	0	0	0	6,7	0	5,5	0	0	0	0
Aflatoxinas (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> )	0	0	n.a.	n.a.	0	6,7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
OTA	0	0	n.a.	n.a.	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

<sup>a</sup> El número de muestras para cada tipo de maíz fue 10 (2012 Extremadura; 2012 Albacete), 15 (2011 Albacete), 19 [2013 Valle del Ebro (maíz Bt)] y 20 [2011 Extremadura; 2012 Valle del Ebro; 2013 Valle del Ebro (maíz no-Bt)]. n.a.: no analizado.

Sólo en el caso de las fumonisinas se obtuvo un número suficiente de muestras contaminadas para poder comparar las diferencias en la concentración entre las muestras procedentes de campos de maíz Bt y no-Bt. Los resultados del análisis MLG indicaron que en las tres áreas de estudio la concentración de fumonisinas fue significativamente más alta en las mazorcas de maíz no-Bt que en las de maíz Bt, independientemente del año de estudio (**Figura 3.3**; **Tabla 3.12**). En las tres regiones y en todos los años de estudio, los valores medios de fumonisinas encontrados en las mazorcas no-Bt dañadas superaron el límite máximo establecido por la UE para el maíz no elaborado destinado al consumo humano (4.000 µg/kg) (**Figura 3.3**). Sorprendentemente, la muestra con la concentración más alta de fumonisinas que se encontró presentaba 168.499 µg/kg, lo que supone 42 veces el límite máximo legislado y procedía de un campo de maíz no-Bt de Albacete.



**Figura 3.3.** Concentración total de fumonisinas (media ± error estándar) en muestras de mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y maíz Bt, recogidas en Extremadura, Albacete y Valle del Ebro. La línea discontinua marca el contenido máximo en fumonisinas legislado por la UE en el maíz no elaborado destinado al consumo humano.

**Tabla 3.12.** Resultados del análisis del modelo lineal general (MLG) para la concentración media de fumonisinas en mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y maíz Bt en cada área de estudio.

	Resultados MLG		
	Año	Tratamiento	Año x Tratamiento
	F (p)	F (p)	F (p)
	(g.l. = 1)	(g.l. = 1)	(g.l. = 1)
Extremadura	0,80 (0,42)	43,98 (<0,00)*	1,44 (0,30)
Albacete	0,42 (0,56)	19,33 (0,02)*	1,66 (0,29)
Valle del Ebro	2,42 (0,17)	14,34 (0,01)*	0,01 (0,91)

\* indica diferencias significativas (p<0,05).

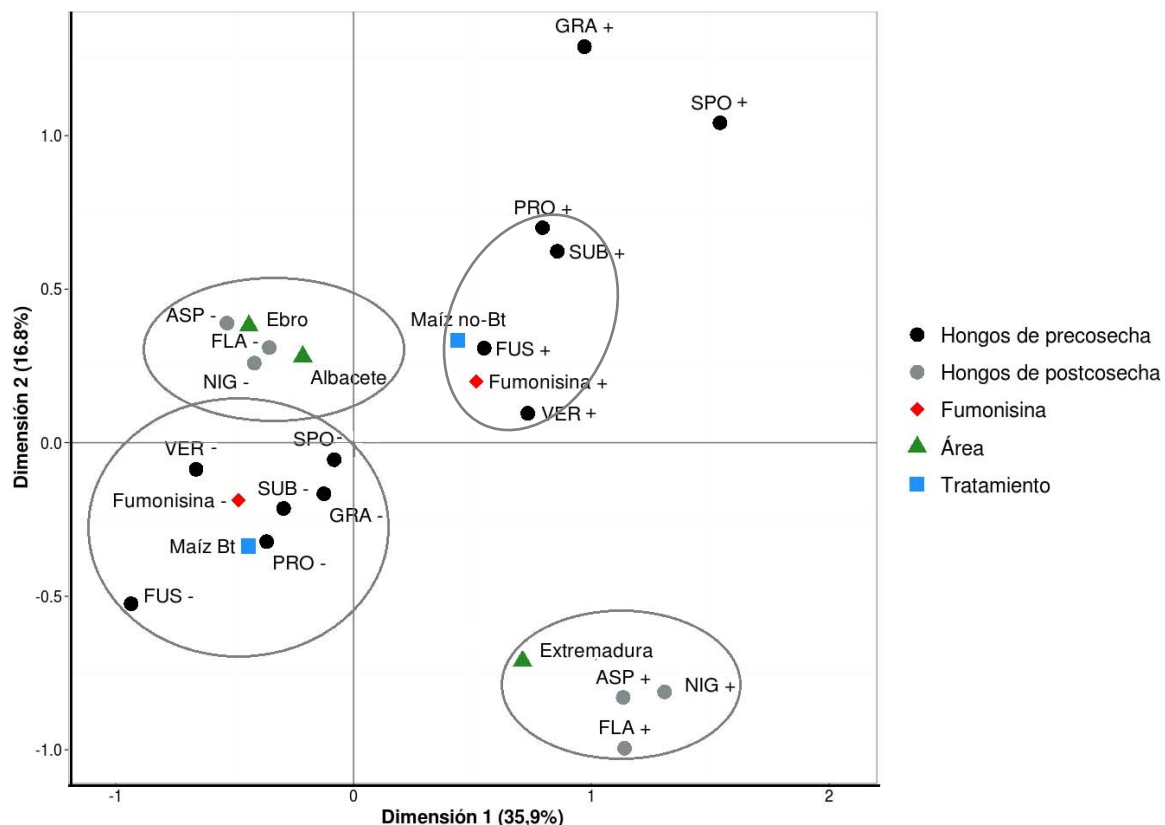
La reducción (R) de la concentración de fumonisinas en las mazorcas maíz Bt con respecto a las mazorcas dañadas de maíz no-Bt, calculada mediante la siguiente fórmula:

$$R (\%) = \left[ \frac{(\text{Nivel de micotoxinas en el maíz no-Bt} - \text{Nivel de micotoxinas en el maíz Bt})}{\text{Nivel de micotoxinas en maíz no-Bt}} \right] \times 100$$

fue superior al 99% en todos los años y en todas las áreas, a excepción del año 2013 en el Valle del Ebro, donde se obtuvo un valor del 85,6%.

### 3.3.4. Relación entre la presencia de hongos micotoxígenos y de fumonisinas en mazorcas de maíz

En la **figura 3.4** se muestra la representación de las dos primeras dimensiones obtenidas en el ACM con los valores de presencia o ausencia de los hongos micotoxígenos encontrados y la presencia o ausencia de fumonisinas en cada mazorca.



**Figura 3.4.** Análisis de correspondencias múltiples (ACM) de la presencia o ausencia de fumonisinas y la presencia (+) o ausencia (-) de los hongos micotoxígenos encontrados en cada mazorca (FUS: *Fusarium* spp.; VER: *F. verticillioides*; PRO: *F. proliferatum*; SUB: *F. subglutinans*; GRA: *F. graminearum*; SPO: *F. sporotrichioides*; ASP: *Aspergillus* spp.; NIG: agregado *A. niger*; FLA: *A. flavus*). Se incluyen como variables suplementarias el área (Extremadura, Albacete y Ebro) y el tratamiento (maíz Bt y no-Bt).

La primera dimensión distribuye los hongos y las fumonisinas según su presencia (coordenadas positivas) o ausencia (coordenadas negativas). En la segunda dimensión las coordenadas positivas agruparon la presencia de las especies de precosecha (*Fusarium*) junto con la ausencia de las especies de postcosecha (*Aspergillus*), mientras

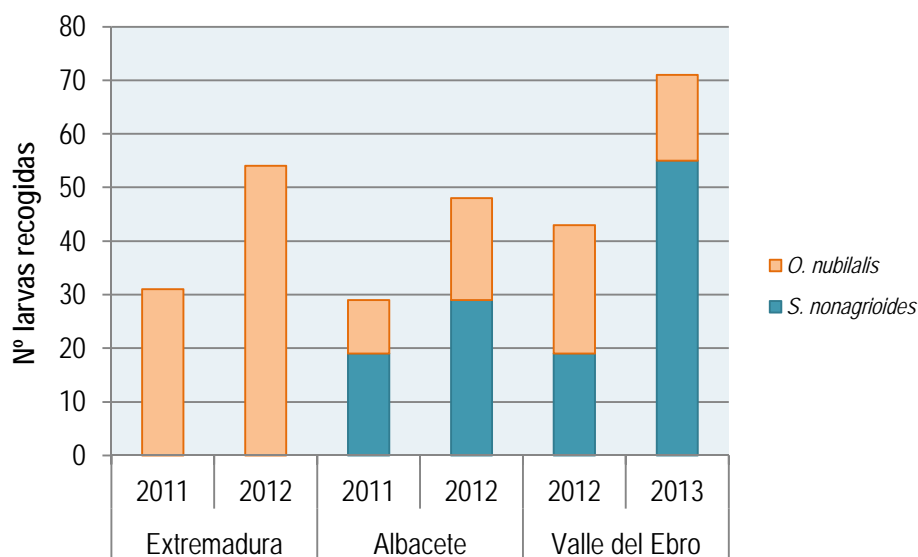
que en las coordenadas negativas ocurrió lo contrario. Ambas dimensiones explicaron el 52,7% de la desviación de los valores observados frente a los esperados.

Uniendo ambas dimensiones se pudieron diferenciar 4 grupos. Por un lado, el maíz no-Bt estuvo muy relacionado con la presencia de fumonisinas y de las especies de precosecha *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. En concreto hay que destacar que las mazorcas que presentaron fumonisinas, estaban contaminadas principalmente con *F. verticillioides* y que cuando apareció el hongo *F. proliferatum* también apareció *F. subglutinans*. Como cabría esperar no se encontró una relación clara entre la presencia de fumonisinas y de *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* y de los hongos de postcosecha. Por otro lado, el maíz Bt estuvo relacionado con la ausencia de hongos micotoxígenos y de fumonisinas. En cuanto a las áreas se observó que Albacete y el Valle del Ebro se situaban muy próximas a la ausencia de hongos de postcosecha, mientras que Extremadura está muy relacionada con su presencia.

### 3.3.5 Hongos micotoxígenos en los taladros del maíz

Durante los dos años de muestreo en las tres áreas de estudio se recogieron un total de 276 larvas de taladro en las plantas de maíz no-Bt, de las cuales 154 pertenecieron a la especie *O. nubilalis* y 122 a la especie *S. nonagrioides*. En Albacete y en el Valle del Ebro se encontraron ambas especies de taladro, mientras que en Extremadura todas las larvas recogidas fueron de *O. nubilalis* (**Figura 3.5**).

El 47,5% del total de larvas recogidas portaba alguna especie de hongo micotoxígeno. Las especies de hongos que se encontraron en los taladros coincidieron con las encontradas en las mazorcas, siendo las más frecuentes *F. verticillioides* (33,3% de las larvas), *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (ambas en el 23,2%), y de forma más puntual se encontró alguna larva con *F. graminearum* (12,3%), agregado *A. niger* (9,1%), *F. sporotrichioides* (1,1%) y *A. flavus* (2,9%). Además, también se encontró alguna larva que portaba *F. equiseti* (1,1%). En ningún taladro analizado se detectó *F. culmorum*, *F. poae*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii*.



**Figura 3.5.** Número de larvas de *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* recolectadas en el maíz no-Bt en función del año y área de muestreo.

En Extremadura, debido a que solo se encontraron larvas de *O. nubilalis* no se pudieron analizar diferencias entre las especies de taladro. En general, los porcentajes de contaminación fueron muy similares en los dos años de estudio, encontrándose que el 57,6% y 54,5% de las larvas en 2011 y 2012, respectivamente, portaba alguna especie de hongo. (**Tabla 3.13**).

En Albacete se recogieron las dos especies de taladro, aunque no se encontraron diferencias en la presencia de los hongos entre ambas. En 2011 en algunas larvas se encontraron hongos de postcosecha, aunque tampoco hubo diferencias en la contaminación entre ambas especies de taladro. Esta fue la única área en la que se encontró *F. equiseti* en tres larvas de *S. nonagrioides* recogidas de un mismo campo en dos plantas diferentes (**Tabla 3.13**).

En el Valle del Ebro, las larvas de ambas especies estuvieron contaminadas principalmente con especies del género *Fusarium*, no encontrándose diferencias significativas entre ambos taladros. En esta área, las larvas recogidas presentaron una escasa contaminación con hongos de postcosecha. Únicamente la frecuencia de aparición de *F. proliferatum* presentó diferencias significativas entre los años de estudio siendo más frecuente en el año 2011 (**Tabla 3.13**).

**Tabla 3.13.** Larvas de taladro (*O. nubilalis* y *S. nonagrioides*) que portaban hongos micotoxígenos recogidas en campos de maíz no-Bt de Extremadura, Albacete y el Valle del Ebro entre los años 2011 y 2013 y resultados del análisis del modelo lineal general (MLG).

		Larvas contaminadas por campo (% medio ± error estándar) <sup>a</sup>						Resultados MLG		
Área	Especie de hongo	2011		2012		2013		Año	Especie	Año x Especie
		<i>O. nubilalis</i>	<i>S. nonagrioides</i>	<i>O. nubilalis</i>	<i>S. nonagrioides</i>	<i>O. nubilalis</i>	<i>S. nonagrioides</i>	F (p) (g.l. = 1)	F (p) (g.l. = 1)	F (p) (g.l. = 1)
Extremadura	Taladros contaminados	57,6 ± 6,7		54,5 ± 16,6				0,02 (0,89)		
	<i>F. verticillioides</i>	50,1 ± 5,7		41,1 ± 4,8				1,46 (0,29)		
	<i>F. proliferatum</i>	12,5 ± 6,6		38,1 ± 12,3				3,38 (0,14)		
	<i>F. subglutinans</i>	16,2 ± 9,6		20,7 ± 15,1				0,06 (0,82)		
	<i>F. graminearum</i>	25,1 ± 7,0		25,7 ± 12,6				0,002 (0,97)		
	<i>F. sporotrichioides</i> <sup>b</sup>	6,3 ± 3,3		0				-		
	<i>F. equiseti</i> <sup>b</sup>	0		0				-		
	Agregado <i>A. niger</i>	25,1 ± 7,0		3,2 ± 3,2				8,08 (0,047)*		
	<i>A. flavus</i>	10,0 ± 6,5		4,2 ± 4,2				0,56 (0,50)		
Albacete	Taladros contaminados	75,0 ± 25,0	23,7	55,7 ± 26,0	28,4 ± 15,8			0,13 (0,74)	2,98 (0,22)	0,04 (0,86)
	<i>F. verticillioides</i>	66,7 ± 22,0	15,8	24,8 ± 12,7	14,7 ± 11,1			0,82 (0,42)	5,07 (0,39)	1,34 (0,55)
	<i>F. proliferatum</i>	16,7 ± 16,7	2,6	55,7 ± 26,0	25,9 ± 15,8			1,2 (0,32)	0,87 (0,42)	0,45 (0,55)
	<i>F. subglutinans</i>	50,0 ± 14,4	21,1	3,3 ± 3,3	3,0 ± 3,0			11,33 (0,02)*	1,99 (0,40)	0,17 (0,75)
	<i>F. graminearum</i>	33,3 ± 16,7	10,5	0	0			1,22 (0,32)	11,84 (0,08)	11,84 (0,08)
	<i>F. sporotrichioides</i> <sup>b</sup>	0	0	0	0			-	-	-
	<i>F. equiseti</i> <sup>b</sup>	0	7,9	0	0			-	-	-
	Agregado <i>A. niger</i>	58,3 ± 22,0	18,4	0	0			#	#	73,39 (0,01)*
	<i>A. flavus</i>	8,3 ± 8,3	7,9	0	0			2,27 (0,18)	0,002 (0,97)	0,002 (0,97)
Valle del Ebro	Taladros contaminados			42,5 ± 21,7	72,8 ± 17,2	48,5 ± 4,6	42,6 ± 8,8	0,58 (0,46)	0,59 (0,46)	1,29 (0,28)
	<i>F. verticillioides</i>			25,0 ± 14,4	61,3 ± 15,1	25,2 ± 16,2	23,8 ± 7,8	1,88 (0,20)	1,64 (0,23)	1,91 (0,19)
	<i>F. proliferatum</i>			30,0 ± 12,2	64,4 ± 14,6	14,1 ± 7,1	1,4 ± 1,4	13,52 (<0,00)*	1,03 (0,33)	4,82 (0,05)
	<i>F. subglutinans</i>			33,6 ± 22,5	69,2 ± 20,3	13,3 ± 13,3	27,7 ± 9,7	2,11 (0,19)	3,12 (0,13)	0,63 (0,46)
	<i>F. graminearum</i>			7,1 ± 7,1	3,6 ± 3,6	24,1 ± 14,5	1,4 ± 1,4	0,91 (0,37)	4,84 (0,07)	2,59 (0,16)
	<i>F. sporotrichioides</i> <sup>b</sup>			1,8 ± 1,8	0	0	0	-	-	-
	<i>F. equiseti</i> <sup>b</sup>			0	0	0	0	-	-	-
	Agregado <i>A. niger</i>			1,8 ± 1,8	0	0	2,8 ± 2,8	0,33 (0,60)	0,19 (0,69)	0,31 (0,32)
	<i>A. flavus</i> <sup>b</sup>			0	0	0	0	-	-	-

<sup>a</sup> Calculado con los porcentajes de contaminación obtenidos por campo y especie de taladro. El número de campos analizados fue: en Extremadura 4 en 2011 y 3 en 2012; en Albacete 3 para *O. nubilalis* en 2011 y 2012 y *S. nonagrioides* en 2012 y 1 para *S. nonagrioides* en 2011; y en el Valle del Ebro 3 para *O. nubilalis* en 2013 y 4 para *O. nubilalis* en 2012 y *S. nonagrioides* en 2012 y 2013.

