UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

MONITOREO DEL FLUJO DE GENES DE ALGODÓN TRANSGÉNICO EN LA AGREMIACIÓN REMOLINO S.A. (ESPINAL – TOLIMA)

GENE FLOW MONITORING OF TRANSGENIC COTTON IN REMOLINO S.A. UNIONIZATION (ESPINAL-TOLIMA)

LEIDY YANIRA RACHE CARDENAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
BOGOTÁ, COLOMBIA
2011

MONITOREO DEL FLUJO DE GENES DE ALGODÓN TRANSGÉNICO EN LA AGREMIACIÓN REMOLINO S.A. (ESPINAL – TOLIMA)

LEIDY YANIRA RACHE CARDENAL

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Biología

Director:
Alejandro Chaparro Giraldo PhD.

Línea de Investigación:
Genética
Grupo Ingeniería Genética de Plantas (IGP)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
BOGOTÁ, COLOMBIA
2011

A mis padres, hermanos y sobrinos por su apoyo y comprensión.
A ti José Jobanny por ser mentor y promover mi formación a este nivel y por supuesto por tu valiosa y oportuna compañía y respaldo.

Leidy Yanira

Agradecimientos

Al Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial y a la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, por la financiación del proyecto.

A la Agremiación Remolino S.A. en especial al señor Edgar Alfonso Sanabria gerente de la agremiación y al Ingeniero Álvaro Plata por el apoyo para el muestreo y por facilitarnos la información de inscripción de agricultores año 2010.

A los técnicos de la Agremiación Remolino S.A., César Vásquez y Alfredo Cardozo Murillo por la asistencia en campo para colectar las muestras.

Al ICA por la información de inscripción de agricultores años 2007 a 2009.

A Alejandro Chaparro Giraldo PhD, por su apoyo en los estudios de maestría.

A Jennifer Blanco, Ivan Barbosa y Leidy Ávila, integrantes del grupo de investigación Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por su compañía y apoyo.

A los integrantes del grupo de investigación FPM.

A los jurados y demás personas que hicieron parte en el desarrollo de este proyecto.

Resumen

En el Tolima (Colombia) se sembraron 4088 hectáreas de algodón genéticamente modificado en el 2009. Con base en esta información y con el fin de fortalecer las medidas de bioseguridad que garanticen el uso seguro de los cultivos genéticamente modificados (CGM), se realizó un monitoreo del flujo de genes, con el objeto de detectar si existe flujo de transgenes vía semilla y polen desde variedades transgénicas hacia algodón convencional y/o individuos asilvestrados de algodón en la Agremiación Remolino S.A., en el municipio del Espinal (Tolima). El estudio se desarrolló en el primer semestre de 2010 y se muestrearon lotes cultivados con algodón convencional, zonas refugio de lotes cultivados con algodón transgénico e individuos de algodón asilvestrados. En cada lote se tomaron 9 puntos de muestreo, en donde se colectaron hojas y semillas de una planta individual. Para detectar el flujo de genes se utilizaron las técnicas de Inmunostrip^{TM}, PCR y Elisa. Se analizaron 56 refugios (14,3%) y 27 lotes cultivados con algodón convencional (62,8%). Se encontró evidencia de flujo de genes vía semilla en 26 lotes cultivados con algodón convencional (96%) y en 45 refugios (80,4%). Se evidenció flujo de genes vía polen en 1 lote cultivado con algodón convencional y en 9 refugios. En todos los lotes cultivados con algodón convencional se evidenció flujo de genes, solo en 2 refugios y en los individuos asilvestrados no se evidenció ningún tipo de flujo de genes.

Palabras Clave: Flujo de genes, Bioseguridad, Algodón transgénico, Algodón convencional.

Abstract

In 2009, 4088 hectares of GM cotton in Tolima (Colombia) were planted. Based on this information and to strengthen biosecurity measures to ensure the safe use of genetically modified crops (GMC), we performed gene flow monitoring with a view to detecting seed and pollen mediated transgene flow from transgenic cotton varieties to conventional cotton varieties and/or wild species of cotton in the Remolino S.A. unionization, in the municipality of Espinal (Tolima). The study was realized in the first half of 2010 and sampled fields with conventional cotton, refuge areas of fields with transgenic cotton and one feral species. In each field were taken 9 sampling points, leaves and seeds were collected from a single plant. To detect gene flow were used Inmunostrip^{TM}, PCR and ELISA techniques. 56 refuge (14.3%) and 27 fields with conventional cotton (62.8%) were analyzed. We found evidence of seed mediated gene flow in 26 fields with conventional cotton (96%) and in 45 refuges (80.4%). We were evidence of pollen mediated gene flow in 1 field with conventional cotton and 9 refuges. All fields cultivated with conventional cotton showed gene flow, only 2 refuges and feral species did not reveal any gene flow.

Key words: gene flow, biosecurity, transgenic cotton, conventional cotton.

CONTENIDO

	Pag.
Resumen	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de símbolos y abreviaturas	XIV
Lista de anexos	XV
Introducción	1
Capítulo 1	4
1.1 Marco teórico	4
1.2 Objetivo general	14
1.3 Objetivos específicos	14
1.4 Metodología	14
1.5 Resultados y discusión	23
2. Conclusiones y recomendaciones	48
2.1 Conclusiones	48
2.2 Recomendaciones	49
Anexos	51
Bibliografía	90

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Número de hectáreas sembradas de algodón GM en Colombia. Fuente: Agrobio (29). 10
Figura 2. Esquema zona de muestreo en lotes sembrados con algodón GM que expresan genes *Cry*. 16
Figura 3. Distribución puntos de muestreo. 17
Figura 4. Procedimiento para aplicar las pruebas Inmunostrip. 21
Figura 5. Individuos asilvestrados. Árboles de algodón muestreados. 28
Figura 6. Ubicación de los puntos de muestreo. 29
Figura 7. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas de variedades convencionales. 32
Figura 8. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas. 33
Figura 9. Resultados prueba inmunostrip. 36
Figura 10. Hojas de algodón inadecuadas para realizar extracción de DNA. 37
Figura 11. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de hojas. 39
Figura 12. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas utilizando primers para Figwort. 42
Figura 13. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas utilizando primers para *Cry1Ac.* 43
Figura 14. Resultados prueba ELISA. Identificación de las muestras en la placa de la prueba ELISA y cálculo de la concentración de la proteína *Cry1Ac.* 45

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Temperaturas de anillamiento ensayadas en el gradiente para PCR con diferentes primers. 19

Tabla 2. Variedades de algodón GM cultivadas en el municipio de el Espinal-Tolima, años 2007 - 2010 (Datos de inscripción de agricultores proporcionados por el ICA y la Agremiación Remolino S.A). 25

Tabla 3. Lotes convencionales y zonas refugio inscritas, muestreadas y analizadas. 28

Tabla 4. Cuantificación DNA extraído de hoja utilizando el protocolo propuesto por Phillips y colaboradores (63) y Murray y Thompson (64). 30

Tabla 5. Resultados pruebas Inmunostrip. 34

Tabla 6. Resultados PCR con DNA extraído de hojas. 38

Tabla 7. Resultados PCR con DNA extraído de semillas y resultados prueba ELISA. 44

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviaturas	Término
CGM	Cultivos genéticamente modificados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
GM	Genéticamente modificado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
OGM	Organismo genéticamente modificado
RR	Roundup ready
Bt	Bacillus thuringiensis
NO/RR	Nuopal/Roundup ready
DP90 nal	Deltapine 90 nacional
L	Lote
pb	Pares de bases
ha	Hectáreas
g	Gramos
µL	Microlitros
nm	Nanomoles
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ppm	Partes por millón

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Protocolo de extracción de DNA de hojas (63, 65). 51

Anexo 2. Protocolo extracción de DNA de semillas DNeasy Plant Maxi kit. 53

Anexo 3. Protocolo kit PathoScreen (DAS) ELISA para detectar *Cry1Ab-1Ac* en plantas. 54

Anexo 4. Tecnologías de algodón GM liberadas en Colombia, años 2003 -2010 (www.ica.gov.co) 56

Anexo 5. Variedades de algodón cultivadas en Colombia, años 1918-2010 (38, 37, 68, 31) 59

Anexo 6. Registros biológicos de parientes silvestres de algodón que se encuentran en el país (31, herbarios nacionales de la Universidad Nacional de Colombia, del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI, Base de datos del Jardín Botánico de Medellín y de la base de datos del Instituto Von Humboldt). 61

Anexo 7. Formato colecta de muestras en campo. 68

Anexo 8. Resultados pruebas inmunostrip para identificar la proteína *Cry1Ac*. 70

Anexo 9. Cuantificación DNA extraído de hoja. 78

Anexo 10. Cuantificación DNA extraído de semilla. 85

Anexo 11. Resultados PCR con DNA extraído de hojas. 86

Introducción

El algodón es el tercer cultivo genéticamente modificado mas abundante (1) y es un cultivo de autopolinización con baja proporción de cruzamiento, probablemente por esta razón se han realizado pocos estudios sobre flujo de genes vía polen o vía semillas (2). Esta última vía ha recibido menor atención (2, 3).

El flujo de genes vía polen desde parcelas cultivadas con algodón genéticamente modificado hacia algodón convencional tiene varios reportes (2, 4-12) y/o vía semillas (2, 11). Como causa principal se señala la presencia de insectos polinizadores, principalmente abejas, abejorros y en segundo lugar avispas, moscas, hibiscos y mariposas (6, 13).

Se han reportado otros factores que afectan e influyen en la proporción de polinización cruzada que pueda presentarse entre genotipos de algodón: cantidad de polinizadores, aumento o disminución en aplicaciones de insecticidas (5, 6, 14-15); viento (5); ubicación de los cultivos, condiciones ambientales, clima (4-6, 13, 16- 18); disminución de bosques y presencia de cultivos frutales cercanos (4).

La falta de control y de medidas de precaución para evitar el flujo de transgenes vía semilla o polen, podría dar origen a malezas nuevas y más resistentes (12), pérdida de biodiversidad (12, 16), riesgos en la seguridad alimentaria (12), efectos potenciales sobre la resistencia de los insectos, ya que el propósito de la zona refugio se perturba y se ven afectadas plagas mayores (19), producción de híbridos y por introgresión producción de nuevos genotipos que pueden incidir en la estabilidad a largo plazo de los ecosistemas naturales (6, 20-25).

También podría traer problemas legales, por perjuicios ocasionados a los agricultores de cultivos no GM (26), inconvenientes para exportar semillas de algodón a países donde las características biotecnológicas no han sido aprobadas

o no están reguladas (5). Además, podría amenazar los derechos de propiedad intelectual de las compañías biotecnológicas, las ventas de productos no transgénicos y las estrategias de manejo de resistencia de insectos y malezas (2, 11, 27-28).

No se han encontrado reportes de estudios sobre flujo de genes desde algodón transgénico hacia sus contrapartes no transgénicas y/o especies silvestres realizados en Colombia, aunque se ha cultivado algodón genéticamente modificado desde el año 2002 (2000 ha) y ha seguido aumentado el número de hectáreas cultivadas hasta 37.657 en 2010 (29). En Colombia, se ha cultivado algodón resistente a insectos lepidópteros, tolerante a herbicidas y variedades que contienen las dos características (29).

Fryxell y colaboradores (30) y Zhang y colaboradores (6) reportaron que el algodón tiene más de 40 especies con las cuales puede ser cruzado y han encontrado hibridación en algodón producido convencionalmente; mientras que, Garrido (31) reporta que el algodón tiene 20 parientes silvestres con los cuales puede ser cruzado, pero en Colombia solo se encuentran 3 de esas especies: *Gossypium arboreum, Gossypium barbadense y Gossypium herbaceum.* Se encontraron tres reportes sobre estudios de hibridación en algodón en Colombia. El primer estudio realizado en El Espinal-Tolima (32) reportó 1% de cruzamiento natural a 1 m de distancia y 0.03% a 2 m. El segundo estudio realizado en Codazzi-Cesar (33) reportaron 5% de cruzamiento natural y el último realizado en el Caribe Húmedo colombiano (34) reportaron 1.25% de hibridación natural.

El algodón transgénico puede constituir una amenaza real o potencial por sus posibles riesgos para la producción agropecuaria, la sostenibilidad de los agroecosistemas, la biodiversidad y la salud humana. Para limitar esos posibles riesgos, en Colombia se expidió la Ley 740 de 2002 ratificando el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad en la Biotecnología, que tiene por objeto garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y

utilización segura de los OGM que puedan tener efectos adversos para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica (35). Con base al objeto de esta ley, a la necesidad de avanzar en el monitoreo y seguimiento de los OGM con fines agrícolas liberados en el territorio nacional, y en la cualificación técnico científica en bioseguridad ambiental sobre OGM, se planteó realizar un monitoreo del flujo de genes aplicable a las tecnologías transgénicas de algodón en la Agremiación Remolino S.A. (Espinal-Tolima).

CAPÍTULO 1

1.1 Marco teórico

El algodón es importante principalmente por la producción de fibra natural que se emplea como materia prima por la industria textil, es uno de los productos de importancia económica, por el volumen y valor de la producción y de importancia social, debido al número de empleos que genera directa e indirectamente (31).

Además de la fibra, la semilla se utiliza para producción de aceite y ha sido catalogada como la segunda fuente de aceite vegetal en el mundo. La semilla contiene 15% de aceite comestible no saturado, que es utilizado para la cocina y la fabricación de jabones (36). El aceite de algodón es después del aceite de soya, junto con los aceites de la colza, de girasol y del maní de importancia para el consumo humano (36, 37).