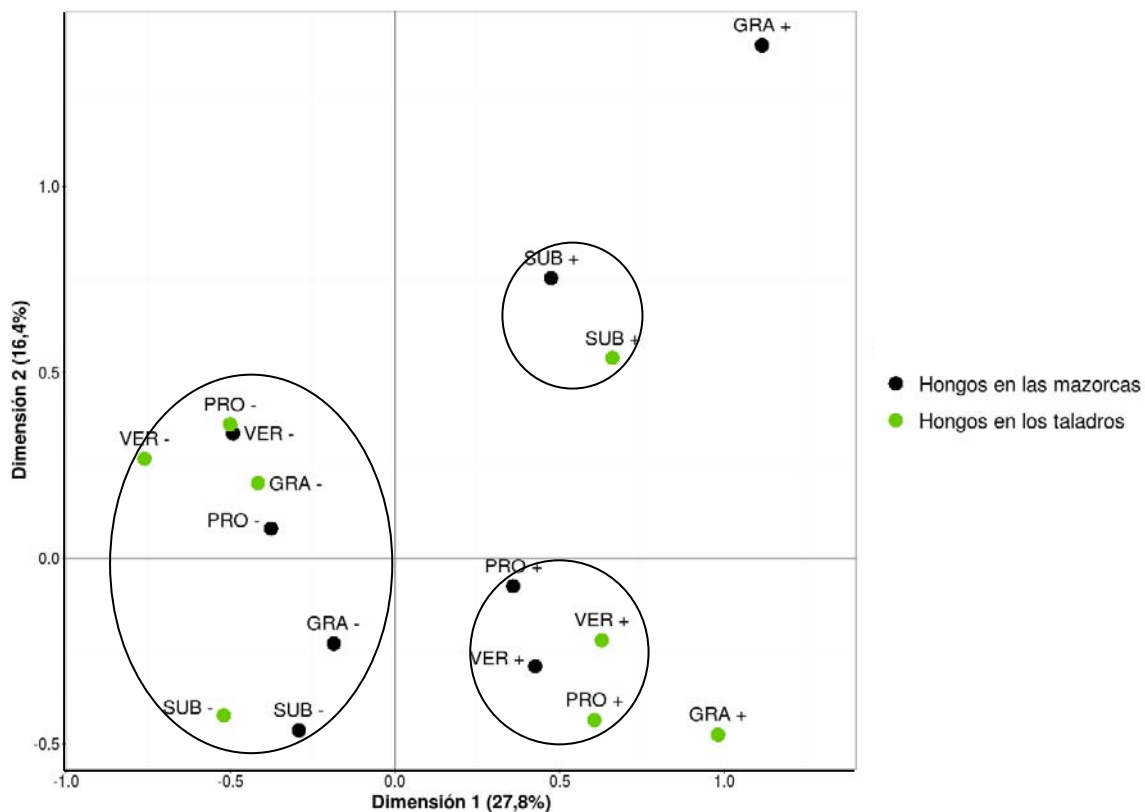
<sup>b</sup> No se pudo realizar el análisis MLG por falta de datos.

# Los resultados de análisis estadístico para los factores año y especie fueron omitidos cuando la interacción entre ambos factores fue significativa. En este caso las diferencias entre tratamientos se analizaron separando los datos de los tres años, siendo este el caso en Albacete del agregado *A. niger* (F = 72,59; p = 0,07 para 2011).

\* indica diferencias significativas (p < 0,05).

### 3.3.6. Relación entre la presencia de hongos del género *Fusarium* en las mazorcas y en las larvas de los taladros

La presencia de los principales hongos aislados de larvas de taladro procedentes de plantas de maíz no-Bt (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. graminearum*) se relacionó con la presencia de estos hongos en la mazorca de esa misma planta mediante un ACM (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Análisis de correspondencias múltiples (ACM) de la presencia o ausencia de los hongos micotoxígenos encontrados en cada mazorca y la presencia o ausencia de los hongos encontrados en alguna de las larvas de taladros recogidas en esa misma planta (+: presencia; -: ausencia; VER: *F. verticillioides*; PRO: *F. proliferatum*; SUB: *F. subglutinans*; GRA: *F. graminearum*).

La primera dimensión distribuyó los hongos de las mazorcas y los taladros según su presencia (coordenadas positivas) o ausencia (coordenadas negativas). Considerando en conjunto las dos primeras dimensiones extraídas se pudo apreciar una relación entre la presencia de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* en las mazorcas y en alguna de las larvas recuperadas en esa misma planta. De forma mucho más clara, al estar los puntos más alejados del origen de coordenadas, se observa que, en el caso de

*F. graminearum*, la relación entre la presencia de hongo en la mazorca y en los taladros procedentes de esa planta no tiene lugar. Por otro lado, se puede distinguir que, en general, la ausencia de los hongos en la mazorca está asociada a la ausencia de éstos en los taladros. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que las dos primeras dimensiones del ACM en su conjunto contribuyeron solo un 44,2% a explicar la desviación de los valores observados frente a los esperados.

### 3.4. DISCUSIÓN

En este trabajo se realiza un estudio de la frecuencia de aparición de las principales especies de hongos productores de micotoxinas de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* en campos de maíz Bt y no-Bt de tres áreas maiceras de España (Extremadura, Albacete y el Valle del Ebro). La identificación de los hongos micotoxígenos se llevó a cabo con técnicas moleculares, mediante la utilización de protocolos específicos de PCR. Estos protocolos permiten discriminar entre especies estrechamente relacionadas, teniendo una alta sensibilidad, al requerirse muy poca cantidad de DNA molde (González-Salgado *et al.*, 2008). Además, son muy adecuadas para detectar estadíos tempranos de contaminación, antes por tanto, de que se produzca la toxina, o incluso cuando el hongo ya no es viable (Niessen, 2007). La identificación de hongos con técnicas moleculares ha resuelto los problemas asociados con la identificación morfológica de los métodos tradicionales basados en los caracteres morfológicos del hongo. Los métodos tradicionales habitualmente requieren expertos taxónomos, siendo difícilmente estandarizables, especialmente para las especies del género *Fusarium*, donde la gran variabilidad en los caracteres fenotípicos dentro de una misma especie ha generado una gran controversia en la taxonomía de este género (Gong *et al.*, 2014). Además, es ese caso es necesario aislar los hongos, por lo que solo se pueden identificar aquellos hongos viables en el momento de la recogida de la muestra.

Los hongos micotoxígenos que contaminaron el maíz con más frecuencia en las tres áreas de estudio fueron *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, perteneciendo las tres especies a la sección *Liseola*. *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum* ya habían sido identificadas como los hongos más frecuentemente asociados a este cultivo en el sur de Europa (Dorn *et al.*, 2009; Logrieco *et al.*, 2002), y en concreto en España (Butrón *et al.*, 2006). En este trabajo se encontró que la proporción de ambas especies en las tres áreas estudiadas fue distinta. Estas diferencias podrían ser debidas a desigualdades en

los rangos de temperaturas y de estrés hídrico óptimos de crecimiento para cada hongo. Se ha descrito que las temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre los 25-30 °C para ambas especies, aunque ante temperaturas extremadamente altas junto un elevado estrés hídrico, la proliferación de *F. verticillioides* es mayor (Marín *et al.*, 2010a). Extremadura y Albacete fueron las regiones con las temperaturas máximas más altas y los periodos de sequía más prolongados, encontrándose que la especie más frecuente en estas áreas fue *F. verticillioides* frente a *F. proliferatum*, que apareció en menor medida. En el caso del Valle del Ebro, debido a que la recogida del maíz es más tardía (mediados de octubre), las temperaturas fueron más bajas al final del cultivo, además de ser una región con precipitaciones más altas, lo que pudo favorecer la mayor incidencia de *F. proliferatum* frente a *F. verticillioides*. La aparición de *F. subglutinans* en el maíz europeo se había relacionado con zonas con temperaturas bajas y alta humedad (Moretti *et al.*, 2008). Recientemente se ha citado su presencia en maizales del norte de Italia (Scarpino *et al.*, 2015) y del noroeste de España (Aguín *et al.*, 2014). Este trabajo aporta la cita más meridional de *F. subglutinans* en Europa, aunque ya había sido encontrada en regiones cálidas del continente africano (Moretti *et al.*, 1995).

Al analizar el efecto del tipo de maíz (Bt y no-Bt) en la presencia de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* se obtuvo que, en general, estos hongos fueron más frecuentes en las mazorcas de maíz no-Bt dañadas. Otros estudios llevados a cabo en otras regiones de España y Argentina encontraron también una mayor contaminación de los granos de maíz no-Bt con *F. verticillioides* y *F. proliferatum* que en el maíz Bt (MON810) (Barros *et al.*, 2009; Bakan *et al.*, 2002). Diversos factores podrían ser los responsables de la mayor incidencia de estas especies en el maíz no-Bt. Por un lado, se ha descrito que a través de las heridas producidas por las larvas de los taladros, estos hongos entran más fácilmente en la planta, y su proliferación se ve favorecida por el daño producido por las mismas (Gatch y Munkvol, 2002; Gatch *et al.*, 2002; Munkvold *et al.*, 1999; Munkvold *et al.*, 1997). También el ataque de los insectos causa un ambiente propicio para el crecimiento fúngico, pues producen un calentamiento y liberación de agua debido a su actividad metabólica (Sinha y Wallace, 1965). Por otro lado, en este estudio se demuestra por primera vez que los taladros del maíz, *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* portan hongos micotoxígenos en condiciones naturales, siendo *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* los hongos que principalmente se detectaron en ambos taladros. Los resultados del ACM sugieren una asociación entre la presencia de estos hongos en las mazorcas y en las larvas de los taladros encontrados en las mismas plantas. Se ha demostrado que *O. nubilalis* puede adquirir las esporas de

los hongos de la superficie de restos vegetales del suelo o de una planta infectada y llevarlas en su cutícula (Sobek y Munkvold, 1999), o bien trasladarlas en su intestino al alimentarse de una planta contaminada (Darvas *et al.*, 2011). Por lo tanto, las larvas de taladro podrían estar contribuyendo a la propagación de estos hongos de la sección *Liseola*. En cualquier caso, en el análisis del ACM, el porcentaje (44%) con el que las dos primeras dimensiones extraídas contribuyeron a explicar la desviación de los valores observados frente a los esperados fue bajo. Por ello, sería conveniente llevar a cabo un nuevo estudio con más datos para poder confirmar los resultados obtenidos. Finalmente se ha descrito que, los hongos podrían proliferar más en el maíz no-Bt según se deduce de los resultados de Bakan *et al.* (2002) que observaron que el contenido de ergosterol (medida indirecta de la proliferación de los hongos filamentosos al ser un componente lipídico de su membrana) era mayor en los granos de maíz no-Bt con daño de taladro.

*Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum* se han descrito como las principales especies productoras de fumonisinas (Rubinstein y Theumer, 2011), siendo estas micotoxinas las que con más frecuencia se encontraron contaminando las mazorcas de las tres áreas estudiadas. La concentración de fumonisinas fue significativamente más alta en las mazorcas de maíz no-Bt que es las no-Bt. El valor medio de su concentración en el maíz no-Bt dañado por taladro en cada área y año superó los 4.000 µg/kg, que es el contenido máximo de fumonisinas permitido en la UE para el maíz no elaborado destinado al consumo humano. Esto se debió a que a pesar de haber algunas muestras sin fumonisinas en el maíz no-Bt, un 24,1% de ellas superaron ampliamente esta cantidad. La reducción en el contenido en fumonisinas que consigue el maíz Bt al disminuir el daño de los insectos ya ha sido descrito en otros trabajos realizados tanto en América (Barros *et al.*, 2009; De la Campa *et al.*, 2005; Hammond *et al.*, 2004) como en Europa (Folcher *et al.*, 2010, 2009; Papst *et al.*, 2005; Bakan *et al.*, 2002; Magg *et al.*, 2002). Aunque el control de los taladros mediante la aplicación de diferentes tratamientos insecticidas tiene un efecto similar en la reducción de fumonisinas (Blandino *et al.*, 2010; Folcher *et al.*, 2009), presentan el inconveniente de que su efectividad es muy limitada debido al comportamiento endófito de las larvas, actuando las propias cañas como barrera de protección. Este problema, por tanto, quedaría solventado con el uso de maíz Bt, que expresa la toxina insecticida a lo largo de todo el cultivo en diferentes tejidos de la planta. Se podría considerar que otros factores ajenos al daño producido por los taladros podrían ser los responsables de las diferencias en los niveles de fumonisinas encontrados entre el maíz Bt y el no-Bt. Sin embargo, en un estudio complementario en el que analizamos el contenido de diversas micotoxinas en mazorcas de maíz no-Bt sin daño de taladro, se

observó que no había diferencias en el nivel de fumonisinas entre estas muestras y las de maíz Bt recogidas en la misma región y el mismo año (se adjuntan las concentraciones de micotoxinas de estas muestras en los **anexos 7 y 8**). Por lo tanto, el daño producido por los taladros en el maíz no-Bt estaría directamente relacionado con las elevadas concentraciones de esta micotoxina, siendo el maíz Bt una estrategia muy eficaz para la disminución en los niveles de fumonisinas al suponer una protección frente al ataque de los mismos.

El coste tan elevado de los análisis de micotoxinas hace útil la búsqueda de técnicas alternativas que puedan identificar las muestras con una mayor probabilidad de estar contaminadas de forma previa al análisis. En este trabajo se encontró que la detección de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* mediante ensayos de PCR específicos para cada especie fue útil para predecir el riesgo de contaminación con fumonisinas en el maíz. Independientemente del tipo de maíz, el 85,85% de las muestras que tenían fumonisinas presentaron contaminación con *F. verticillioides* y/o *F. proliferatum*. De este modo, la identificación epidemiológica previa se podría utilizar para predecir el riesgo potencial de una muestra a estar contaminada con fumonisinas. Estos resultados confirman los encontrados en otros trabajos en los que también obtuvieron una alta correlación entre la presencia de fumonisinas y de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en muestras de maíz (Jurado *et al.*, 2006a) y de *F. verticillioides* en muestras de cebada (Gil-Serna *et al.*, 2013).