Con la semilla, también se elaboran tortas, importantes por el alto contenido proteico (24%), que se destinan como alimento para animales y como fertilizante (38), y se produce harina rica en proteína de alta calidad apta para el consumo humano, a la que previamente se le elimina un pigmento conocido como gossypol, que es tóxico para los animales no rumiantes. Esta harina es utilizada en Centro América para la elaboración de una bebida rica en proteína conocida como Incaparina, que es suministrada a los niños para prevenir la desnutrición (36, 38).

El algodón es un arbusto anual o perenne, de hasta 1,5 – 2 m de alto y hasta 15 cm de grosor en el tallo, presenta tallos ramificados, con ramas vegetativas y reproductivas, tallos estrellado-pubescentes. Hojas alternas, las hojas jóvenes por lo general no presentan lóbulos, las hojas viejas presentan de 3 a 5 lóbulos, peciolos 0,5-1 veces el largo de la lámina (31).

Las flores son dialipétalas, grandes, solitarias y penduladas, el cáliz de la flor está protegido por tres brácteas y la corola está formada por un haz de estambres que rodean el pistilo. Es una planta autógama, aunque algunas flores abren antes de la fecundación, produciéndose semillas híbridas (31). La polinización cruzada solamente ocurre si el polen es liberado del estigma receptivo por un insecto (4) y se ve favorecida por la cantidad de insectos que visitan las flores de algodón, generalmente abejas (*Apis dorsata, A. florea, A. indica* y más frecuentemente *A. mellifera*), abejorros y otros heminópteros. En ausencia de polinizadores adecuados se presenta autopolinización (39), porque las flores abren muy temprano en la mañana y luego se presenta la dehiscencia de la antera y la receptividad del estigma (4). El porcentaje o índice de polinización está determinado por el número de insectos polinizadores y el número de flores presentes en la población (4, 39).

El polen es esférico de 81 a 143 micras, porado (8-12 poros), equinado y presenta una pared de endexina delgada, el mecanismo de dispersión del polen es posible solo a través de insectos ya que el polen es muy pesado y pegajoso para ser transportado por viento (4, 6, 9) y su viabilidad o dispersión disminuye rápidamente después de los 12 m. El polen en campo es viable por 4-8 horas (4, 40), después de 12 horas (31), o incluso hasta 24 horas (7). De cada flor se producen aproximadamente 45.000 granos de polen viables (31, 39).

El fruto es una cápsula ovoide o subglobosa, glabra. La fructificación se inicia después del cuarto al quinto mes de la germinación, sigue un curso espiral en la región basal desde la rama más vieja y más baja hasta la zona apical de la planta. Durante el desarrollo, las cápsulas son esféricas a ovoide y pálido verdosas. El tamaño máximo de la cápsula es conseguido aproximadamente 25 días después de la fertilización y la madurez completa se consigue 20 días más tarde. El fruto es dehiscente y expone a las semillas entre las fibras asociadas. Las semillas son de forma ovoide, testa finamente punteada, de color pardo oscuras (31, 39), cada fruto tiene entre 20-36 semillas (38).

El método de dispersión de la semilla de algodón es de tipo autócora, ya que tiene que ver con el derramamiento de la semilla en áreas de producción de algodón o por las rutas de transporte del cultivo. Además, teniendo en cuenta que la semilla es usada para la alimentación de ganado, tiene un alto potencial de dispersión en otros hábitats donde no se produce algodón, debido al derramamiento de los comederos para ganado. El fruto maduro puede ser dispersado por el ser humano un poco antes de llevarse a cabo la dehiscencia loculicida del fruto y por un proceso físico se dispersan las semillas (39).

El movimiento del material genético por el polen es posible sólo en aquellas plantas que tengan el tipo apropiado cromosómico, en este caso sólo a aquellos allotetraploides con genomas $AADD_1$ (39). Es decir, *G. hirsutum* que es una especie tetraploide (n=26) y presenta los juegos genómicos $AADD_1$, puede llegar a cruzarse con *G. arboreum* L. que posee un grupo genómico AA_2 y es una especie diploide (n=13), o puede cruzarse con *G. barbadense* L. que tiene un grupo genómico $AADD_2$ y es tetraploide (n=26), o con *G. herbaceum* L. cuyo grupo genómico es AA_1 y es una especie diploide (n=13).

Las especies de algodón fueron clasificadas por Hutchinson y colaboradores en 1947 (31) y en la actualidad se reconocen los seis grupos de genomas propuestos por Hutchinson y colaboradores y un genoma más de *Gossypium*; estos grupos son A, B, C, D, E, F y G y su clasificación se realizó de acuerdo con el tamaño de todos los cromosomas de la siguiente forma:

A: Cromosomas muy largos
B: Cromosomas largos (algunos mas largos que F)
C: Cromosomas largos (más largos que B)
D: Cromosomas largos (todos ligeramente mas largos que A)
E: Cromosomas moderadamente largos
F: Cromosomas moderadamente largos pero más pequeños que A
G: Cromosomas pequeños (31).

En el mundo se cultivan 4 especies de algodón: *Gossypium arboreum* y *Gossypium herbaceum* (originarias de Asia y África), *Gossypium barbadense* y *Gossypium hirsutum* (originarias de América). Estas especies pertenecen a la familia Malvaceae y se clasifican según las propiedades de su fibra en:

- Algodones de la especie *G. hirsutum*: producen fibra de textura media, más larga y fina utilizada en la elaboración de hilo de calibre inferior a 40; y fibra de textura gruesa y corta utilizada en la elaboración de hilo grueso (36, 38).
- Algodones de la especie *G. barbadense*: producen fibra larga y se emplean en la fabricación de hilos para manufactura de tejidos de alta calidad (36, 38).
- Algodones de la especie *G. arboreum* y *G. herbaceum*: producen fibra corta y gruesa utilizada para la elaboración de tejidos pesados, muselina, relleno de muebles y algodón quirúrgico (36, 38).

En Colombia cerca del 90% del algodón producido con fines comerciales proviene de la especie *G. hirsutum,* el 8% proviene de la especie *G. barbadense* (36, 38) y el 2% restante proviene de las especies *G. arboreum* y *G. herbaceum* que se encuentran en estado silvestre (31). La distribución geográfica de estas especies cubre aproximadamente 25 departamentos o 78% del territorio nacional (31) y se cultiva algodón en dos temporadas:

- Temporada Costa-Meta: Se cultivan variedades de fibra media y la siembra se realiza en los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, Guajira, Magdalena, Sucre, Casanare, Meta, Guaviare y Vichada a mitad de cada año y la producción se recolecta entre diciembre y marzo (36).

- Temporada del interior: Se cultivan las variedades de fibra larga, extralarga y de fibra media y la siembra se realiza en los departamentos de Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca a comienzos del año y la producción se recolecta entre julio y octubre de cada año (36).

La siembra es de tipo directa, se aplica 30-40 kg/Ha de semilla y se obtienen 150 a 175 mil plantas por hectárea, posteriormente se realiza aclareo y selección de las plantas vigorosas, dejando una población óptima de más o menos 55 mil plantas por hectárea, con las que se consiguen los mejores rendimientos y la mejor calidad de la fibra (31).

Durante varias décadas Colombia fue un productor y exportador importante de fibra de algodón, gracias a las ventajas de suelos y clima, y a las altas cotizaciones internacionales que se registraron hasta principios de la década de los 90 del siglo XX. Sin embargo, a partir de 1993, progresivamente fue perdiendo esta característica hasta convertirse en un importador neto de fibra (41). Esto fue debido a las bajas cotizaciones internacionales, a la reducción de los aranceles para la importación de estos bienes (36, 42), baja inversión en nuevas tecnologías y en materiales más resistentes a las enfermedades, altos costos de los agroquímicos, escasez en adecuación de tierras y sistemas de riego, entre otros (36). Entre el 2005 y el 2006, alrededor del 50% del consumo de la industria era de origen extranjero proveniente en su mayoría de los Estados Unidos (36, 42).

La tecnología transgénica se presentó como una opción para evitar algunos de estos problemas, desde 1996 se autorizó la liberación comercial de algodones transgénicos en Estados Unidos (43). Este cultivo se convirtió en uno de los primeros genéticamente modificados que fue comercializado (6), llegando en el 2010 a 21 millones de hectáreas, el 49% del total cultivado en el mundo (44).

Se cultivan comercialmente algodones transgénicos con resistencia a insectos lepidópteros, tales como, gusanos del complejo bellotero (*Heliotis virescens Fabricius*, *Helicoverpa zea Boddie, Spodoptera* sp.), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda),* gusanos rosados (*Pectinophora gossypiella Saunders* y *Sacadodes pyralis Dyar*) (45; 46), gusano de la hoja del algodonero (*Alabama argillacea* Hubner), falso medidor (*Trichoplusia ni*), perforador de la hoja (*Bucculatrix* sp.), gusano soldado (*Spodoptera exigua*, *Spodoptera ornithogalli)* y gusano defoliador

de la hoja (*Pseudoplusia includens*) (47, 48). También se cultivan algodones con tolerancia a herbicidas y materiales que contienen las dos características (29). Los países que lo han cultivado comercialmente son: Estados Unidos, Brasil, Argentina, India, China, Sur África, Australia, Burkina Faso, México, Colombia y Costa Rica (44; 49).

En Colombia en el año 2002 se cultivaron 2000 ha con semillas de algodón genéticamente modificado, hasta el 2010 fue aumentando el área de cultivo llegando a 37.657 ha (29, figura 1). Se cultiva algodón GM en Córdoba (10186 ha), Tolima con 4088 ha (21.66% del área algodonera en el 2009), Huila con 801 ha y Cesar con 3799 ha (49). Se han liberado para siembra comercial las siguientes tecnologías de algodón:

- Bollgard (resistente a insectos lepidópteros, contiene el gen *Cry1Ac*,), cultivada comercialmente desde el año 2003 en las regiones: Caribe húmedo y seco colombiano, Tolima, Huila y Valle del Cauca y en el 2007 en la Orinoquía.

- Roundup Ready (tolerante al herbicida Roundup Ready, contiene el gen CP4 EPSPS), autorizada para siembras comerciales desde el año 2004 en el Caribe húmero y seco colombiano y en el 2007 en el Alto Magdalena y Valle del Cauca.

- Bollgard II/ Roundup Ready Flex (resistente a insectos lepidópteros y tolerante al herbicida Roundup Ready, contiene los genes *Cry1Ac*, *Cry2Ab* y CP4 EPSPS), autorizada para siembras comerciales desde el año 2007 y 2008 en el Caribe húmedo y seco, Valle geográfico del río Cauca, Alto Magdalena y Orinoquía.

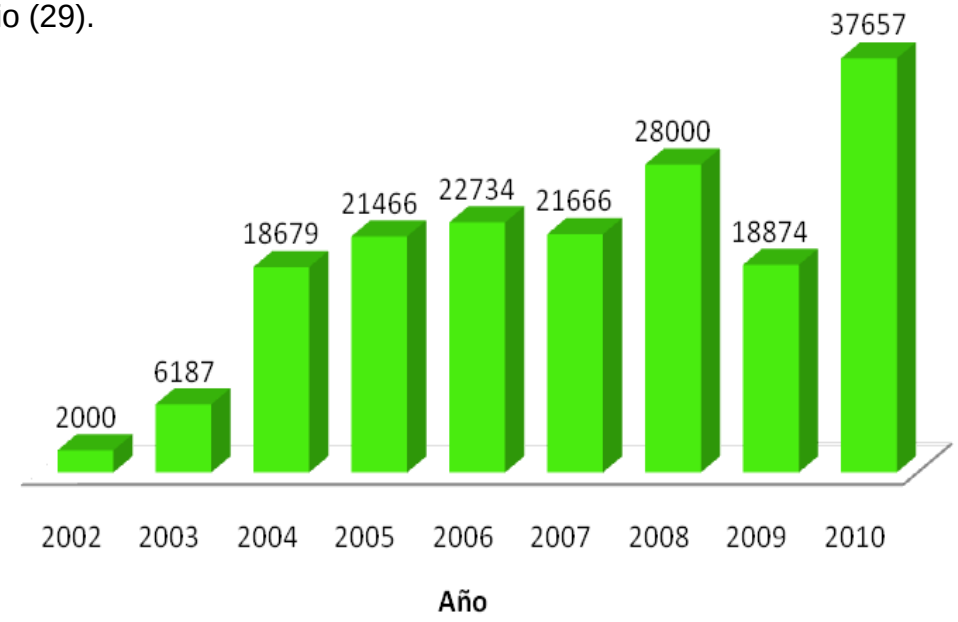
- Bollgard/Roundup Ready (resistente a insectos lepidópteros y tolerante al herbicida Roundup Ready, contiene los genes *Cry1Ac* y CP4 EPSPS), autorizada para siembras comerciales desde el año 2007 en el Alto Magdalena, Valle del Cauca, Caribe húmedo y seco y Orinoquía colombiana.

- Ll cotton (tolerante al herbicida glufosinato de amonio, contiene el gen PAT), autorizada para siembras comerciales desde el año 2010 en el Caribe húmedo.

- Roundup Ready Flex (tolerante al herbicida Roundup Ready, contiene dos genes CP4 EPSPS), autorizada para siembras comerciales desde el año 2010 en el Caribe Seco y Húmedo, Orinoquía, Valle Geográfico del río Cauca y Valle Geográfico del río Magdalena.

Respecto a estudios sobre flujo de genes en algodón, se ha realizado relativamente poca investigación, a pesar de ser el tercer cultivo genéticamente modificado más abundante (1, 2). Probablemente, esto se debe al tipo de reproducción del algodón porque se considera un cultivo de autopolinización con baja proporción de cruzamiento (2).

Figura 1. Número de hectáreas sembradas de algodón GM en Colombia. Fuente: Agrobio (29).