También en el ACM, se observó que existía una relación entre la presencia de fumonisinas y de *F. subglutinans*, aunque esta especie no se considera como uno de los principales hongos productores de estas micotoxinas. Durante la realización de esta Tesis se ha descrito una nueva especie denominada *F. temperatum* al dividirse *F. subglutinans* en dos especies (Scauflaire *et al.*, 2011), describiéndose en ambas la capacidad de producción de fumonisinas (Wang *et al.*, 2013). Con los protocolos específicos de PCR empleados en esta Tesis no se pudo distinguir entre *F. subglutinans* y *F. temperatum*, aunque no se podría descartar la presencia de *F. temperatum* ya recientemente se ha citado en maizales españoles (Pintos *et al.*, 2013). La relación encontrada entre *F. subglutinans* y la presencia de fumonisinas podría ser por tanto directa, debido a su posible contribución en el contenido de fumonisinas, o indirecta, al haberse descrito que *F. subglutinans* se encuentra habitualmente asociado a la presencia de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, siendo estas tres especies las causantes principales de la podredumbre rosa de la mazorca (Bottalico, 1998). *Fusarium subglutinans*, además

sintetiza principalmente moniliformina (MON). A pesar de que actualmente no existen límites reglamentarios para esta toxina en los alimentos, un dictamen científico elaborado por la EFSA informó de los riesgos relacionados con la presencia de esta micotoxina en piensos y alimentos (EFSA, 2010c), y recientemente se ha verificado su toxicidad en ratas (Jonsson *et al.*, 2013). La alta incidencia en las muestras de *F. subglutinans*, junto con *F. proliferatum*, ambos productores de MON, alerta de la posibilidad de que los campos de maíz españoles estén contaminados con esta toxina. Además, la mayor frecuencia de ambos hongos en las mazorcas de maíz no-Bt encontrada en este trabajo, junto a que recientemente se ha descrito una relación entre la presencia de altas concentraciones de MON y los daños de *O. nubilalis* en la mazorca (Scarpino *et al.*, 2015; Blandino *et al.*, 2015), evidencia el mayor riesgo del maíz no-Bt de estar contaminado con esta toxina. Por lo tanto sería interesante que en estudios futuros se analizara la contaminación del maíz con MON, y valorar si el maíz Bt efectivamente está menos contaminado con esta micotoxina.

Con una frecuencia mucho menor se encontraron mazorcas contaminadas con las especies *F. graminearum* y *F. sporotrichioides*. La menor incidencia de estas especies en España podría estar relacionada con el rango de condiciones ambientales óptimas para su desarrollo. Se ha descrito que las condiciones óptimas de crecimiento de *F. graminearum*, se encuentran en un estrecho rango de temperaturas de entre 26 a 28 °C con un nivel de estrés hídrico suave (0,982  $a_w$ , expresado como el potencial de agua total, el cual es la fracción disponible del agua total necesaria para el crecimiento fúngico), teniendo una escasa capacidad para colonizar los cereales ante condiciones ambientales extremas como temperaturas muy altas (a partir de los 30 °C) y un elevado estrés hídrico (Marín *et al.*, 2010b). Puede coexistir con especies productoras de fumonisinas, ya que comparten hospedador y tiene una tasa de crecimiento mucho mayor que ellas, aunque su desarrollo se reduce cuando las condiciones ecofisiológicas favorecen a *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Velluti *et al.*, 2000). Además, la ausencia de *F. graminearum* también puede estar relacionada con el establecimiento temprano de *F. subglutinans*, que actuaría como un mecanismo de control biológico contra la invasión de *F. graminearum* (Cooney *et al.*, 2001). Hasta el momento *F. sporotrichioides* se había descrito como una especie poco frecuente en el maíz en el sur de Europa, y concretamente en España (Jurado *et al.*, 2006b; Logrieco *et al.*, 2003), coincidiendo nuestros resultados con estas observaciones. A diferencia de los hongos de la sección *Liseola*, en *F. graminearum* y *F. sporotrichioides* no se observó ningún tipo de influencia del tipo de maíz (maíz Bt y maíz no-Bt) en su frecuencia de aparición. La entrada de

estas especies en las mazorcas se produce habitualmente a través de las sedas y por lo tanto no dependería de los daños producidos por los insectos para penetrar en ella (Sutton, 1988), por lo que la protección contra los taladros no evitaría la infección con estos hongos (Logrieco *et al.*, 2002). Además, a pesar de que los taladros también portaban estos hongos, el porcentaje de larvas en las que se identificaron fue relativamente bajo, no encontrándose una relación clara entre la presencia de estos hongos en la mazorcas y en los taladros recogidos de la misma planta.

*Fusarium graminearum* sintetiza principalmente DON y ZEA, mientras que *F. sporotrichioides* es productor de T-2 y HT-2. Únicamente muestras esporádicas tanto de maíz Bt como de maíz no-Bt aparecieron contaminadas con alguna de estas micotoxinas (10,1% con DON, 5,8 % con ZEA, 2,1% con T-2 y 3,7% con HT-2). Este resultado estaría relacionado con la escasa contaminación de hongos productores de estas toxinas encontrado en las muestras y con que el perfil epidemiológico fuera el mismo en el maíz Bt y no-Bt. Otros trabajos han encontrado que los valores de estas micotoxinas en los diferentes híbridos analizados, eran extremadamente variables y en la mayoría de los casos no se encontraron diferencias significativas entre las variedades Bt y no-Bt (Ostri *et al.*, 2010; Folcher *et al.*, 2009, Bakan *et al.*, 2002; Magg *et al.*, 2002). Magg *et al.*, (2002) determinaron que la aparición de estas micotoxinas estaría más influenciada por las condiciones climáticas que por los daños provocados por los insectos, por lo que podrían aparecer en altas concentraciones incluso cuando no ha habido ninguna infestación por taladro.

A pesar del bajo número de muestras contaminadas con tricotecenos y ZEA, algunas de ellas tuvieron concentraciones muy elevadas de T-2, HT-2 y DON (concentraciones mostradas en los **anexos**), por lo que habría que considerar la existencia de un riesgo de contaminación con estas micotoxinas en los campos de maíz españoles. Por ello, sería importante identificar cuál es el hongo responsable de estos altos niveles para poder predecir la aparición de las mismas. De las 19 muestras contaminadas con DON, en 12 de ellas se halló *F. graminearum*, por lo que podría ser esta especie la responsable de su producción. Tradicionalmente se ha considerado *F. sporotrichioides*, *F. poae* y *F. equiseti* como los principales hongos productores de T-2 y HT-2. De las 8 muestras contaminadas con estas, solo en tres se identificó a *F. sporotrichioides*. Actualmente se ha descrito a *Fusarium langsethiae* como el productor más importante de estas micotoxinas en cereales como la avena, el trigo y la cebada en el norte y centro de Europa (Torp y Nierenberg, 2004). Por ello, de forma complementaria, se analizó la presencia del mismo

en las muestras contaminadas con T-2 y HT-2 siguiendo los protocolos de PCR específicos descritos por Wilson *et al.*, (2004), no detectándose en ninguna de ellas su presencia. Hasta el momento, en el área mediterránea, solo se tiene constancia de la presencia de *F. langsethiae* en cereales de grano pequeño (Infantino *et al.*, 2007). Serían necesarios nuevos estudios para esclarecer la presencia de *F. langsethiae* en maizales españoles y encontrar el origen de los altos niveles de T-2 y HT-2 de algunas muestras.

Se confirmó la ausencia de *F. culmorum* y *F. poae*, que sintetiza tricotecenos, así como la presencia anecdótica *F. equiseti* en tres larvas de taladro. La ausencia de estas especies de *Fusarium* en campos de maíz de España ya había sido descrita en Jurado *et al.*, (2006b), que evaluaron la presencia de diferentes especies de *Fusarium* en trigo duro y maíz recogido en Andalucía, observando que en las semillas de trigo las especies de *Fusarium* más frecuentes fueron *F. equiseti*, *F. graminearum* y *F. culmorum*, mientras que en el caso del maíz, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* fueron las únicas especies presentes. Resultados similares se obtuvieron en un estudio llevado a cabo en Pontevedra durante los años 2007 y 2008, en el que las muestras de maíz convencional estaban principalmente contaminadas con *F. verticillioides* y *F. subglutinans*, y de forma muy esporádica con *F. proliferatum*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. solani* y *F. culmorum* (Aguín *et al.*, 2014).

En el caso de los hongos postcosecha, solo se encontraron muestras contaminadas con el agregado *A. niger* y *A. flavus*, no observándose diferencias en su frecuencia de aparición en función del tipo de maíz. Hasta el momento, no se tiene constancia de ningún estudio que analice las diferencias entre el maíz Bt y no-Bt en la contaminación natural de estos hongos durante el periodo de precosecha. Nuestros resultados concuerdan con los de Mencarelli *et al.* (2013), que no encontraron una relación clara entre la contaminación con *A. flavus* en los granos de maíz y los daños producidos por la infestación natural de *O. nubilalis* en campos de maíz convencionales. Del mismo modo Abbas *et al.* (2008) observaron un nivel similar de propágulos de *A. flavus* en los restos de plantas de maíz (hojas, tallo y granos) de maíz Bt (MON810) y no-Bt dejados sobre la superficie del suelo tras la cosecha, los cuales son el inóculo primario de la infección para el cultivo siguiente. En nuestro trabajo, la contaminación de las mazorcas con hongos de postcosecha se asoció principalmente con los campos situados en Extremadura mientras que en Albacete y el Valle del Ebro se encontraron un escaso número de mazorcas contaminadas. Este hecho podría estar relacionado con las condiciones óptimas para su crecimiento, que son temperaturas entre los 30-37 °C, y un elevado estrés hídrico (>0,99

$a_w$ ) (Marín *et al.*, 1998b; Belli *et al.*, 2004). Extremadura fue la única área donde desde julio hasta la fecha de muestreo, más del 76% de los días superaron los 30 °C de temperatura máxima en ambos años de estudio. Este hecho unido al aumento del estrés hídrico del hongo debido a la falta de riego al final del cultivo y las escasas precipitaciones en esta región, pudieron favorecer la proliferación de estos hongos. Se ha descrito que no existe una competencia nutricional entre *F. verticillioides* y *A. flavus* en el maíz, ya que utilizan diferentes fuentes de carbono, pero ante condiciones climáticas favorables para *A. flavus* (>30 °C) se hace dominante frente a *F. verticillioides* (Giorni *et al.*, 2009; Marín *et al.*, 1998a). A pesar de que las especies que componen el agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*) sintetizan OTA y *A. flavus* es productor de aflatoxinas, la presencia de estas toxinas fue anecdótica en Extremadura en la campaña analizada. Estos resultados contrastan con los encontrados en el estudio de Camardo-Leggieri *et al.* (2015) llevado a cabo en campos situados al norte de Italia durante los años 2009-2011, en el que el 75% de las muestras de maíz convencional analizadas estuvieron contaminadas con aflatoxinas. En este trabajo encontraron que uno de los principales factores implicados en la aparición de aflatoxinas es el ataque de *O. nubilalis*, aunque otros factores relacionados con las condiciones meteorológicas influyeron incluso más que el daño del taladro. A pesar de que en las muestras analizadas en nuestro estudio no estuvieron contaminadas con OTA y aflatoxinas, hay que tener en cuenta que, más del 32% de las mazorcas estaban contaminadas con sus hongos productores, por lo que el periodo de cultivo es crítico en la contaminación del maíz con hongos de postcosecha. Sin embargo, la proliferación y producción de micotoxinas de los hongos de postcosecha se produce, en general, en condiciones de almacenamiento, por lo que habría que tener especial atención durante esta fase para evitar la producción de estas toxinas en el maíz almacenado.

Por último, señalar que la identificación de los hongos permitió constatar la ausencia tanto en el maíz Bt como en el no-Bt de importantes especies productoras de OTA como *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii*, que se habían descrito como agentes de riesgo en cebada (Gil-Serna *et al.*, 2013), desconociéndose su importancia en maíz.

Como conclusión, el maíz Bt es muy eficaz en la reducción de fumonisinas, la micotoxina más frecuente en maizales españoles, debido a que evita el daño producido por los taladros y reduce, en general, la contaminación con hongos de la sección *Liseola*, que incluye a los principales productores de estas micotoxinas. La presencia de daños

producidos por los taladros *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* junto con la de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son buenos indicadores de una probable contaminación con fumonisinas. La frecuencia de aparición del resto de hongos y toxinas estudiadas no parece estar relacionada con el daño asociado a los taladros.



## 4. DISCUSIÓN GENERAL



La superficie cultivada con plantas genéticamente modificadas (GM) resistentes a insectos que expresan proteínas insecticidas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (plantas Bt) ha ido aumentando a lo largo de los años a nivel mundial debido a los beneficios, principalmente económicos, atribuidos a estas plantas, consiguiendo en aquellas áreas donde la presión de las plagas es alta, mayores rendimientos que con los cultivos convencionales y reducciones en los costes asociados al uso de insecticidas (James, 2013; Brookes, 2009, 2002). Sin embargo, en Europa la incorporación de cultivos GM a la agricultura ha generado un gran debate debido, entre otros motivos, a los posibles efectos que la liberación a gran escala que estas plantas puede producir sobre el medio ambiente. Actualmente, solo el maíz MON810 resistente a los taladros está autorizado para su siembra en la UE. Sin embargo, no todos los agricultores europeos pueden adoptar su cultivo. Nueve Estados miembros (Austria, Alemania, Bulgaria, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Luxemburgo y Polonia) han recurrido a la cláusula de salvaguardia y a las medidas de emergencia contempladas en la Directiva 2001/18/CE (Comisión Europea, 2001b), prohibiendo este cultivo en sus territorios, aunque en Francia se anuló la prohibición en 2013 (Comisión Europea, 2013b). La baja aceptación mostrada por los Estados miembros contrasta con la situación en España, donde este cultivo ha sido ampliamente adoptado en las zonas maiceras que más sufren los daños de los taladros *Ostrinia nubilalis* y *Sesamia nonagrioides*. El bajo número de autorizaciones para el cultivo otorgadas hasta la fecha, así como el veto al cultivo, ilustra la posición de la UE sobre el uso de plantas GM. Con el fin de mejorar el proceso de autorización del cultivo de plantas transgénicas y garantizar la libertad de elección de los consumidores, agricultores y operadores, se ha elaborado la Directiva 2015/412 (Comisión Europea, 2015), que modifica la anterior Directiva 2001/18/CE. Esta modificación permite a los Estados miembros restringir o prohibir el cultivo de OMG en su territorio o en parte del mismo sin necesidad de adoptar medidas de salvaguardia, siempre que tales decisiones estén justificadas sobre la base de razones distintas a las de riesgos para la salud humana o animal y el medio ambiente. Con el fin de aportar nuevos datos que puedan ser utilizados por los Estados miembros para posicionarse acerca de la adopción de cultivos GM, los objetivos de esta Tesis estuvieron encaminados al estudio de posibles riesgos y beneficios que el cultivo de maíz Bt podría tener en España.

Uno de los riesgos sobre el medio ambiente identificados en el cultivo del maíz Bt son los posibles efectos sobre los artrópodos hacia los que no va dirigido el control con la toxina, y que coinciden espacial y temporalmente con el cultivo (artrópodos no-diana), ya que podrían estar expuestos a la toxina. Es importante realizar esta evaluación con

artrópodos que desarrollen diferentes funciones en el ecosistema, para poder detectar tanto efectos directos producidos por la ingestión de la toxina de la planta o de sus residuos (herbívoros y detritívoros), o al alimentarse o parasitar presas o huéspedes que la hubieran ingerido (depredadores y parasitoides), así como efectos indirectos producidos por una disminución de la calidad o cantidad de las presas o huéspedes (EFSA, 2010a). Nuestro trabajo se centró en dos comunidades: los artrópodos de la parte aérea de la planta capturados con trampas amarillas adhesivas, que estuvieron principalmente compuestos por grupos fitófagos y parasitoides, y los microartrópodos edáficos, fundamentalmente formados por detritívoros. Se demostró que diversas especies pertenecientes a ambas comunidades estaban expuestas a la toxina Cry1Ab en condiciones de campo. Sin embargo, el nivel de exposición a la toxina así como el tiempo de exposición a la misma podría ser diferente dependiendo de su biología y de la función ecológica que desempeñen en el agroecosistema. Los herbívoros de la parte aérea de la planta que se alimentan de las células del mesófilo de las hojas fueron los grupos expuestos a los niveles más altos de toxina, aunque, la duración estaría limitada al periodo en el cual el cultivo de maíz está presente en el campo. En cambio, en los detritívoros del suelo que se alimentan principalmente de la materia orgánica en descomposición, se detectaron concentraciones de toxina inferiores, aunque la exposición de estos grupos puede prolongarse tras la cosecha del maíz ya que, según nuestro estudio, la toxina permanece en la materia orgánica acumulada en el suelo al menos tres meses después de la cosecha. A pesar de ello, no se detectaron efectos negativos del maíz Bt en estos grupos, indicando los resultados que el maíz Bt es compatible con las comunidades de herbívoros, parasitoides y detritívoros estudiados. Estos resultados confirman así los encontrados en otros estudios realizados con otros grupos funcionales como depredadores, así como en otras plagas secundarias (Albajes *et al.*, 2012; Ortego *et al.*, 2009; Farinós *et al.*, 2008; de la Poza *et al.*, 2005; Pons *et al.*, 2005).