Sin embargo, se ha reportado que el flujo de transgenes en algodón puede ocurrir vía flujo de genes mediado por polen o flujo de genes mediado por semillas (2, 11); esta última vía, ha recibido menor atención (2, 3). Por tanto, se han encontrado varios estudios enfocados al flujo de genes mediado por polen (2)

sobre todo en la polinización cruzada desde cultivares transgénicos de *G. hirsutum* Bt (*Baccillus thuringiensis*) hacia *G. hirsutum* no Bt (2, 4, 6, 8-9) y desde *G. hirsutum* Bt hacia *G. barbadense* (8). Además, se han establecido modelos que exploran de forma simultánea el papel de los vectores y el espacio en campo en la proporción de flujo de genes mediado por polen y la aparición de plantas adventicias (2). Se han desarrollado diversos estudios estadísticos para describir la disminución del flujo de transgenes al aumentar la distancia desde la fuente de plantas transgénicas (2, 50-52).

Algunos estudios reportan que el algodón tiene más de 40 especies con las cuales puede ser cruzado y se ha encontrado hibridación en algodón producido convencionalmente (6, 30). Sin embargo, Garrido (31) reporta que el algodón tiene 20 parientes silvestres con los cuales puede ser cruzado, pero en Colombia solo se encuentran 3 de esas especies: *G. arboreum, G. barbadense y G. herbaceum.* Gómez (32) reportó en El Espinal-Tolima, 1% de cruzamiento natural a un metro de distancia y una disminución drástica del porcentaje a medida que se alejaban las flores, a 2 metros el porcentaje fue 30 veces menor. Mendoza y Aramendis (33) estudiaron el cruzamiento natural durante tres años seguidos en Codazzi-Cesar, con el fin de conocer las distancias de aislamiento intervarietal, reportaron valores inferiores a 5% y recomendaron una distancia de 20 metros para separar variedades con fines de multiplicación de semilla en las primeras generaciones de aumento. Díaz y Montenegro (34) evaluaron el impacto del flujo de polen del algodonero (*G. hirsutum* L.) en su variedad homóloga, los resultados de este estudio indicaron 1.25% de hibridación natural.

La probabilidad de que ocurra flujo de transgenes desde cultivos genéticamente modificados a otras variedades o a sus parientes silvestres y/o a malezas asociadas, es uno de los principales riesgos derivados de la liberación comercial de plantas transgénicas en el ambiente (6, 12).

El flujo de genes sin restricciones podría, por introgresión dar lugar a nuevos genotipos de malezas y silvestres que pueden incidir en la estabilidad a largo plazo de los ecosistemas naturales (6, 20-25).

Entre los reportes que se han encontrado sobre estudios de dispersión de polen de algodón transgénico, se encuentra el desarrollado por científicos americanos y australianos (6, 9-10, 12). Estos autores reportaron que la proporción de flujo de transgenes mediado por polen en algodón raramente excedió 1% a una distancia de 10 metros en el campo. Además, establecieron que la proporción de transmisión del polen se relacionaba inversamente con la distancia de las plantas transgénicas hacia las plantas no transgénicas.

Encontraron que el flujo de genes era dependiente del ambiente y que podría ser especie específico con respecto al genotipo, localización y época del año (6, 12, 18). Plantearon la necesidad de realizar el estudio de flujo de genes en diferentes ambientes y países. Consideraron que también era importante estudiar diferentes tipos de plantas transgénicas, especialmente cultivos transgénicos comerciales, bajo diferentes condiciones medioambientales (6).

Shen y colaboradores estudiaron el flujo de genes desde *G. hirsutum* transgénico (Bt) hacia *G. hirsutum* no transgénico y desde *G. hirsutum* Bt hacia *G. barbadense*. Colectaron semillas de algodón no transgénico a diferentes distancias de una parcela cultivada con algodón transgénico y las analizaron mediante Elisa y PCR. Encontraron flujo de genes hasta 36 m entre cultivares de la misma especie (*G. hirsutum*), cuantificando el mayor flujo entre 0-6 m (1.85-11.05%). Y encontraron flujo de genes hasta 72 m entre especies de *G. hirsutum* y *G. barbadense*, cuantificando 1.42-8.67% entre 0-6 m. Los autores proponen que un mínimo de 72 m de zona buffer podría servir para limitar el flujo de genes desde algodón transgénico en ensayos a pequeña escala (8).

En California, Van Deynze y colaboradores (5) realizaron un estudio de flujo de genes mediado por polen, ellos escogieron dos regiones: una con alta presencia de polinizadores y otra con baja presencia de polinizadores, en cada región identificaron una parcela cultivada con algodón tolerante a herbicida y tomaron muestras en 4 direcciones. Además, muestrearon campos cultivados con variedades convencionales a diferentes distancias y campos cultivados con variedades tolerantes a herbicidas. Colectaron cápsulas de las que extrajeron las semillas, las cultivaron en invernadero, una vez obtenidas las plántulas midieron la tolerancia de estas al herbicida Roundup Ultra, de las plantas que sobrevivieron a este ensayo, tomaron hojas, extrajeron DNA utilizando el Kit DNeasy de Qiagen y realizaron PCR para identificar la presencia del transgen.

En el estudio, encontraron que el flujo de genes era independiente de la ubicación de la parcela de algodón GM, cuando la población de polinizadores era alta disminuía el flujo de genes exponencialmente con el incremento de la distancia de 7.65% en 0.3 m a 1% en 9 m de distancia. Cuando la población de polinizadores era baja, el flujo de genes mediado por polen era menor a 1% en 1 m de distancia. Además, encontraron ocurrencia esporádica, 0.04%, de flujo de genes a 1625 m en cultivares convencionales en campo.

En Australia, Llewellyn y colaboradores (4), encontraron que el flujo de genes desde parcelas de algodón GM hacia algodón convencional adyacente era mucho más alto en el norte que en el este de Australia, probablemente debido al alto número de abejas presentes en los alrededores. Además, establecieron que en general las zonas buffers de 20 m con algodón convencional alrededor de las parcelas de algodón GM son efectivas para contener el flujo de genes, a menos que el número de abejas aumente.

Heuberger y colaboradores (2) investigaron el flujo de genes mediado por semillas y el flujo de genes mediado por polen en campos cultivados con algodón Bt. Realizaron un monitoreo en 15 campos de producción de semillas de algodón no

Bt, para flujo de genes de algodón Bt y realizaron un análisis estadístico explicito para cuantificar los efectos de la presencia de campos cultivados con algodón Bt ubicados cerca a campos con algodón no Bt en varias escalas espaciales, incluyendo efectos de la abundancia de polinizadores y presencia de plantas adventicias en los campos, sobre el flujo de genes mediado por polen. Encontraron una baja proporción de flujo de genes mediado por polen, asociada con la abundancia de abejas y una alta proporción de flujo de genes mediado por semillas debida a mezcla de semillas y siembra de estas por error.

1.2 Objetivo general

Realizar un monitoreo del flujo de genes de algodón transgénico en la Agremiación Remolino S.A. (Espinal-Tolima).

1.3 Objetivos específicos

Identificar las tecnologías de algodón genéticamente modificado liberadas en el municipio del Espinal-Tolima y las variedades convencionales y silvestres relacionadas a los cultivos de algodón GM.

Establecer una estrategia de muestreo en campo.

Realizar la detección de genes y proteínas transgénicas en el material recolectado.

1.4 Metodología

El proyecto se desarrolló con la financiación y dentro del marco del convenio interadministrativo de asociación No. 10 suscrito entre el Ministerio de Ambiente,

Vivienda y Desarrollo Territorial y la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, año 2010.

Identificación de las tecnologías de algodón genéticamente modificado liberadas en el municipio de Espinal-Tolima y las variedades convencionales y silvestres relacionadas a los cultivos de algodón GM. Se revisaron las resoluciones del ICA relacionadas con liberación de algodón GM en Colombia y se registró la siguiente información: nombre de la tecnología, transgenes, característica, situación actual, región de liberación, número y año de resolución y compañía que desarrolló la tecnología. Posteriormente, se revisó la información de los formatos de inscripción de los agricultores de algodón de la cosecha del interior años 2007, 2008, 2009 y 2010 proporcionada por el ICA y la agremiación Remolino S.A. del municipio del Espinal-Tolima; se tomaron los datos de: año de siembra y variedad/tecnología cultivada. Se complementó la información consignando evento, promotor, gen y terminador. Esta información se utilizó para diseñar los primers y para seleccionar la prueba Inmunostrip^{TM} y ELISA a utilizar en los análisis de laboratorio.

La identificación de variedades convencionales y/o individuos asilvestrados relacionadas con algodón GM, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Benavides y colaboradores (53); se hizo una búsqueda de variedades convencionales y de registros biológicos vía electrónica en bases de datos de herbarios nacionales, se revisaron artículos científicos, libros, informes y memorias relacionados con el cultivo de algodón en Colombia. Con la información sobre especies silvestres, se hizo un listado de registros biológicos que incluye: género, epíteto específico, departamento, municipio, localidad, latitud y longitud. Con la información obtenida sobre variedades convencionales se realizó un listado que contiene: nombre de la variedad, primer y último año de siembra.

Establecimiento de la estrategia de muestreo en campo. Se realizó una visita de campo y se identificaron las siguientes zonas de muestreo:

- Lotes sembrados con algodón GM que expresan genes Bt. En este caso, el muestreo se realizó en la zona refugio (figura 2).

Figura 2. Esquema zona de muestreo en lotes sembrados con algodón GM que expresan genes *Cry*.

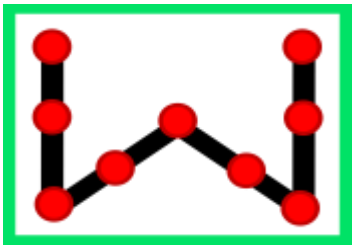
- Lotes sembrados con variedades convencionales de algodón. Se tomaron muestras en lotes cultivados con variedades convencionales.

- Zona con presencia de individuos asilvestrados de algodón. Se tomaron muestras de los árboles que se ubicaron en la zona.

Colecta de las muestras en campo. Las muestras fueron manejadas siguiendo una cadena de custodia. El muestreo se realizó en el primer semestre del año 2010, desde el 7 hasta el 24 de julio y se hizo teniendo como base la información de inscripción de agricultores proporcionada por la agremiación Remolino S.A y con la asistencia de los técnicos de campo de la Agremiación.

Se tomó como modelo para el muestreo la metodología propuesta en el estudio de Ortiz y colaboradores (54). En el caso de zonas refugio y lotes sembrados con variedades convencionales, el muestreo se realizó tomando 9 puntos al azar, siguiendo una distribución de ellos en forma de W (figura 3), en cada punto se seleccionó una planta y se colectaron 4 hojas y 5 cápsulas abiertas o en proceso de apertura.

Figura 3. Distribución puntos de muestreo.



Las muestras de hoja se guardaron en bolsas plásticas resellables y las cápsulas se guardaron en bolsas de papel, previamente rotuladas y con su respectiva documentación, con el fin de impedir contaminación cruzada entre lotes de muestreo. En cada sitio de muestreo se registró en un formato la siguiente información: Número del lote, fecha de colecta, vereda, finca, propietario, georeferenciación, número de hectáreas, tipo de cultivo y responsable de la colecta, siguiendo las recomendaciones sugeridas por Maldonado y colaboradores (55).

Además, se registraron los datos de fecha de siembra, fecha de germinación, se tuvo en cuenta el cálculo de la distancia con respecto al cultivo GM más cercano e información de la historia de siembra del lote.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio de biología molecular, las hojas se almacenaron en freezer a -20 hasta su utilización y las semillas se mantuvieron a temperatura ambiente.

Detección de genes y proteínas transgénicas en el material recolectado.

Análisis de las muestras en laboratorio. Los procedimientos de análisis de muestras se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular, ubicado en el departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

El trabajo de laboratorio se dividió en dos fases, en la primera fase se realizó el análisis de los parentales y en la segunda fase el análisis de la progenie.

Previamente se realizó la validación de las técnicas de extracción de DNA y PCR. Para esto se ensayaron 8 protocolos de extracción de DNA de hoja: el de Bushra y colaboradores (56); Permingeat y colaboradores (57), Zhang y Stewart (58); Katterman y Shattuck (59); Gómez (60), Guillermant y Laurence (61), CIP modificado (62); Phillips y colaboradores (63) y Murray y Thompson (64). Finalmente se trabajó con un protocolo combinado: Se utilizó parte del protocolo de Phillips y colaboradores (63) y se complementó con el protocolo de limpieza propuesto por Falcón y Valera (65) (anexo 1). La cuantificación de DNA se realizó utilizando un Nanodrop 2000 Thermo Scientific.

Se establecieron las condiciones para PCR realizando un gradiente con diferentes temperaturas de anillamiento para cada uno de los primers (tabla 1) y con base en los resultados se realizó PCR con cada una de las muestras, utilizando los primers reportados por Randhawa y colaboradores (66) para amplificar el transgen *Cry1Ac* (S: GACCGCTTACAAGGAGGGATACG, y A: ACGGAGGCATAGTCAGCAGGACC), primers diseñados en este estudio usando el software Primer 3 en línea, para amplificar la secuencia promotora del virus del mosaico de Figwort (S: GTCCAAAGCCTCAACAAGGT, A:TCTTTTGTGGTCGTCACTGC) y primers reportados por Seong y colaboradores (67) para amplificar el gen endógeno FsACP de algodón (S: CAAACAAGAGACCGTGGATAAGGTA y A: CAAGAGAATCAGCTCCAAGATCAAG. Los primers utilizados fueron sintetizados por Invitrogen.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador My Cycler® de BioRad, en un volumen final de 25 µL conteniendo buffer de reacción 1x: 8,875 µL de agua libre de nucleasas, 2,5 µL de *Taq* buffer 10X, 2,5 µL de dNTPs (2mM c/u), 2 µL de cada primer (0,8 µM), 2 µL de $MgCl_2$ (2mM) y 0,125 µL de *Taq* DNA

polimerasa (kit Fermentas de QIAGEN). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo denaturación inicial a 95ºC durante 3 minutos, 35 ciclos que comprendieron: denaturación a 95ºC durante 30 segundos, anillamiento a las temperaturas indicadas en la tabla 1, durante 30 segundos, extensión a 72ºC durante 45 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72ºC durante 5 minutos.