A pesar de que una mayoría de estudios científicos no hayan aportado datos que sugieran la necesidad de abandonar esta biotecnología, es obligatorio continuar con el seguimiento de los efectos del maíz Bt MON810 mientras que su cultivo siga autorizado (Comisión Europea, 2001b). Este seguimiento es especialmente importante en regiones con una alta tasa de adopción del cultivo, para descartar posible efectos acumulativos debidos a la exposición continuada a la toxina de artrópodos no-diana y así poder identificar la posible aparición de efectos adversos no previstos en el proceso de evaluación de riesgos. Los trabajos llevados a cabo en condiciones de campo a lo largo

de todo el cultivo son de gran relevancia para las evaluaciones de riesgo, ya que pueden aportar información acerca de cuáles son las especies más abundantes en el agroecosistema, así como su papel en el cultivo, y las relaciones tróficas entre los diferentes grupos. A partir de los datos de campo obtenidos y teniendo en cuenta los criterios de selección considerados por la EFSA para la búsqueda de especies representativas (EFSA, 2010a), en este estudio se proponen a diversos artrópodos no-diana como especies indicadoras de los posibles efectos del maíz GM resistente a insectos: el herbívoro *Zyginidia scutellaris*, el parasitoide *Anagrus* spp., y los detritívoros del suelo ácaros y colémbolos. La abundancia de estos grupos en el cultivo se ha mostrado útil para detectar posibles efectos del maíz Bt, su captura e identificación es relativamente asequible y en algunos casos se ha demostrado su exposición a la toxina. Además son grupos cosmopolitas, habiendo sido citados frecuentemente en diversos países europeos (Rauschen, 2008b; Hesami *et al.*, 2004; Coleman *et al.*, 2004) (**Tabla 4.1**). Estos taxones, además de ser utilizados en las evaluaciones de riesgo ambiental del maíz Bt MON810, podrían ser útiles en las evaluaciones de nuevos eventos de maíz GM en Europa.

**Tabla 4.1.** Taxones propuestos para ser utilizados en las evaluaciones de riesgos del maíz GM en la UE a partir de los resultados obtenidos en la Tesis Doctoral.

Taxón	Grupo funcional	Nicho que ocupan	Exposición a la toxina Cry1Ab	Abundancia en el maíz	Presencia en Europa	Dificultad de captura y procesado	Dificultad de identificación	Capacidad para detectar diferencias
<i>Z. scutellaris</i>	Herbívoro	Parte aérea de la planta	Sí (Directa)	Alta	Sí	Baja	Baja	Alta
<i>Anagrus</i> spp.	Parasitoide	Parte aérea de la planta	No demostrada (Improbable)	Alta	Sí	Baja	Alta	Alta
Ácaros edáficos	Detritívoros	Suelo	No demostrada (Probable)	Alta	Sí	Alta	Media	Alta
Colémbolos edáficos	Detritívoros	Suelo	Sí (Directa)	Alta	Sí	Alta	Media	Alta

La entrada de micotoxinas a la cadena alimentaria supone un grave riesgo para la salud humana y animal. El Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF, por sus siglas en inglés) desde el comienzo de la toma de datos en 2003 hasta la actualidad ha notificado 167 casos de alertas y 77 casos de rechazo en la frontera de la UE de alimentos o piensos elaborados a base de maíz por presenten un grave riesgo debido a las concentraciones de micotoxinas que presentaban (RASFF, 2015). Estas alertas y rechazos estuvieron debidas solo a cinco micotoxinas, entre las cuales destacan las fumonisinas, que fueron responsables de 62 alertas y 4 rechazos. Uno de los posibles beneficios atribuidos al cultivo de maíz Bt es la menor presencia de algunas micotoxinas que en los cultivos convencionales, debido al limitado daño por insectos que presenta el transgénico (Ostry *et al.*, 2010). Los estudios realizados hasta el momento en campos europeos sobre este posible beneficio son escasos (Folcher *et al.*, 2008; Bakan *et al.*, 2002; Magg *et al.*, 2002) debido, entre otros motivos, a la prohibición del maíz Bt en algunos países de la Unión. Por ello, en esta Tesis decidimos analizar si el maíz Bt presenta un menor contenido en micotoxinas al prevenir el daño de los taladros y, por tanto, dificultar la entrada de los hongos productores de las mismas. En este sentido, los campos de maíz españoles se pueden considerar un contexto adecuado para este estudio, ya que la siembra continuada de maíz es una práctica común en las distintas regiones agroclimáticas, las dos plagas diana del maíz MON810 en Europa están presentes y además el clima mediterráneo es propicio para el desarrollo de los muchos de los hongos productores de micotoxinas.

De nuestros resultados se deduce que las mazorcas dañadas por las plagas de taladro *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* son particularmente propensas a sufrir infecciones por hongos del género *Fusarium* productores de fumonisinas, y por tanto, a estar contaminado con estos metabolitos. En las mazorcas dañadas, el valor medio de concentración de fumonisinas superó los 4.000 µg/kg, que es el contenido máximo permitido en la UE para el maíz no elaborado destinado al consumo humano. A partir de estos resultados se podría considerar que en zonas de maíz no-Bt con altos niveles de infestación de las plagas podría existir un mayor riesgo de encontrar concentraciones de fumonisinas elevadas, poniendo en peligro la producción. En el caso de las mazorcas de maíz Bt, la media de la concentración de fumonisinas no superó estos niveles máximos permitidos. Además, este tipo de maíz también fue una herramienta eficaz para el control de la contaminación de las mazorcas con los hongos fitopatógenos de la sección *Liseola*. Estos hongos pueden alterar de forma evidente la materia prima, estimándose pérdidas de entre un 10 y un 30% en el rendimiento del cultivo de maíz (Logrieco *et al.*, 2002). En

el maíz Bt las infecciones con estos hongos fueron menos frecuentes y asintomáticas, no viéndose afectada la calidad del grano. Estudios recientes han sugerido que las altas temperaturas y la sequía que se prevén que sucedan en un escenario de cambio climático podría dar lugar a la aparición más frecuente de fumonisinas en los países mediterráneos (Hoerling *et al.*, 2012; Miraglia *et al.*, 2009). Estas condiciones podrían favorecer la proliferación de *F. verticillioides*, uno de los principales productores de las mismas y muy relacionado con la presencia de taladros, frente a otras especies de *Fusarium* frecuentes en los cereales, como *F. graminearum*, con menor tolerancia al estrés térmico e hídrico (Magan *et al.*, 2011; Marín *et al.*, 2010b) y, como hemos comprobado en esta Tesis, menos dependiente del daño producido por los taladros para contaminar la mazorca. La adopción del maíz Bt en este nuevo escenario podría suponer una alternativa eficaz para evitar la entrada de fumonisinas a la cadena alimentaria. Además, la prevención constituye la mejor manera de minimizar la contaminación fúngica y producción de micotoxinas. Por tanto, el uso de maíz Bt podría incorporarse dentro de las buenas prácticas agrícolas (BPA) al minimizar los daños producidos por sus principales plagas, lo cual supone una opción de cultivo atractiva frente al maíz convencional en zonas de alta infestación, al favorecer la producción y la calidad de la cosecha.

Se puede concluir que, hasta el momento, no existen evidencias que confirmen que el maíz Bt (MON810) supone un riesgo para los artrópodos no-diana del agroecosistema. El conocimiento generado en esta Tesis puede tener una aplicación en el desarrollo de evaluaciones de riesgo, exigidas para las plantas GM que incorporen nuevos eventos, y en los programas de seguimiento de los efectos del maíz Bt en Europa. Además, este tipo de maíz ha demostrado ser adecuado en la prevención de la contaminación de las mazorcas con hongos micotoxígenos y micotoxinas, al limitar el daño de los taladros, por lo que su cultivo podría ser beneficioso para evitar la entrada de micotoxinas en la cadena alimentaria.



## 5. CONCLUSIONES



## Conclusiones

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Distintos artrópodos no-diana de la parte aérea de la planta, como los cicadélidos *Zyginidia scutellaris* y *Empoasca* spp., y microartrópodos del suelo, como los colémbolos del género *Entomobrya*, están expuestos en el campo a la toxina Cry1Ab que expresa el maíz Bt MON810.
2. La toxina Cry1Ab está presente en la materia orgánica parcialmente degradada de la rizosfera procedente de parcelas de maíz Bt MON810 hasta al menos tres meses después de la cosecha. No obstante se ha demostrado que su actividad insecticida frente a la especie susceptible *Ostrinia nubilalis* es más baja de la esperada.
4. No se han encontrado evidencias de que el cultivo continuado de maíz Bt MON810 afecte a los distintos parámetros poblacionales de los artrópodos no-diana analizados. Las únicas excepciones fueron el colémbolo *Parisotoma notabilis*, más abundante y frecuente en las parcelas de maíz Bt, y los valores de riqueza y diversidad de especies de colémbolos, también más elevados en este tipo de maíz.
5. Se propone al herbívoro *Z. scutellaris*, al parasitoide *Anagrus* spp. y a las comunidades de detritívoros de ácaros y colémbolos del suelo como taxones representativos para ser utilizados como indicadores de posibles efectos del maíz Bt. Esta elección se ha llevado a cabo en función de su capacidad para detectar diferencias entre el maíz Bt y no-Bt, su exposición a la toxina Cry1Ab en condiciones de campo, su presencia habitual en los cultivos de maíz y a la asequibilidad que presentan para ser muestreados e identificados.
6. Se confirma que el maíz en España es un huésped adecuado para diversas especies de hongos micotoxígenos del género *Fusarium*, entre las que destacan *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, encontrándose también en el maíz Bt. Asimismo, las especies del género *Aspergillus*, *A. flavus* y el agregado *A. niger*, pueden contaminar el maíz ya durante el periodo de cultivo, a pesar de ser estos hongos típicos de postcosecha.

## Conclusiones

**7.** Las fumonisinas son las micotoxinas que con más frecuencia contaminan las mazorcas de los campos de maíz españoles, mientras que la presencia de DON, ZEA, T-2, HT-2, aflatoxinas y OTA es puntual aunque se pueden encontrar en concentraciones elevadas.

**8.** El maíz Bt es eficaz en la reducción de las concentraciones de fumonisinas debido a que evita el daño producido por los taladros, reduciéndose en este tipo de maíz la contaminación con hongos de la sección *Liseola* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*), que incluye a los principales productores de fumonisinas.

**9.** Los taladros *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* están contaminados con hongos micotoxígenos en condiciones naturales, siendo *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* las especies de hongos que principalmente portan.

**10.** La evidencia en el maíz de daños producidos por los taladros *O. nubilalis* y *S. nonagrioides* junto con la presencia de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son buenos indicadores de una probable contaminación con fumonisinas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA



- Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Weaver, M. A., Shier, W. T., Bruns, H. A., Bellwloui, N., Accinelli, C., Abel, C. A.** (2013). Implications of Bt Traits on Mycotoxin Contamination in Maize: Overview and Recent Experimental Results in Southern United States. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 61: 11759-11770.
- Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablutowicz, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A., Weaver, M. A.** (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 2: 142-152.
- Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Bruns, H. A.** (2008). Modelling the colonization of maize by toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strains: implications for biological control. *World Mycotoxin Journal*, 1: 333-340.
- Abel, C. A., Adamczyk, J. J.** (2004). Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1737-1744.
- Abendroth, L. J., Elmore, R. W., Boyer, M. J., Marlay, S. K.** (2011). Corn growth and development. PMR 1009 Iowa State University Extension. Ames Iowa, EE.UU.
- Aguín, O., Cao, A., Pintos, C., Santiago, R., Mansilla, P., Butrón, A.** (2014). Occurrence of *Fusarium* species in maize kernels grown in northwestern Spain. *Plant Pathology*, 63: 946-951.
- Albajes, R., Lumbierres, B., Pons, X., Comas, J.** (2013). Representative taxa in field trials for environmental risk assessment of genetically modified maize. *Bulletin of Entomological Research*, 103: 724-733.
- Albajes, R., Farinós, G. P., Pérez-Hedo, M., de la Poza, M., Lumbierres, B., Ortego, F., Pons, X., Castañera, P.** (2012). Post-market environmental monitoring of Bt maize in Spain: Non-target effects of varieties derived from the event MON810 on predatory fauna. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10: 977-985.
- Albajes, R., Lumbierres, B., Pons, X.** (2011). Two heteropteran predators in relation to weed management in herbicidetolerant corn. *Biological Control*, 59: 30-36.
- Albajes, R., Lumbierres, B., Pons, X.** (2009). Responsiveness of Arthropod Herbivores and Their Natural Enemies to Modified Weed Management in Corn. *Environmental Entomology*, 38: 944-954.
- Aldred, D., Magan, N.** (2004). Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153: 165-171.
- Alkhayyat F., Yu, J.** (2014). Upstream Regulation of Mycotoxin Biosynthesis. En: *Advances in Applied Microbiology*. Gadd, G., Sariaslani, S. (Eds.). Elsevier Inc. Amsterdam, Holanda. Volume 86. Págs. 1-10.
- Alma, A., Lessio, F., Reyneri, A., Blandino, M.** (2005). Relationships between *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Crambidae) feeding activity, crop technique and mycotoxin contamination of corn kernel in northwestern Italy. *International Journal of Pest Management*, 51: 165-173.
- Alstad, D. N., Andow, D.** (1995). Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 268: 1894-1896.

- Álvarez, T., Frampton, G. K., Goulson, D.** (2001). Epigeic Collembola in winter wheat under organic, integrated and conventional farm management regimes. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 83: 95-110.
- Álvarez-Alfageme, F., Ortego, F., Castañera, P.** (2009). Bt maize fed-prey mediated effect on fitness and digestive physiology of the ground predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Journal Insect Physiology*, 55: 143-149.
- Amín, B. A. Z., Chabbert, B., Moorhead, D., Bertrand, I.** (2014). Impact of fine litter chemistry on lignocellulolytic enzyme efficiency during decomposition of maize leaf and root in soil. *Biogeochemistry*, 117: 169-183.
- Andow, D. A., Lövei, G. L., Arpaia, S.** (2006). Ecological risk assessment for Bt crops. *Nature Biotechnology*, 24: 749-751.
- Andow, D. A., Hilbeck, A.** (2004). Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. *Bioscience*, 54: 637-649.
- 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 Economy Entomology*, 100: 195-201.
- Anglade, P.** (1972). Les *Sesamia*. En: Entomologie appliquée à agriculture II, Lépidoptère. Balanchowsky, A. S. (ed.), Masso et Cie. Paris, Francia. Págs. 1389-1401.
- Arroyo, M.** (1995). Nombres vulgares de insectos de interés agrícola. Ministerio de Agricultura. Madrid, España.
- Asao, T., Buchi, G., Abdel-Keder, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L., Wogan, G. N.** (1963). Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society*, 85: 1705-1707.
- Babendreier, D., Kalberer, N. M., Romeis, J., Fluri, P., Mulligan, E., Bigler, F.** (2005) Influence of Bt transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie*, 36: 585-594.
- Babendreier, D., Reichhard, B., Romeis, J., Bigler, F.** (2008). Impact of insecticidal proteins expressed in transgenic plants on bumblebee micro-colonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126: 148-157.
- Bacon, C. W., Yates, I. E., Hinton, D. M., Meredith, F.** (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, 109: 325-332.
- Bailey, R. I., Bourguet, D., Le Pallec A. H., Ponsard, S.** (2007). Dispersal propensity and settling preferences of European corn borers in maize field borders. *Journal of Applied Ecology*, 44: 385-394.
- Bakan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D., Cahagnier, B.** (2002). Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 728-731.
- Balachowsky, A., Mesnil, L.** (1935). Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Busson.Paris, Francia.

- Baquero, E.** (1997). Himenópteros parásitos de la serie Parasitica (Chalcidoidea, Mymaridae), relacionados con los insectos plaga en el maíz de Navarra. Tesis doctoral. Universidad de Navarra, España.
- Barriuso, J., Valverde, J. R., Mellado, R. P.** (2012). Effect of Cry1Ab protein on rhizobacterial communities of Bt-maize over a four-year cultivation period. *PLoS ONE*, 7: e35481.
- Barros, G., Magnoli, C., Reynoso, M. M., Ramírez, M. L., Farnochi, M. C., Torres, A., Dalcerro, M., Sequeira, J., Rubinstein, C., Chulze, S.** (2009). Fungal and mycotoxin contamination in Bt maize and non-Bt maize grown in Argentina. *World Mycotoxin Journal*, 2: 53-60.
- Bartelt, R. J., Wicklow, D. T.** (1999). Volatiles from *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and their attractiveness to nitidulid beetles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2447-2454.
- Barton, K. A., Whiteley, H. R., Yang, N. S.** (1987). *Bacillus thuringiensis* section  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*, 85: 1103-1109.
- Batlle, A., Martínez, M. A., Laviña, A.** (2000). Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine Yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 811-816.
- Baumgarte, S., Tebbe, C. C.** (2005). Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology*, 14: 2539-2551.
- Beardall, J. M., Miller, J. D.** (1994). Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. En: Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin. Miller, J. D., Trenholm, H. L. (Eds.). Eagan Press. Saint Paul, EE.UU. Págs. 487-539.
- Behan-Pelletier, V. M.** (1999). Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role as bioindicators. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 74: 411-423.
- Behan-Pelletier, V. M.** (2003). Acari and Collembola biodiversity in Canadian agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 83: 279-288.
- Belli, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J.** (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 19-27.
- Bennett, J. W., Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.
- Bilde, T., Axelsen, J. A., Toft, S.** (2000). The value of Collembola from agricultural soils as food for a generalist predator. *Journal Applied Ecology*, 37: 672-683.
- Bitzer, R. J., Rice, M. E., Pilcher, C. D., Pilcher, C. L., Lam, W. K. F.** (2005). Biodiversity and community structure of epedaphic and euedaphic springtails (Collembola) in transgenic rootworm Bt corn. *Environmental Entomology*, 34: 1346-1376.
- Blandino, M., Scarpino, V., Vanara, F., Sulyok, M., Krska, R., Reyneri, A.** (2015). Role of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on contamination of maize with 13 *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants Part A: Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, 32: 533-543.

- Blandino, M., Peila, A., Reyneri, A.** (2010). Timing clorpirifos plus cypermethrin and indoxacarb applications to control European corn borer damage and fumonisin contamination in maize kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 521-529.
- Bode, W. M., Calvin, D. D.** (1990). Yield-loss relationships and economic injury levels for European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) populations infesting Pennsylvania field corn. *Journal of Economic Entomology*, 83: 1595-1603.
- BOE** (1988). Reglamento 475/1988 de 8 de marzo de 2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Boletín Oficial del Estado. Madrid, España.
- Bolin, P. A., Hutchison, W. D., Andow, D.** (1999). Long-term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology*, 92: 1021-1030.
- Bottalico, A.** (1998). *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxins profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80: 85-103.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., y Soberón, M.** (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 423-431.
- Bravo, A., Soberón, M.** (2008). How to cope with insect resistance to Bt toxins?. *Trends Biotechnology*, 26: 573-579.
- Bravo, A., Gill, S. S., Soberón, M.** (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
- Brookes, G.** (2009). The Existing and Potential Impact of Using GM Insect Resistant (GM IR) Maize in the European Union. PG Economics. Dorchester, Reino Unido.
- Brookes, G.** (2007). The potential role of GM cost reducing technology in helping the Slovak arable cropping sector remain competitive, PG Economics. Dorchester, Reino Unido.
- Brookes, G., Barfoot, P.** (2004). Genetically modified maize: pollen movement and crop coexistence. PG Economic. Dorchester, Reino Unido.
- Brookes, G.** (2002). The farm level impact of using Bt maize in Spain. Brookes West. Canterbury, Reino Unido.
- Butrón, A., Samayoa, F., Santiago, R.** (2014). Selection efficiency of tunnel length and stalk breakage to obtain maize inbred lines resistant to stem borer attack. *Euphytica*, 197: 295-302.
- Butrón, A., Santiago, R., Mansilla, P., Pintos-Varela, C., Ordas, A., Ana Malvar, R. A.** (2006). Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6113-6117.
- CABI** (2007). Crop Protection Compendium. CAB International. Wallingford, Reino Unido.
- Camardo-Leggieri, M., Bertuzzi, T., Pietri, A., Battilani, P.** (2015). Mycotoxin occurrence in maize produced in Northern Italy over the years 2009–2011: focus on the role of crop related factors. *Phytopathologia Mediterranea*, 54, 1: 31–40.

- Candolfi, M. P., Brown, K., Grimm, C., Reber, B., Schmidli, H.** (2004). A faunistic approach to assess potential side-effects of genetically modified *Bt*-corn on non-target arthropods under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14: 129-170.
- Cao, A., Santiago, R., Ramos, A. J., Souto, X. C., Aguin, O., Malvar, R. A., Butrón, A.** (2014). Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 177: 63-71.
- CAST** (2003) Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Task Force Report N° 139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, EE.UU.
- CERA** (2015). Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database. En: <http://cera-gmc.org/GMCropDatabase> (Fecha de acceso: 21 de septiembre de 2015).
- Cheli, F., Battaglia, D., Gallo, R., Dell'Ort, V.** (2014). EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 37: 315-325.
- Chelkowski, J.** (1989). Mycotoxins associated with corn cob fusariosis. En: *Fusarium – Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Chelkowski, J. (Ed.). Elsevier Inc. Amsterdam, Holanda Págs. 53-62.
- Chen, M., Ye, G. Y., Liu, Z. C., Yao, H. W., Chen, X. X., Shen, Z. C., Hu, C., Datta S. K.** (2006). Field Assessment of the Effects of Transgenic Rice Expressing a Fused Gene of *cry1Ab* and *cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* Berliner on Nontarget Planthopper and Leafhopper Populations. *Environmental Entomology*, 35: 127-134.
- Clark, B. W., Coats, J. R.** (2006). Subacute effects of Cry1Ab Bt corn litter on the earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Entomology*, 35: 1121-1129.
- Clements, M. J., Campbell, K. W., Maragos, C. M., Pilcher, C., Headrick, J. M., Pataky, J. K., White, D. G.** (2003). Influence of Cry1Ab Protein and Hybrid Genotype on *Fumonisin* Contamination and Fusarium Ear Rot of Corn. *Crop Science*, 43: 1283-1293.
- Codex Alimentarius** (2012). Prevención y Reducción de la Contaminación de los Alimentos y Piensos. FAO/WHO. Roma, Italia.
- Coleman, D., Crossley, D., Hendrix, P.** (2004). Fundamentals of soil ecology,. Elsevier Academic. Press. San Diego, California, EE.UU.
- Comas, J., Lumbierres, B., Comas, C., Pons, X., Albajes, R.** (2015). Optimising the capacity of field trials to detect the effect of genetically modified maize on non-target organisms through longitudinal sampling. *Annals of Applied Biology*, 166: 183-195.
- Comas, C., Lumbierres, B., Pons, X., Albajes, R.** (2014). No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. *Transgenic Research*, 23: 135-143.
- Comas, J., Lumbierres, B., Pons, X., Albajes, R.** (2013). Ex-ante determination of the capacity to detect treatment effects in field trials intended to assess risks of genetically modified maize on non-target arthropods. *Journal of Economic Entomology*, 106: 1659-1668.

- Comisión Europea** (2015). Directiva 2015/412 de 11 de marzo de 2015 por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de organismos modificados genéticamente (OMG) en su territorio. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2013a). Reglamento (CE) N° 165/2013 del 27 de marzo de 2013 por el que se fija el contenido máximo de toxina T-2 y HT-2 en cereales y productos derivados. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2013b). Questions and Answers on EU's policies on cultivation and imports of GMOs. En: [http://europa.eu/rapid/press-release MEMO-13-952\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-13-952_en.htm) (Fecha de acceso: 30 de septiembre de 2015).
- Comisión Europea** (2009). Directiva 2009/128/CE del 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2007). Reglamento (CE) N° 1126/2007 del 28 de septiembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de Fusarium en maíz y los productos del maíz. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2006a). Reglamento (CE) N° 401/2006 del 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2006b). Reglamento (CE) N° 576/2006 del 23 de agosto de 2006 por el que se establecen las recomendaciones sobre el contenido máximo de micotoxinas en piensos y otros productos para alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2006c). Reglamento (CE) N° 1881/2006 del 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2005). Reglamento (CE) N° 123/2005 del 26 de enero de 2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 con respecto a la ocratoxina A. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2004). Reglamento (CE) N° 683/2004 del 13 del abril de 2004 que modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas y a la ocratoxina A en los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2002a). Reglamento (CE) N° 178/2002 del 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.

- Comisión Europea** (2002b). Reglamento (CE) N° 472/2002 del 12 de marzo de 2002 que modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2001a). Directiva 91/414/CEE del 15 de julio de 1991 relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Comisión Europea** (2001b). Directiva 2001/18/EC del 12 de marzo del 2001 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. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Cooney, J. M., Lauren, D. R., di Menna, M. E.** (2001). Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 522-526.
- Cordero, A., Malvar, R. A., Butrón, A., Revilla, P., Velasco, P., Odás, A.** (1998). Population dynamics and life-cycle of corn borers in south Atlantic European coast. *Maydica*, 43: 5-12.
- Cortet, J., Griffiths, B. S., Bohanec, M., Demsar, D., Andersen, M. N., Caul, S., Birch, A. N. E., Pernin, C., Tabone, E., de Vaufléury, A., Ke, X., Krogh, P. H.** (2007). Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. *Pedobiologia*, 51: 207-218.
- Crecchio, C., Stotzky, G.** (1998). Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* Subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology Biochemistry*, 30: 463-470.
- Crickmore, N.** (2015). *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. En: [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) (Fecha de acceso: 29 de septiembre de 2015).
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J.** (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 807-813.
- D'Mello, J. P. C., MacDonald, A. M. C.** (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166.
- Daly, T., Buntin, G. D.** (2005). Effect of *Bacillus thuringiensis* Transgenic Corn for Lepidopteran Control on Nontarget Arthropods. *Environmental Entomology*, 34: 1292-1301.
- Darvas, B., Bánáti, H., Takács, E., Lauber, É., Szécsi, Á., Székács, A.** (2011). Relationships of *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* and *Fusarium verticillioides* on MON 810 Maize. *Insects*, 2: 1-11.
- Daudu, C. K., Muchaonyerwa, P., Mnkeni, P. N. S.** (2009). Litterbag decomposition of genetically modified maize residues and their constituent *Bacillus thuringiensis* protein (Cry1Ab) under field conditions in the central region of the Eastern Cape, South Africa. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 134: 153-158.
- de Curtis, F., de Cicco, V., Haidukowski, M., Pascale, M., Somma, S., Moretti, A.** (2011). Effects of agrochemical treatments on the occurrence of *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of maize in Southern Italy. *Field Crops Research*, 123: 161-169.
- de Girolamo, A., Pereboom-de Fauw, D., Sizoo, E., van Egmond, H. P., Gambacorta, L., Bouten, K., Stroka, J., Visconti, A., Solfrizzo, M.** (2010). Determination of fumonisins B-1 and B-2 in maize-

- based baby food products by HPLC with fluorimetric detection after immunoaffinity column clean-up. *World Mycotoxin Journal*, 3: 135-146.
- de la Campa, R., Hooker, D. C., Miller J. D., Schaafsma, A. W., Hammond, B. G.** (2005). Modeling effects of environment, insect damage, and Bt genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines. *Mycopathologia*, 159: 539-552.
- 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.
- Debeljak, M., Cortet, J. Demšar, D., Krogh, P. H., Džeroski, S.** (2007). Hierarchical classification of environmental factors and agricultural practices affecting soil fauna under cropping systems using Bt maize. *Pedobiología*, 51: 229-238.
- Delgado de Torres, D.** (1929). Las orugas del maíz. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, 4: 1-20.
- Detsis, V.** (2009). Relationships of some environmental variables to the aggregation patterns of soil microarthropod populations in forests. *European Journal of Soil Biology*, 45: 409-416.
- Devos Y., Álvarez-Alfageme, F., Gennaro, A., Mestdagh, S.** (2015). Assessment of unanticipated unintended effects of genetically modified plants on non-target organisms: a controversy worthy of pursuit?. *Journal of Applied Entomology*, DOI: 10.1111/jen.12248
- Dively, G. P.** (2005). Impact of Transgenic VIP3A x Cry1Ab Lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. *Environmental Entomology*, 34: 1267-291.
- Dorn, B., Forrer, H. R., Jenny, E.** (2011). *Fusarium* species complex and mycotoxins in grain maize from maize hybrid trials and from grower's fields. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 693-706.
- Dorn, B., Forrer, H. R., Schuerch, S., Vogelgsang, S.** (2009). *Fusarium* species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 51-61.
- Down, P., F., Vega, F. E., Nelsen, T. C., Richard, J. L.** (1998). Dusky Sap Beetle Mediated Dispersal of *Bacillus subtilis* to Inhibit *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Production in Maize *Zea mays* L. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 221-235.
- Duan, J. J., Lundgren, J. G., Naranjo, S., Marvier, M.** (2010). Extrapolating non-target risk of Bt crops from laboratory to field. *Biology Letters*, 6: 74-77.
- Duan, J. J., Jiang, C., Head, G. P., Bhatti, M. A., Ward, D. P., Levine, S. L., Nickson, T. E., Nemeth, M. A.** (2006). Statistical power analysis of a 2-year field study and design of experiments to evaluate non-target effects of genetically modified *Bacillus thuringiensis* corn. *Ecological Entomology*, 31: 521-531.
- Dutton, A., Obrist, L., D'Alessandro, M., Diener, L., Müller, M., Romeis, J., Bigler, F.** (2004). Tracking Bt-toxin in transgenic maize to assess the risks on non-target arthropods. *IOBC/WPRS Bulletin*, 27: 57-63.
- Dutton, A., Romeis, J., Bigler, F.** (2003). Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. *Biocontrol*, 48: 611-636.