Tabla 1. Temperaturas de anillamiento ensayadas en el gradiente para PCR con diferentes primers.

	Primers		
	Cry1Ac	Figwort	FsACP
Temperaturas (ºC)	70	61,0	64,4
	69,6	60,4	62,3
	68,7	59,4	
	67,3		
	65,6		
	64,4		
	63,6		
	63,0		

Como control positivo de PCR se utilizó DNA extraído de semillas de la variedad NO/RR (Nuopal/Roundup Ready) y como control negativo DNA extraído de semillas de los individuos asilvestrados de algodón.

Se realizó extracción de DNA de semillas de las variedades convencionales DP 90 Nal, Corpoica M123, M129 y M137 y de semillas de los individuos asilvestrados, con el fin de utilizarlo como control negativo en las reacciones de PCR. Para estandarizar el nivel de detección del kit de PCR y el tamaño de muestra a utilizar en la fase de análisis de la progenie, se realizaron las siguientes extracciones.

1. 100 semillas de algodón no transgénico con 1 semilla de algodón transgénico evento NO/RR.
2. 200 semillas de algodón no transgénico con 1 semilla de algodón transgénico evento NO/RR.

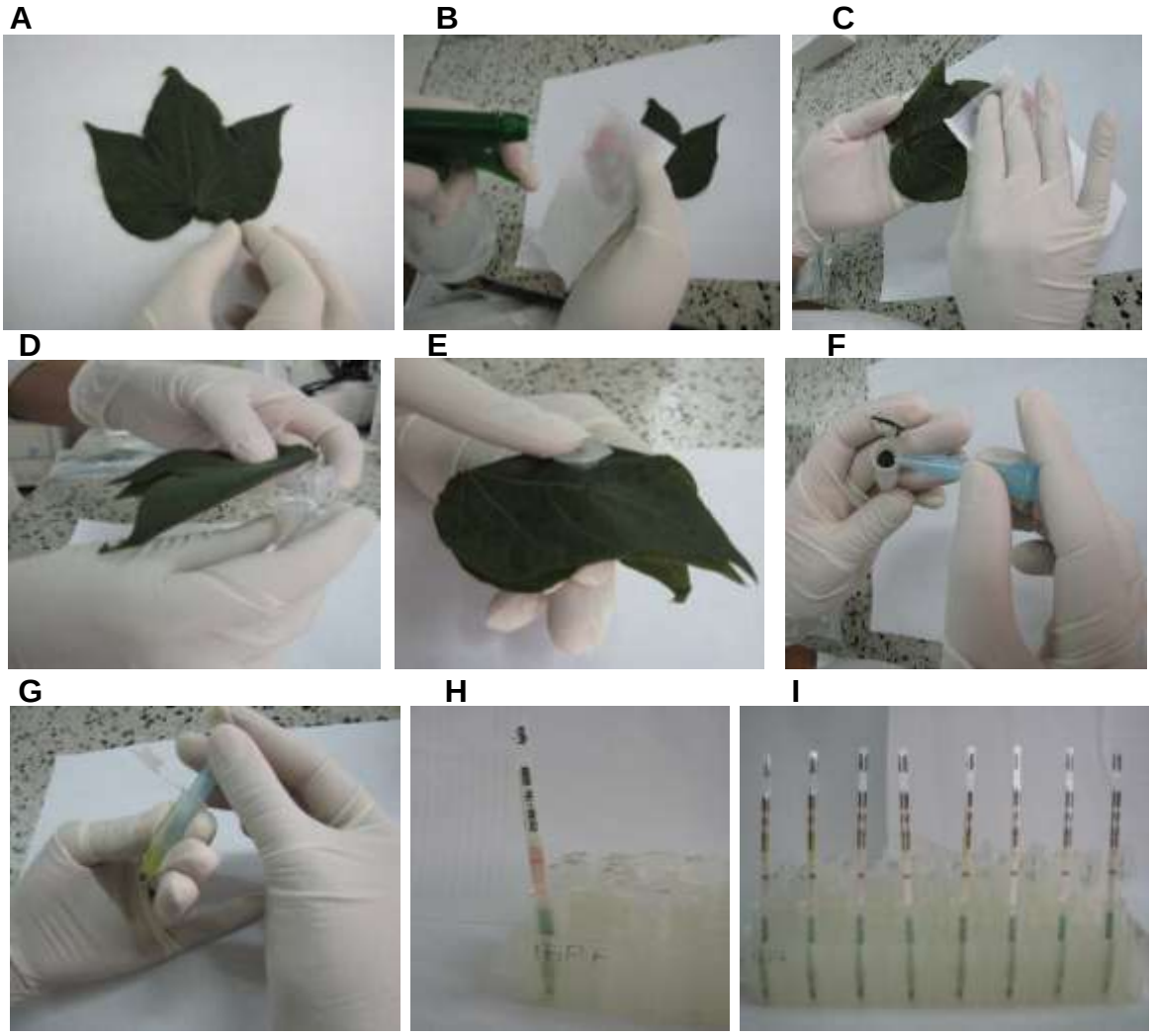
3. 300 semillas de algodón no transgénico con 1 semilla de algodón transgénico evento NO/RR.

Cada muestra se maceró en licuadora, se tomaron 0.5 g del polvo que se obtuvo, se hizo extracción de DNA utilizando el kit DNeasy Plant maxi de Qiagen (anexo 2) y se realizó PCR.

Análisis de los parentales femeninos. Esta fase se hizo con el fin de identificar si existe flujo de genes vía semilla y para garantizar que las semillas con las que se va a probar si hay procesos de hibridación no provienen de plantas transgénicas. Todas las plantas adultas colectadas en campo se consideraron parentales femeninos. Se trabajó con las hojas colectadas, se realizó Inmunostrip^{TM}, extracción de DNA y PCR.

Sobre las hojas colectadas de cada una de las plantas, se aplicó una prueba Inmunostrip^{TM} (Catálogo No. STX 06200 Agdia) para detectar la proteína *Cry1Ac.* En el procedimiento se utilizaron tubos eppendorf de 1,5 ml y puntas azules (100-1000 µL) despuntadas, previamente esterilizadas. El procedimiento consistió en: Se prepararon 100 ml de buffer SEB4, siguiendo las instrucciones de uso de la prueba Inmunostrip^{TM}, en cada tubo eppendorf se adicionaron 500 µl de buffer, los tubos fueron previamente marcados con el número de muestra, se tomó una muestra (hoja de algodón), se limpió con una toalla absorbente humedecida con alcohol al 70%, se secó, se dobló y se colocó entre la tapa del tubo eppendorf para obtener 2 círculos, que posteriormente fueron macerados. La maceración se realizó hasta que el buffer se tornó color verde claro, luego se colocó una tirilla reactiva o inmunostrip y se esperó aproximadamente 10 minutos hasta que el buffer migró por la tirilla y se marcaron las bandas correspondientes para hacer la lectura del resultado (figura 4). El mismo procedimiento se realizó con todas las muestras de hoja.