- Dutton, A., Klein, H., Romeis, J., Bigler, F.** (2002). Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology*, 27: 441-447.
- Eckert, J., Schuphan, I., Hothorn, L. A., Gathmann, A.** (2006). Arthropods on Maize Ears for Detecting Impacts of *Bt* Maize on Nontarget Organisms. *Environmental Entomology*, 35: 3-7.
- EFSA** (2011). Guidance on the post-market environmental monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 9: 2316.
- EFSA** (2010a). Scientific Opinion on the assessment of potential impacts of genetically modified plants on non-target organisms. *EFSA Journal*, 8: 1877.
- EFSA** (2010b). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8: 1879.
- EFSA** (2010c). Request for a scientific opinion on the risks for public health related to the presence of moniliformin in feed and food. European Commission. En: [file:///C:/Users/Mar%C3%ADa/Downloads/Moniliformin%20in%20feed%20and%20food%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Mar%C3%ADa/Downloads/Moniliformin%20in%20feed%20and%20food%20(1).pdf) (Fecha de acceso: 26 de septiembre de 2015).
- EFSA** (2006). Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the post market environmental monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 319: 1-27.
- Eizaguirre, M., Fantinou, A. A.** (2012). Abundance of *Sesamia nonagrioides* (Lef.) (Lepidoptera: Noctuidae) on the Edges of the Mediterranean Basin. *Psyche*, 2012: 1-7.
- Eizaguirre, M., López, C., Asín, L., Albajes, R.** (1994). Thermoperiodism, photoperiodism and sensitive stage in the diapause induction of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 40: 113-119.
- Endlweber, K., Ruess, L., Scheu, S.** (2009). Collembola switch diet in presence of plant roots thereby functioning as herbivores. *Soil Biology Biochemistry*, 41: 1151-1154.
- FAO** (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper No. 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia.
- FAOSTAT** (2014). Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. Dirección de Estadística. En: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S> (Fecha de acceso: 21 de julio de 2015).
- Faria, C. A., Wäckers, F. L., Pritchard, J., Barrett, D. A., Turlings, T. C. J.** (2007) High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteran pests. *PLoS ONE*, 2: e600.
- Farinós, G. P., Andreadis, S. S., de la Poza, M., Mironidis, G. K., Ortego, F., Savopoulou-Soultani, M., Castañera, P.** (2011). Comparative assessment of the field-susceptibility of *Sesamia nonagrioides* to the Cry1Ab toxin in areas with different adoption rates of Bt maize and in Bt-free areas. *Crop Protection*, 30: 902-906.
- Farinós, G. P., de la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P.** (2008). Diversity and seasonal phenology of the 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.** (2004). Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomology Experimentalis et Applicata*, 110: 23-30.
- Fischhoff, D. A., Bowdish, K. S., Perlak, F. J., Marrone, P. G., McCormic, S. M., Niedermeyer, J. G., Dean, D. A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E. J., Rochester, D. E., Roger, S. G., Fraley, R. T.** (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology*, 5: 807-813.
- Flores, S., Saxena, D., Stotzky, G.** (2005). Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. *Soil Biology Biochemistry*, 37: 1073-1082.
- Folcher, L., Delos, M., Marengue, E., Jarry, M., Weissenberger, A., Eychenne, N.** (2010). Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 711-719.
- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., Gérault, F., Eychenne, N., Delos, M., Regnault-Roger, C.** (2009). Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Protection*, 28: 302-308.
- Fowler, J., Cohen, L.** (1990). Practical statistics for field biology. Open University Press. Milton Keynes. Philadelphia, EE.UU.
- Fox, E. M., Howlett, B. J.** (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 481-487.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L., Woo, S. C.** (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 80: 4803-4807.
- Frampton, G. K., van den Brink, P. J., Wratten, S. D.** (2001). Diel activity patterns in an arable collembolan community. *Applied Soil Ecology*, 17: 63-80.
- Galichet, P.** (1982). Hibernation d'une population de *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lep., Noctuidae) en France méridionale. *Agronomie*, 2: 561-566.
- Galinat, W. C.** (1998). The origin of corn. En: Corn and corn improvement. Sprague, G. F., Dudley, J. W. (Eds). American society of agronomy. Crop science society of America and Soil Science of America. Iowa, EE.UU. Págs. 1-31.
- Gao, M. Q., Hou, S. P., Pu, D. Q., Shi, M., Ye, G. Y., Chen, X. X.** (2010). Multi-generation effects of Bt rice on *Anagrus nilaparvatae*, a parasitoid of the nontarget pest *Nilaparvata lugens*. *Environmental Entomology*, 39: 2039-2044.
- García, M., Ortego, F., Castañera, P., Farinós, G. P.** (2010). Effects of 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.
- García-Alonso, M., Jacobs, E., Raybould, A., Nickson, T. E., Sowig, P., Willekens, H., van der Kouwe, P., Layton, R., Amijee, F., Fuentes, A. M., Tencalla, F.** (2006). A tiered system for assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. *Environmental Biosafety Research*, 5: 57-65.

- Gatch, E. W., Hellmich, R. L., Munkvold, G. P.** (2002). A comparison of maize stalk rot occurrence in Bt and non-Bt hybrids. *Plant Disease*, 86: 1149-1155.
- Gatch, E. W., Munkvold, G. P.** (2002). Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection. *Plant Disease*, 86: 1156-1162.
- Gauld, I., Bolton, B.** (1988). Hymenoptera. Oxford University Press y British Museum (Natural History). Oxford, Reino Unido.
- GENVCE** (2007). Evaluación de las nuevas variedades de maíz para grano en España. *Vida Rural* 245: 70-75.
- GENVCE** (2011). Evaluación de las nuevas variedades de maíz para grano de ciclo 700 y transgénicas. *Vida Rural* : 60-66.
- Gill, S.S., Hornung, J. M.** (1987). Cytolytic activity of *Bacillus-thuringiensis* proteins to insect and mammalian-cell lines. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50: 16-25.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortes, L., González-Jaén, M. T., Vázquez, C.** (2015). *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food Microbiology*, 46: 168-175.
- Gil-Serna, J., Mateo, E. M., González-Jaén, M. T., Jiménez, M., Vázquez, C., Patiño, B.** (2013). Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach. *Food Additives and Contaminants Part A: Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, 30: 372-380.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T., Patiño, B.** (2011). Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section Circumdati. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22: 343-345.
- Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., Vázquez, C., Patiño, B.** (2009). ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 162-167.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P.** (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 330-338.
- GMO Compass** (2015). En: [http://www.gmo-compass.org/eng/agri\\_biotechnology/gmo\\_planting/341.genetically\\_modified\\_maize\\_global\\_area\\_under\\_cultivation.html](http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/341.genetically_modified_maize_global_area_under_cultivation.html) (Fecha de acceso: 29 de septiembre de 2015).
- Godfray, H. C. J.** (1994). Parasitoids, behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press. Princeton, EE.UU.
- Gómez, I., Arenas, I., Benítez, I., Miranda-Rios y J., Becerril, B.** (2006). Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *Journal of Biology Chemistry*, 281: 34032-34039.
- Gómez-Barbero, M., Berbel, J., Rodríguez-Cerezo, E.** (2008). Bt corn in Spain - the performance of the EU's first GM crop. *Nature Biotechnology*, 26: 384-386.

- Gong, L., Jiang, Y., Chen, F.** (2015). Molecular strategies for detection and quantification of mycotoxin-producing *Fusarium* species: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 1767-1776.
- González-Cabrera, J., Farinós, G. P., Caccia, S., Díaz-Mendoza, M., Castañera, P., Leonardi, M. G., Giordana, B., Ferré, J.** (2006). Toxicity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2594–2600.
- González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., Vázquez, C., Patiño, B.** (2008). Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives and Contaminants Part A: Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, 25: 758-764.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C., González-Jaén, M. T.** (2005). Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *Microbiology Letters*, 245: 353-361.
- Goswami, R. S., Kistler, H. C.** (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5: 515-525.
- Gregorich, E. G., Carter, M. R., Angers, D. A., Monreal, C. M., Ellert, B. H.** (1994). Towards a minimum data set to assess soil organic-matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 74: 367-385.
- Gruber, H., Paul, V., Meyer, H. H. D., Mueller, M.** (2012). Determination of insecticidal Cry1Ab protein in soil collected in the final growing seasons of a nine-year field trial of Bt-maize MON810. *Transgenic Research*, 21: 77-88.
- Guennelon, G., Audemard, H.** (1960). La Pyrale du maïs, *Ostrinia (Pyrausta) nubilalis* Hb. (Lépidoptères: Pyralidae) dans la Basse Vallée du Rhône: Observations écologiques; incidences économiques. *Annales des Epiphyties*, 11: 337-396.
- Habuštová, O., Doležal, P., Spitzer, L., Svobodová, Z., Hussein, H., Sehnal, F.** (2014). Impact of Cry1Ab toxin expression on the non-target insects dwelling on maize plants. *Journal of Applied Entomology*, 138: 164-172.
- Hammond, B. G., Campbell, K. W., Pilcher, C. D., DeGooyer, T. A., Robinson, A. E., McMillen, B. L., Spangler, S. M., Riordan, S. G., Rice, L. G., Richard, J. L.** (2004). Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1390-1397.
- Han, Y., Wang, H., Chen, J., Cai, W., Hua, H.** (2015). No impact of transgenic Cry2Aa rice on *Anagrus nilaparvatae*, an egg parasitoid of *Nilaparvata lugens*, in laboratory tests. *Biological Control*, 82: 46-51.
- 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.
- Hassell, M. P.** (2000). Host-parasitoid population dynamics. *Journal of Animal Ecology*, 69: 543-566.

- Heckmann, L. H., Griffiths, B. S., Caul, S., Thompson, J., Pusztai-Carey, M., Moar, W. J., Andersen, M. N., Krogh, P. H.** (2006). Consequences for *Protaphorura armata* (Collembola: Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize. *Environment Pollution*, 142: 212-216.
- Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., Spencer, T., Bidne, K. G., Lewis, L. C., Lewis, L. C.** (2001). Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 98: 11925-11930.
- Hendriksma, H. P., Härtel, S., Steffan-Dewenter, I.** (2011). Testing pollen of single and stacked insect-resistant Bt-maize on in vitro reared honey bee larvae. *PLoS ONE*, 6: e28174.
- Hesami, S., Seyedoleslami, H., Ebadi, R.** (2004). Biology of *Anagrus atomus* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of the grape leafhopper *Arboridia Kermanshah* (Homoptera: Cicadellidae). *Entomological Science*, 7: 271-276.
- Hilbeck, A., Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A., Bigler, F.** (1998a). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, 27: 1255-1263.
- Hilbeck, A., Baumgartner, M., Fried, P. M., Bigler, F.** (1998b). Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera:Chrysopidae). *Environmental Entomology*, 27: 480-487.
- Höfte, H., Whiteley, H. R.** (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Review*, 53: 242-255.
- Hoerling, M., Eischeid, J., Perlwitz, J., Quan, X., Zhang, T., Pegion, P.** (2012). On the Increased Frequency of Mediterranean Drought. *Journal of Climate*, 25: 2146-2161.
- Hopkins, D. W., Gregorich, E. G.** (2003). Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science*, 54: 793-800.
- Huang, F., Qureshi, J. A., Meagher, Jr. R. L., Reisig, D. D., Head, G. P., Andow, D., Ni, X., Kerns, D., Buntin, G. D., Niu, Y., Yang, F., Danga, V.** (2014). Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. *PLoS ONE*, 9: e112958.
- Huber, J. T.** (1986). Systematics, biology and hosts of the Mymaridae and Mymaromatidae (Insecta-Hymenoptera): 1758-1984. *Entomography*, 4: 185-243.
- ICH** (2005). Harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. En: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html> (Fecha de acceso: 9 de enero de 2015).
- Icoz, I., Stotzky, G.** (2008). Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. *Soil Biological Biochemistry*, 40: 559-586.

- Infantino, A., Pucci, N., Conca, G., Santori, A.** (2007). First report of *Fusarium langsethiae* on durum wheat kernels in Italy. *Plant Disease*, 91: 1362.
- ISAAA** (2013). International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. En: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/pptslides/default.asp> (Fecha de acceso: 21 de julio de 2015).
- James, C.** (2013). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. ISAAA Brief 46. ISAAA. Ithaca. Nueva York, EE.UU
- Jonsson, M., Jestoi, M., Nathanail, A. V., Kokkonen, U. M., Anttila, M., Koivisto, P., Karhunen, P., y Peltonen, K.** (2013). Application of OECD guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 27-32.
- Jordana, R., Arbea, J. I.** (1989). Clave de identificación de los géneros de Colémbolos de España (Insecta:Collembola). *Serie Zoológica*, 19: 1-16.
- Jordana, R., Arbea, J. I., Simón, J. C., Lucíañez, M. J.** (1997). *Collembola, Poduromorpha*. Fauna Ibérica, vol. 8. Ramos M. A., Alba J., Bellés X., Gosálbez J., Guerra A., Macpherson E., Martín F., Serrano y Templado J. (Eds). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid, España.
- Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., Giband, M.** (1998). Transgenic plants for insects resistance. *Plant Science*, 131: 1-11.
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V., González-Jaén, M. T.** (2006a). PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 681-689.
- Jurado M., Vázquez C., Callejas C., González-Jaén M. T.** (2006b). Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the South West of Spain. *Mycotoxin Research*, 22: 87-91.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., González-Jaén, M. T.** (2005). PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*, *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 562-568.
- Kabak, B., Dobson, A. D. W.** (2009). Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 9: 1812-2016.
- Keller, N. P., Turner, G., Bennett, J. W.** (2005). Fungal secondary metabolism-From biochemistry to genomics. *Nature Reviews. Microbiology*, 3: 937-947.
- Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., Groopman, J. D.** (2011). Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120: 28-48.
- Kiss, J., Szentkirályi, F., Tóth, F., Szénási, A., Kádár, F., Árpás, K., Szekeres, D., Edwards, C. R.** (2002). Bt corn: impact on non-targets and adjusting to local IPM systems. En: Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems. Lelley, T., Balázs, E., Tepfer, M. (Eds.). Facultas. Viena, Austria. Págs. 157-172.

- Klötzel, M., Lauber, U.** (2006). New SPE Sorbent for Clean-up of Fusarium Toxin-contaminated Cereals & Cereal-based Foods, Bond Elut Mycotoxin. Chemisches u. Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart. Application Note. Agilent Technologies. Waldbronn, Alemania.
- Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M. R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M., Evola, S.** (1993). Field performance of elite transgenic maize plants. *Biotechnology*, 11: 194-200.
- Krantz, G. W.** (1978). A Manual of Acarology,. Oregon State University Book Stores Inc., Corvallis. Oregon, EE.UU.
- Kruger, M., van Rensburg, J. B. J., van Der Berg, J.** (2011a). Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. *Environmental Entomology*, 40: 477-483.
- Kruger, M., van Rensburg, J. B. J., van Der Berg, J.** (2011b). Transgenic Bt maize: farmers' perceptions, refuge compliance and reports of stem borer resistance in South Africa. *Journal of Applied Entomology*, 5: 1-12.
- Kruger, M., van Rensburg, J. B. J., van den Berg, J.** (2009). Perspective on the development of stem borer resistance to Bt maize and refuge compliance at the Vaalharts irrigation scheme in South Africa. *Crop Protection*, 28: 684-689.
- Lacey, J., Magan, N.** (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Chelkowski, J. (Ed.). Elsevier. Amsterdam, Holanda. Págs. 77-118.
- Lang, A., Otto, M.** (2010). A synthesis of laboratory and field studies on the effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize on non-target Lepidoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 135: 121-134.
- Lattanzio, V. M. T., Della Gatta, S., Suman, M., Visconti, A.** (2011). Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B-1, B-2, G(1), G(2), ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25: 1869-1880.
- Lawo, N. C., Romeis, J.** (2008). Assessing the utilization of a carbohydrate food source and the impact of insecticidal proteins on larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. *Biological Control*, 44: 389-398.
- Lehman, R. M., Osborne, S. L., Prischmann-Voldseth, D. A., Rosentrater, K. A.** (2010). Insect-damaged corn stalks decompose at rates similar to Bt-protected, non-damaged corn stalks. *Plant and Soil*, 333: 481-490.
- Lehmann, F., Schirra, K. J., Louis, F., Zebitz, C. P. W.** (2001). The green leafhopper *Empoasca vitis* Goethe – population dynamics in different zones of foliation and effects of insecticide treatments in vineyards. *Integrated Control in Viticulture IOBC wprs Bulletin*, 24: 231-235.

## Bibliografía

- Lewis, L. C.** (1975). Natural regulation of crop pests in their indigenous ecosystems and in Iowa agrosystems: bioregulation of economic insect pests. *Iowa State Journal of Research*, 49: 435-445.
- Li, Y. H., Meissle, M., Romeis, J.** (2008). Consumption of Bt maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 goes not harm adult green lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *PLoS ONE*, 3: e2909.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G.** (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 645-667.
- Logrieco, A., Mulé, G., Moretti, A., Bottalico, A.** (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 597-609.
- López, C., Eizaguirre, M., Albajes, R.** (2003). Courtship and mating behaviour of the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1: 43-51.
- López, C., Sans, A., Asin, L., Eizaguirre, M.** (2001). Phenological model for *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 30: 23-30.
- Losey, J. E., Rayor, L. S., Carter, M. E.** (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399: 214.
- Lucena, W. A., Pelegrini, P. B., Martins-de-Sa, D., Fonseca, F. C. A., Gomes, J. E., de Macedo, L. L. P., da Silva, M.C. M., Oliveira, R. S., Grossi-de-Sa, M. F.** (2014). Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. *Toxins*, 6: 2393-2423.
- Lundgren, J. G., Gassmann, A. J., Bernal, J., Duan, J. J., Ruberson, J.** (2009) Ecological compatibility of GM crops and biological control. *Crop Protection*, 28: 1017-1030.
- Lutz, B., Wiedemann, S., Einspanier, R., Mayer, J., Albrecht, C.** (2005). Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53: 1453-1456.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D.** (2011). Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*, 60: 150-163.
- Magg, T., Melchinger, A. E., Klein, D., Bohn, M.** (2002). Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts, and commercial varieties. *Plant Breeding*, 121: 146-154.
- MAGRAMA** (2015a). Oficina Española de variedades vegetales. Catálogos nacionales y comunitarios. En: <http://www.magrama.gob.es/app/regVar/ResBusVariedades.aspx?id=es&TxtEspecie=MAIZ&IDEspecie=28&OGM=S> (Fecha de acceso: 21 de julio de 2015).
- MAGRAMA** (2015b). Estimación superficie cultiva de maíz MON810 por provincias. En: <http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg/-consejo-interministerial-de-ogms/superficie.aspx> (Fecha de acceso: 29 de septiembre 2015).

- MAGRAMA** (2015c). Avances de superficie y producción de cultivos. En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/avances-superficies-producciones-agricolas/> (Fecha de acceso: 29 de septiembre de 2015).
- MAGRAMA** (2015d). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/resultados-de-anos-anteriores/default.aspx> (Fecha de acceso: 26 de septiembre de 2015).
- Malvar, R. A., Revilla, P., Velasco, P., Cartea, M. E., Ordas, A.** (2002). Insect damage to sweet corn hybrids in the south Atlantic European coast. *Journal of the American Society for Horticultural*, 127: 693-696.
- Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M. T.** (2010a). Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 140: 169-174.
- Marín, P., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M. T.** (2010b). Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 73: 303-311.
- Marín, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V.** (2012). Reduction of mycotoxins and toxigenic fungi in the Mediterranean basin maize chain. *Phytopathologia Mediterranea*, 51: 93-118.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N.** (1998a). Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102: 831-837.
- Marín, S., Sanchis, V., Arnau, F., Ramos, A. J., Magan N.** (1998b). Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 45: 107-117.
- MARM** (2010). Planes de seguimiento ambiental del cultivo de maíz modificado genéticamente en España. Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. Madrid, España.
- Mason, C. E., Rice, M. E., Calvin, D. D., Van Duyn, J. W., Showers, W. B., Hutchinson, W. D., Witkowski, J. F., Higgens, R. A., Onstad, D. W., Dively, G. P.** (1996). European corn borer. Ecology and Management, North Central Regional Extension Publication No. 327. Iowa State University, Ames, EE.UU.
- Mateo, E. M., Gil-Serna, J., Patiño, B., Jiménez, M.** (2011). Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 118-126.
- McNabb, D. M., Halaj, J., Wise, D. H.** (2001). Inferring trophic positions of generalist predators and their linkage to the detrital food web in agroecosystems: a stable isotope analysis. *Pedobiologia*, 45: 289-297.
- Meissle, M., Romeis, J., Bigler, F.** (2011). Bt maize and integrated pest management - a European perspective. *Pest Management Science*, 67: 1049-1058.

- Meissle, M., Mouron, P., Musa, T., Bigler, F., Pons, X., Vasileiadis, V. P.** (2010). Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. *Journal of Applied Entomology*, 134: 357-375.
- Meissle, M., Romeis, J.** (2009). The web-building spider *Theridion impressum* (Araneae: Theridiidae) is not adversely affected by Bt maize resistant to corn rootworms. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 645-656.
- Mencarelli, M., Accinelli, C., Vicari, A.** (2013). Implications of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, infestation in an *Aspergillus flavus*-biocontrolled corn agroecosystem. *Pest Management Science*, 69: 1085-1091.
- Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z., Matthews, K.** (2003). Are Bt crops safe?. *Nature Biotechnology*, 21: 1003-1009.
- Mendes, C.** (1913). Lepidopteros Mais Daninhos á Agricultura nos Arredores de S. Fiel. *Brotéria. Série Zoológica*, 11: 40-44.
- Messeguer, J., Peñas, G., Ballester, J., Bas, M., Serra, J., Salvia, J., Palaudelmàs, M., Melé, E.** (2006). Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnology Journal*, 4: 633-645.
- Miller, J. D.** (1995). Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Product Research*, 31: 1-6.
- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A.** (2009). Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1009-21.
- Mommaerts, V., Jans, K., Smagghe, G.** (2010). Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Management Science*, 66: 520-525.
- Moretti, A., Mulé, G., Ritieni, A., Laday, M., Stubnya, V., Hornok, L., Logrieco, A.** (2008). Cryptic subspecies and beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 312-315.
- Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Randazzo, G., Corda, P.** (1995). Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. *Mycological Research*, 99: 282-286.
- Moyal, P., Tokro, P., Bayram, A.** (2011). Origin and taxonomic status of the Palearctic population of the stem borer *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Journal Linnean Society*, 103: 904-922.
- Moyal, P., El-Said, M. M., Mosad, M. M.** (2002). Spatio-temporal distribution and enumerative sampling of the pink borer, *Sesamia cretica* Led. (Lepidoptera: Noctuidae), in maize fields in Egypt. *Insect Science and its Application*. 22: 29-40.
- Muchaonyerwa, P., Waladde, S., Nyamugafata, P., Mpeperekwi, S., Ristori, G. G.** (2004). Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils. *Plant and Soil*, 266: 41-46.

- Mulé, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A.** (2004). A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 495-502.
- Munkvold, G. P.** (2003a). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99-116.
- Munkvold, G. P.** (2003b). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 705-713.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L., Rice, L. G.** (1999). Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Disease*, 83: 130-138.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., Carlton, W. M.** (1997). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 87: 209-217.
- Murphy, A. F., Rondon, S. I., Jensen, A. S.** (2012). Population Dynamics of the Beet Leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) in the Columbia Basin as Influenced by Abiotic Variables. *Environmental Entomology*, 41: 768-775.
- Murphy, B. C., Rosenheim, J. A., Granett, J.** (1996). Habitat Diversification for Improving Biological Control: Abundance of *Anagrus epos* (Hymenoptera: Mymaridae) in Grape Vineyards. *Biological Control*, 25: 495-504.
- Naef, N., Défago, G.** (2006). Population structure of plantpathogenic *Fusarium* species in overwintered stalk residues from Bt-transformed and non-transformed maize crops. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 126-143.
- Nguyen, H. T., Jehle, J. A.** (2007). Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON810. *Journal of Plant Disease Protection*, 114: 82-87.
- Nickel, H.** (2003). The Leafhoppers and Planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha), Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. Pensoft Series Faunistica. Moscow, Rusia.
- Niessen, L.** (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 38-46.
- Obrist, L. B., Dutton, A., Albajes, R., Bigler, F.** (2006). Exposure of arthropod predators to Cry1Ab toxin in Bt maize fields. *Ecological Entomology*, 31: 143-154.
- Obrist, L. B., Klein, H., Dutton, A., Bigler, F.** (2005). Effects of Bt maize on *Frankliniella tenuicornis* and exposure of thrips predators to prey-mediated Bt toxin. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115: 409-416.
- Ortego, F., Pons, X., Albajes, R., Castañera, P.** (2009). European commercial genetically modified plantings and field trials. En: Environmental Impact of Genetically Modified Crops. Ferry, N., Gatehouse, A. M. R. (Eds.). CAB International. Wallingford, Reino Unido. Págs. 327-343.
- Ostry, V., Ovesna, J., Skarkova, J., Pouchova V., Ruprich, J.** (2010). A review on comparative data concerning *Fusarium* mycotoxins in Bt maize and non-Bt isogenic maize. *Mycotoxin Research*, 26: 141-145.

- Papst, C., Utz, H. F., Melchinger, A. E., Eder, J., Magg, T., Klein, D., Bohn, M.** (2005). Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic Bt vs. non-Bt maize hybrids under European corn borer pressure. *Agronomy Journal*, 97: 219-224.
- Pardo, G., Cirujena, A., Betrán, E., Fernández-Cavada, S., Fuertes, S., Rodríguez, E., Perdiguier, A., Aibar, J., Zaragoza, C.** (2014). TEOSINTE, una nueva mala hierba que amenaza al maíz. *Tierras*, 223: 52-59.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A. J., Sanchis, V.** (2004). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology International*, 10: 45-49.
- Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., Vázquez, C.** (2005). PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal Food Microbiology*, 104: 207-214.
- Patiño, B., Mirete, S., González-Jaén, M. T., Mulé, G., Rodríguez, M. T., Vázquez, C.** (2004). PCR Detection Assay of Fumonisin-Producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection*, 67: 1278-1283.
- Pazzi, F., Lener, M., Colombo, L., Monastra, G.** (2006). Bt maize and mycotoxins: The current state of research. *Annual Microbiology*, 56: 223-230.
- Perry, J. N., Rothery, P., Clark, S. J., Heard, M. S., Hawes, C.** (2003). Design, analysis and statistical power of the farm-scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Journal of Applied Ecology*, 40: 17-31.
- Peterson, J. A., Romero, S. A., Harwood, J. D.** (2010). Pollen interception by linyphiid spiders in a corn agroecosystem: implications for dietary diversification and risk-assessment. *Arthropod-Plant Interactions*, 4: 207-217.
- Pintos, V., Aguín, C., Chaves, P., Ferreiroa-Martínez, V., Sainz, M., Scauflaire, J., Munaut, F., Mansilla, V.** (2013). First report of *Fusarium temperatum* causing seedling blight and stalk Rot on maize in Spain. *Plant Disease*, 97: 252-1252.
- Pitt, J. I.** (1996). What are mycotoxins?. *Australian Mycotoxin Newsletter*, 7: 1.
- Poerchmann, J., Gathmann, A., Augustin, J., Langer, U., Gorecki, T.** (2005). Molecular composition of leaves and stems of genetically modified bt and near-isogenic non-Bt maize - Characterization of lignin patterns. *Journal Environmental Quality*, 34: 1508-1518.
- Pons, X., Lubierres, B., López, C., Albajes, R.** (2005). Abundance of nontarget pests in transgenic Bt-maize: A farm scale study. *European Journal of Entomology*, 102: 73-79.
- Prasifka, J. R., Hellmich, R. L., Dively, G. P., Higgins, L. S., Dixon, P. M., Duan, J. J.** (2008). Selection of nontarget arthropod taxa for field research on insecticidal transgenic crops: using empirical data and statistical power. *Environmental Entomology*, 37: 1-10.
- Ramírez-Romero, R., Desneux, N., Chaufaux, J., Kaiser, L.** (2008a). Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1Ab toxin detection. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91: 110-115.

- Ramírez-Romero, R., Desneux, N., Decourtye, A., Chaffiol, A., Pham-Delegue, M. H.** (2008b). Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 327-333.
- Raps, A., Kehr, J., Gugerli, P., Moar, W. J., Bigler, F., Hilbeck, A.** (2001). Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Molecular Ecology*, 10: 525-533.
- RASFF** (2015). RASFF Portal. En: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchForm#> (Fecha de acceso: 30 de septiembre de 2015).
- Rauschen, S., Schultheis, E., Hunfeld, H., Schaarschmidt, F., Schuphan, I., Eber, S.** (2010). Diabrotica-resistant Bt-maize DkC5143 event MON88017 has no impact on the field densities of the leafhopper *Zyginidia scutellaris*. *Environmental Biosafety Research*, 9: 87-99.
- Rauschen, S.** (2008a). Biosafety research into *Diabrotica*-resistant Bt-maize: Indicator organisms and monitoring methods. Tesis doctoral. Universidad RWTH Aachen, Alemania.
- Rauschen, S., Eckert, J., Schaarschmidt, E., Schuphan, I., Gathmann, A.** (2008b). An evaluation of methods for as-sessing the impacts of Bt-maize MON810 cultivation and pyrethroid insecticide use on Auchenorrhyncha (Planthoppers and Leafhoppers). *Agricultural for Entomology*, 10: 331-339.
- Rauschen, S., Eckert, J., Gathmann, A., Schuphan, I.** (2004). Impact of growing Bt-maize on cicadas: diversity, abundance and methods. *IOBC/wprs Bulletin*, 27: 137-142.
- Richard, J. L.** (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10.
- Romeis, J., Meissle, M., Álvarez-Alfageme, F., Bigler, F., Bohan, D. A., Devos, Y., Malone, L. A., Pons, X., Rauschen, S.** (2014). Potential use of an arthropod database to support the nontarget risk assessment and monitoring of transgenic plants. *Transgenic Research*, 23: 995-1013.
- Romeis, J., Bartsch, D., Bigler, F., Candolfi, M. P., Gielkens, M. M. C., Hartley, S. E., Hellmich, R. L., Huesing, J. E., Jepson, P. C., Layton, R., Quemada, H., Raybould, A., Rose, R. I., Schiemann, J., Sears, M. K., Shelton, A. M., Sweet, J., Vaituzis, Z., Wolt, J. D.** (2008). Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology*, 26: 203-208.
- Rubinstein, H. R., Theumer, M. G.** (2011). Principales micotoxinas. En: Micotoxinas y micotoxicosis. Ramos, A. J. (Ed.). AMV Ediciones. Madrid, España. Págs. 45-72.
- Sala, N., Sanchis, V., Vilaro, P., Viladrich, R., Torres, M., Viñas, I., Canela, R.** (1994). Fumonisin Producing Capacity of *Fusarium* Strains Isolated from Cereals in Spain. *Journal of Food Protection*, 10: 854-941.
- Samayoa, F. L., Butrón, A., Malvar, R. A.** (2014). QTL mapping for maize resistance and yield under infestation with *Sesamia nonagrioides*. *Molecular Breeding*, 34: 1331-1344.
- Sambrook, J., Russell D. W.** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, EE.UU.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P.** (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 283-300.

- Sanchis, V., Bourguet, D.** (2009). *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. En: Sustainable agriculture. Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchere, V., Alberola, C. (Eds.). EDP Sciences and Springer. Amsterdam, Holanda.
- Sanchis, V., Bourguet, D.** (2008). *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28: 11-20.
- Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M. T., Patiño, B.** (2010). Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour using a highly sensitive PCR assay. *Food Additives and Contaminants*, 27: 853-858.
- Sauka, D. H., Basurto-Rios, R. E., Ibarra, J. E., Benintende, G. B.** (2010). Characterization of an Argentine Isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 Strain. *Neotropical Entomology*, 39: 767-773.
- Saxena, D., Flores, S., Stotzky, G.** (2002). Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 133-137.
- Saxena, D., Stotzky, G.** (2001a). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1225-1230.
- Saxena, D., Stotzky, G.** (2001b). Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany*, 88: 1704-1706.
- Saxena, D., Flores, S., Stotzky, G.** (1999). Transgenic plants - Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 402: 480-480.
- Scarpino, V., Reyneri, A., Vanara, F., Scopel, C., Causin, R., Blandino, M.** (2015). Relationship between European Corn Borer injury, *Fusarium proliferatum* and *F. subglutinans* infection and moniliformin contamination in maize. *Field Crops Research*, 183: 69-78.
- Scauftaire, J., Gourgue, M., Munaut, F.** (2011). *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia*, 103: 586-597.
- Schnell, J., Steele, M., Bean, J., Neuspiel, M., Girard, C., Dormann, N., Pearson, C., Savoie, A., Bourbonniere, L., Macdonald, P.** (2015). A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments. *Transgenic Research*, 24: 1-17.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J.** (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 775-806.
- Schuch, S., Wesche, K., Schaefer, M.** (2012). Long-term decline in the abundance of leafhoppers and planthoppers (Auchenorrhyncha) in Central European protected dry grasslands. *Biological Conservation*, 149: 75-83.
- Seastedt, T. R.** (1984). The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annual Review Entomology*, 29, 25-46.
- Showers, W. B., Hellmich, R. L., Derrick-Robinson, M. E.** (2001). Aggregation and dispersal behavior of marked and released European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) adults. *Environmental Entomology*, 30: 700-710.

- Siegfried, B. D., Hellmich, R. L.** (2012). Understanding successful resistance management: The European corn borer and Bt corn in the United States. *GM Crops and Food*, 3: 184-193.
- Siegfried, B. D., Spencer, T., Crespo, A. L., Storer, N. P., Head, G. P., Owens, E. D., Guyer, D.** (2007). Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. *American Entomology*, 53: 208-214.
- Sims, S. R., Holden, L. R.** (1996). Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki Cry1A(b) protein in corn tissues. *Environmental Entomology*, 25: 659-664.
- Sims, S. R., Martin, J. W.** (1997). Effect of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins CryIA(b), CryIA(c), CryIIA, and CryIIIA on *Folsomia candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collembola). *Pedobiologia*, 41: 412-416.
- Sinha, R. N., Wallace, H. A. H.** (1965). Ecology of a fungus-induced hot spot in stored grain. *Canadian journal of plant science*, 45: 48-59.
- Sobek, E. A., Munkvold, G. P.** (1999). European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *Journal of Economic Entomology*, 92: 503-509.
- Stamps, W. T., Dailey, T. V., Gruenhagen, N. M.** (2007). Infestation of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, in Midwestern USA fields with herbaceous borders. *Agriculture Ecosystems Environment*, 121: 430-434.
- Storer, N. P., Kubiszak, M. E., King, J. E., Thompson, G. D., Santos A. C.** (2012). Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 294-300.
- Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W.** (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103: 1031-1038.
- Stotzky, G.** (2004). Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil*, 266: 77-89.
- Sutton, D. A., Fothergill, A. W., Rinaldi, M. G.** (1998). Guide to Clinically Significant fungi. Williams & Wilkins. Philadelphia, EE.UU.
- Suverkropp, B. P., Dutton, A., Bigler, F.** (2008). Oviposition behaviour and egg distribution of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, on maize, and its effect on host finding by *Trichogramma* egg parasitoids. *Bulletin of Insectology*, 61: 303-312.
- Székács, A., Lauber, E., Juracsek, J., Darvas, B.** (2010a). Cry1ab toxin production of MON810 transgenic maize. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29: 182-190.
- Székács, A., Lauber, E., Takács, E., Darvas, B.** (2010b). Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 2203-2211.
- Tabashnik, B. E., Brévault, T., Carrière, Y.** (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31: 510-531.

- Tabashnik, B. E.** (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Entomology*, 39: 47-79.
- Tapp, H., Stotzky, G.** (1998). Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 471-476.
- Thomas, W. E., Ellar, D. J.** (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystalendotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *Journal of Cell Science*, 60: 179-181.
- Todd, J. H., Ramankutty, P., Barraclough, E. I., Malone, L. A.** (2008). A screening method for prioritizing non-target invertebrates for improved biosafety testing of transgenic crops. *Environmental Biosafety Research*, 7: 35-56.
- Tonkyn, D. W., Whitcomb, R. F.** (1987). Feeding strategies and the guild concept among vascular feeding insects and microorganisms. En: *Current Topics in Vector Research*, Vol. 4. Springer-Verlag. Nueva York, EE.UU. Págs. 179-199.
- Turner, N. W., Subrahmanyamb, S., Piletsky, S. A.** (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180.
- USDA** (2013). EU-27 Agricultural Biotechnology Annual. Global Agricultural Information Network. Washington D.C., EE.UU.
- USDA** (1994). Petition for Determination of Nonregulated Status of Ciba Seed´ Con Genetically Engineered to Express the Cry1A(b) Protein from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Washington D.C., EE.UU.
- USEPA** (2001). Bt Plant-Incorporated Protectants. Biopesticides Registration Action Document. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Washington D.C. EE.UU.
- Usmani, M. K.** (2012). Biological Investigations on Some species of *Anagrus* (Hymenoptera, Mymaridae), Egg Parasitoids of Leafhoppers (Hemiptera). *APCBEE Procedia*, 4: 1-5.
- Vachon, V., Laprade, R., Schwartz J. L.** (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 1-12.
- van Frankenhuyzen, K.** (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 1-16.
- van Rensburg, J. B. J.** (2007). First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal Plant Soil*, 24: 147-151.
- van Straalen, N. M.** (1998). Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. *Applied Soil Ecology*, 9: 429-437.
- Vasileiadis, V. P., Sattin, M., Otto, S., Veres, A., Palinkas, Z., Ban, R., Pons, X., Kudsk, P., van der Weide, R., Czembor, E., Moonen, A. C., Kiss, J.** (2011). Crop protection in European maize-based cropping systems: Current practices and recommendations for innovative Integrated Pest Management. *Agricultural Systems*, 104: 533-540.

- Velasco, P., Revilla, P., Monetti, L., Butrón, A., Ordás, A.** (2007). Corn borers (Lepidoptera: Noctuidae; Crambidae) in Northwestern Spain: population dynamics and distribution. *Maydica*, 52: 195-203.
- Velasco, P., Revilla, P., Butrón, A.** (2002). Ear damage of sweet corn inbreds and their hybrids under multiple corn borer infestation. *Crop Science*, 42: 724-729.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A. J., Sanchis, V.** (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B-1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 59-66.
- Vining, L. C.** (1990). Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology*, 44: 395-427.
- Wang J. H., Zhang J. B., Li H. P., Gong A. D., Xue, S., Agboola, R. S., Liao Y. C.** (2013). Molecular Identification, Mycotoxin Production and Comparative Pathogenicity of *Fusarium temperatum* Isolated from Maize in China. *Journal of Phytopathol*, 162: 147-157.
- WHO** (1999). Guideline Specification for Bacterial Larvicides for Public Health Use. Report of the WHO Informal Consultation. WHO. Ginebra, Suiza.
- Wilson, A., Simpson, D., Chandler, E., Jennings, P., Nicholson, P.** (2004). Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 233: 69-76.
- Winter, J. P., Behan-Pelletier, V. M.** (2008). Microarthropods. En: Soil sampling and methods of analysis. Carter, M. R., Gregorich, E. G. (Eds.). CRC Press, Taylor & Francis. Florida, EE.UU. Págs. 399-414.
- Wu, F.** (2006). Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health and regulatory impacts. *Transgenic Research*, 15: 277-289.
- Wu, F., Guclu, H.** (2012). Aflatoxin Regulations in a Network of Global Maize Trade. *PLoS ONE*, 7: e45151.
- Xue, K., Diaz, B. R., Thies, J. E.** (2014). Stability of Cry3Bb1 protein in soils and its degradation in transgenic corn residues. *Soil Biology Biochemistry*, 76: 119-126.
- Yang, X., Yang, Z., Warren, M. W., Chen, J.** (2012). Mechanical fragmentation enhances the contribution of Collembola to leaf litter decomposition. *European Journal of Soil Biology*, 53: 23-31.
- Yates, I. E., Sparks, D. I.** (2008). *Fusarium verticillioides* dissemination among maize ears of field-grown plants. *Crop Protection*, 27: 606-613.
- Yu, H., Romeis, J., Li, Y., Li, X., Wu, K.** (2014) Acquisition of Cry1Ac Protein by Non-Target Arthropods in Bt Soybean Fields. *PLoS ONE*, 9: e103973.
- Yu, H. L., Li, Y. H., Wu K. M.** (2011). Risk Assessment and Ecological Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Crops on Non-Target Organisms. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53: 520-538.
- Zain, M. E.** (2010). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15: 129-144.
- Zangerl, A. R., McKenna, D., Wraight, C. L., Carroll, M., Ficarello, P., Warner, R., Berenbaum, M. R.** (2001). Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 98: 11908-11912.

- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., Bulla, Jr. L. A.** (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Science The United States of America*, 103: 9897-9902.
- Zhao, J. Z. Cao, J., Collins, H. L. Bates, S. L., Roush, R. T., Earle, E. D., Shelton, A. M.** (2005). Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. *Proceedings of the National Academy of Science The United States of America*, 102: 8426-8430.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. M., Mañes, J.** (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1-18.
- Zurbrugg, C., Hönemann, L., Meissle, M., Romeis, J., Nentwig, W.** (2010). Decomposition dynamics and structural plant components of genetically modified Bt maize leaves do not differ from leaves of conventional hybrids. *Transgenic Research*, 19: 257-267.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Gugerli, P., Nentwig, W.** (2003). Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, 12: 765-775.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Nentwig, W.** (2007). Field decomposition of transgenic Bt maize residue and the impact on non-target soil invertebrates. *Plant and Soil*, 300: 245-257.

ANEXOS



**Anexo 1.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y Bt recogidas en Extremadura en 2011.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>								
		DON	T-2	HT-2	AF.	ZEA	OTA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
Maíz no-Bt	RL P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	536	49	585
	RL P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	378	65	443
	RL P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.309	551	2.860
	RL P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33.788	13.427	47.215
	RL P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24	14	38
	DB P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25	3	28
	DB P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	126	128	254
	DB P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27	9	36
	DB P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34.043	9.958	44.001
	DB P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14.281	7.027	21.308
	MA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	3	7
	MA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	133	37	170
	MA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16	3	19
	MA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	2	5
	MA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	2	10
	MH P1	n.d.	n.d.	33	n.d.	n.d.	n.d.	111	23	134
	MH P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	83	20	103
	MH P3	122	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.039	220	2.259
	MH P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	108	20	128
	MH P5	n.d.	23	27	n.d.	n.d.	n.d.	114	12	126
Maíz Bt	RL P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43	8	51
	RL P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16	n.d.	16
	RL P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23	2	25
	RL P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	RL P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11	n.d.	11
	DB P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DB P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DB P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44	2	46
	DB P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DB P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MA P1	n.d.	3491	6337	n.d.	n.d.	n.d.	36	6	42
	MA P2	n.d.	34	48	n.d.	n.d.	n.d.	22	2	24
	MA P3	n.d.	n.d.	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MH P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13	n.d.	13
	MH P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33	6	39
	MH P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50	6	56
	MH P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MH P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Localidad: RL: Riobos, DB: Don Benito, MA: Madrigalejo, MH: Moheda de Gata; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; AF.: total aflatoxinas (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>); ZEA: zearalenonas; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisinas  
n.d.: <LOD

**Anexo 2.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y Bt recogidas en Extremadura en 2012.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>						
		DON	T-2	HT-2	ZEA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
Maíz no-Bt	VR P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44	40
	VR P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	67.517	30.365	97.882
	VR P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50	62	112
	VR P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.092	521	1.613
	VR P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40	n.d.	40
	OB P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19.241	9.087	28.328
	OB P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31	n.d.	30
	OB P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	63.984	23.155	87.140
	OB P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44	54	98
	OB P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.975	1.058	4.034
Maíz Bt	VR P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VR P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VR P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VR P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	252	82	333
	VR P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	OB P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	OB P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	OB P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	140	61	201
	OB P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	127	n.d.	130
	OB P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Localidad: VR: Villar de Rena, OB: Obando; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; ZEA: zearalenonas; FB: fumonisinas

n.d.: <LOD

**Anexo 3.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y Bt recogidas en Albacete en 2011.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>								
		DON	T-2	HT-2	AF.	ZEA	OTA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
Maíz no-Bt	MO P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MO P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MO P3	282	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	505	75	580
	MO P4	1.936	n.d.	n.d.	8	63	n.d.	130.930	37.569	168.499
	MO P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	123	47	170
	BA P1	n.d.	n.d.	11	n.d.	n.d.	n.d.	75	17	92
	BA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11.180	4.236	15.416
	BA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.773	920	2.693
	BA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.129	1.629	7.758
	SA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58	17	75
	SA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	306	226	532
	SA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.805	1.387	4.192
	SA P4	540	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	89	17	106
	SA P5	n.d.	n.d.	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Maíz Bt	MO P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MO P2	n.d.	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	31
	MO P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MO P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	31
	MO P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	70	32	102
	BA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	127	32	159
	BA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	232	32	264
	BA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	31
	BA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	31
	SA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Localidad: MO: Motilleja, BA: Barrax, SA: El Salobral; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; AF.: total aflatoxinas (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>); ZEA: zearalenonas; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisinas  
n.d.: <LOD

**Anexo 4.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y Bt recogidas en Albacete en 2012.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>						
		DON	T-2	HT-2	ZEA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
Maíz no-Bt	GI P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	229	131	360
	GI P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	98	54	152
	GI P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43	n.d.	40
	GI P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.166	337	1.504
	GI P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.455	3.454	13.909
	HE P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.944	2.407	5.351
	HE P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12.795	3.329	16.124
	HE P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	124	56	180
	HE P4	n.d.	n.d.	n.d.	56	1.384	781	2.165
	HE P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23.803	10.707	34.510
Maíz Bt	GI P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40	n.d.	40
	GI P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	GI P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	63	48	111
	GI P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	GI P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	165	n.d.	170
	HE P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	HE P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	HE P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	HE P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	HE P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Localidad: GI: La Gineta, HE: La Herrera; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; ZEA: zearalenonas; FB: fumonisinas

n.d.: <LOD

**Anexo 5.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y Bt recogidas en Valle del Ebro en 2012.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>						
		DON	T-2	HT-2	ZEA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
Maíz no-Bt	EJ P1	141	n.d.	n.d.	n.d.	15	n.d.	15
	EJ P2	1.905	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	EJ P3	9.537	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	EJ P4	1.702	n.d.	n.d.	n.d.	1.830	1.320	3.150
	EJ P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	500	750	1.250
	CA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	990	140	1.130
	UR P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.040	430	4.470
	UR P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.830	600	3.430
	LU P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	510	110	620
	LU P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.110	1.230	6.340
	LU P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	57.890	12.840	70.730
	LU P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	60	n.d.	60
	LU P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Maíz Bt	EJ P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	EJ P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17	n.d.	17
	EJ P3	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	EJ P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	EJ P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P1	69	n.d.	n.d.	n.d.	50	n.d.	50
	CA P2	421	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P4	860	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P5	44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UR P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LU P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LU P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LU P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LU P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LU P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Localidad: EJ: Ejea de los Caballeros, CA: Candanos, UR: Urrea de Jalón, LU: Lucena de Jalón; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; ZEA: zearalenonas; FB: fumonisinas

n.d.: <LOD

**Anexo 6.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt con daño de taladro y Bt recogidas en Valle del Ebro en 2013.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>						
		DON	T-2	HT-2	ZEA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
Maíz no-Bt	AM P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	AM P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	AM P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	130	150	280
	AM P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.570	1.300	3.870
	AM P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	290	130	420
	CA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P2	n.d.	n.d.	n.d.	11	2.330	n.d.	2.330
	CA P3	64	n.d.	n.d.	12	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P4	97	n.d.	n.d.	13	11.840	2.440	14.280
	CA P5	n.d.	n.d.	n.d.	12	140	30	170
	RB P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.550	2.620	11.170
	RB P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28.290	11.720	40.010
	RB P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	910	200	1.110
	RB P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.520	2.010	8.530
	RB P5	n.d.	n.d.	n.d.	11	2.660	1.280	3.940
	TA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	330	140	470
	TA P2	494	n.d.	n.d.	223	280	170	450
	TA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	250	150	400
	TA P4	884	n.d.	n.d.	25	n.d.	n.d.	n.d.
TA P5	7	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.	
Maíz Bt	AM P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	120	n.d.	120
	AM P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	AM P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	AM P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	CA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20	n.d.	20
	CA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	RB P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.910	3.880	10.790
	RB P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	RB P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	RB P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	RL P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	170	140	310
	TA P1	n.d.	n.d.	n.d.	13	n.d.	n.d.	n.d.
	TA P2	58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	TA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	290	n.d.	290
TA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	340	n.d.	340	
TA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

<sup>a</sup> Localidad: AM: Almodévar, CA: Candasnos, RB: Ribaforada, TA: Tafalla; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; ZEA: zearalenonas; FB: fumonisinas

n.d.: <LOD

**Anexo 7.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt sin daño de taladro y Bt recogidas en Extremadura en 2011.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>								
		DON	T-2	HT-2	AF.	ZEA	OTA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
<b>Maíz no-Bt</b>	RL P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	RL P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	13	5
	RL P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	57	30	4
	DB P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DB P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DB P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DB P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DB P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MH P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18	5	2
	MH P2	59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MH P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	408	126	25
	MH P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11	2	13
	MH P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	2	16

<sup>a</sup> Localidad: RL: Riobos, DB: Don Benito, MA: Madrigalejo, MH: Moheda de Gata; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; AF.: total aflatoxinas (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>); ZEA: zearalenonas; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisinas  
n.d.: <LOD

**Anexo 8.** Concentración de micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las muestras de mazorcas de maíz no-Bt sin daño de taladro y Bt recogidas en Albacete en 2011.

Muestra <sup>a</sup>		Micotoxina <sup>b</sup>								
		DON	T-2	HT-2	AF.	ZEA	OTA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
Maíz no-Bt	MO P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	31
	MO P2	7.445	n.d.	n.d.	n.d.	517	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BA P3	168	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SA P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	31
	SA P2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SA P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SA P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34	17	51
	SA P5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	48	17	65

<sup>a</sup> Localidad: MO: Motilleja, BA: Barrax, SA: El Salobral; P: punto

<sup>b</sup> DON: deoxinivalenol; AF.: total aflatoxinas (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>); ZEA: zearalenonas; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisinas

n.d.: <LOD