Figura 4. Procedimiento para aplicar las pruebas Inmunostrip. A. Tomar una hoja, B. Humedecer una toalla absorbente con alcohol al 70%. C. Limpiar la hoja y secarla con otra toalla absorbente. D. Doblar la hoja y colocarla entre el tubo y la tapa. E. Tapar el tubo para obtener dos círculos. F. Macerar la muestra. G. Cambio de color del buffer a verde claro. H. Colocar la tirilla en el macerado. I. Hacer la lectura del resultado.



Los lotes que tuvieron al menos 1 muestra positiva para la proteína *Cry1Ac* utilizando la prueba inmunostrip, fueron descartados para el análisis con PCR; a su vez los lotes que tuvieron al menos 1 muestra positiva para la presencia del transgen *Cry1Ac* realizando PCR, se descartaron para el análisis de la progenie

porque se consideró que la zona muestreada estaba contaminada y además esta contaminación aumentaba la probabilidad de encontrar híbridos.

La extracción de DNA de hoja y PCR, se realizó utilizando las hojas de los lotes cuyas 9 muestras fueron negativas con la prueba Inmunostrip^{TM}, esto se hizo con el fin de identificar falsos negativos obtenidos con esta prueba, e identificar otros eventos que han sido liberados.

La extracción de DNA se realizó utilizando el protocolo de Phillips y colaboradores (63) combinado con el protocolo de limpieza propuesto por Falcón y Valera (65) y la PCR se realizó según lo descrito en la validación de esta técnica.

La obtención de resultados positivos con inmunostrip y PCR, significó flujo de transgenes vía semilla, por tanto el estudio del flujo de transgenes vía polen mediante el análisis de la progenie, se realizó con las semillas de los lotes cuyas plantas madres dieron negativo para Inmunostrip^{TM} y PCR.

Análisis de la progenie. Esta fase se realizó con el fin de detectar flujo de transgenes vía polen e identificar procesos de hibridación. Todas las semillas en los frutos colectados fueron consideradas la generación progenie. Se reunieron las cápsulas de cada lote correspondientes a las plantas que fueron negativas en los análisis anteriores, se extrajeron las semillas eliminando la mota manualmente y se mezclaron las semillas de un mismo lote. Se tomaron al azar 300 semillas y utilizando una licuadora se obtuvo un polvo fino y una mezcla homogénea de las semillas, de la cual, se tomaron dos muestras de 0.5 g para hacer extracción por duplicado utilizando el kit DNeasy Plant maxi de Qiagen. Se evaluó la presencia de los transgenes *Cry1Ac* y el promotor del virus del mosaico de Figwort mediante PCR y como control positivo se utilizaron los primers del gen endógeno FsACP.

Todas las extracciones y PCR se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y electroforesis en gel de agarosa al 1,5 y 2%.

Finalmente, para detectar la traducción del transgen *Cry1Ac*, se realizó la prueba ELISA utilizando el kit DAS ELISA de Agdia para detectar las proteínas *Cry1Ab/Ac* (catálogo número: PSP06200, anexo 3) para las muestras que resultaron positivas en la PCR y para las muestras de semillas de las variedades convencionales DP 90 Nal, Corpoica M123, M129 y M137. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra. La lectura se midió usando un lector de placas Elisa a 655 nm. La proteína *Cry1Ac* se cuantificó utilizando el kit Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific).

Condiciones de esterilización. Los tubos eppendorf y las puntas fueron esterilizados durante 20 minutos a 121ºC y 15 PSI de presión. Los tubos para PCR fueron esterilizados con luz UV y las PCR fueron realizadas en cámara de flujo laminar; los elementos utilizados para PCR fueron esterilizados previamente con luz UV durante 40 minutos. Los vasos de licuadora fueron lavados y sumergidos durante 30 minutos en hipoclorito de sodio al 4,5%, antes de su utilización.

1.5 Resultados y discusión

Identificación de las tecnologías de algodón genéticamente modificado liberadas en el municipio del Espinal-Tolima y las variedades convencionales y silvestres relacionadas a los cultivos de algodón GM. Se revisaron 35 resoluciones que se encontraban publicadas en la página del ICA 2010 y se utilizó la información de 27 resoluciones para elaborar el anexo 4, que resume el histórico de las tecnologías que se han liberado y cultivado en Colombia desde el año 2003 hasta el 2010. En Colombia se ha autorizado la siembra comercial de algodón genéticamente modificado desde el año 2003, para este año se autorizó la siembra de algodón Bollgard; para el 2004, se autorizó la siembra de algodón Roundup Ready; para el 2007, Bollgard x Roundup Ready y Bollgard II x Roundup Ready Flex y para el 2010, Roundup Ready Flex (anexo 4).

En el municipio del Espinal-Tolima, año 2010, se cultivaron las variedades: DP 141B2F, DP 455 BG/RR; FM 9063 B2F, FM 9162 B2F, FM 9171 B2F, FM 9180 B2F y Nuopal RR, que corresponden a las tecnologías Bollgard II x Roundup Ready Flex y Bollgard x Roundup Ready (tabla 2).

Al analizar la tabla 2, se encontró un evento que no puede ser identificado utilizando los primers para *Cry1Ac*; por tanto, además de los primers para amplificar este gen, también se diseñaron primers para amplificar la secuencia del promotor 35S del virus del mosaico de Figwort. Como control interno, se utilizaron primers para amplificar la secuencia del gen acyl que expresa la proteína de transporte *FsACP*, específica de la fibra y que ya ha sido utilizado como gen de referencia del algodón. Las pruebas Inmunostrip y ELISA se eligieron para identificar la proteína *Cry1Ac*, ya que todos los eventos que se encontraban cultivados durante el muestreo tenían este gen.

Respecto a variedades convencionales y parientes silvestres relacionadas a los cultivos GM, se encontraron en la base de datos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, registros de variedades convencionales y silvestres relacionadas con algodón GM, colectados en Colombia y en el departamento del Tolima.

De variedades de algodón cultivadas en Colombia se encontraron reportes desde 1918 (anexo 5). Desde este año y hasta el 2010, se han cultivado aproximadamente 124 variedades de algodón (31, 37-38, 68), producidas por instituciones como: el ICA de la Universidad de Nuevo México; Malm, Norman R. & Barnes, Carl E; Agrogenética Colombiana Ltda; J.G. Boswel Co; Corpoica; Coker´s Pedigreed Co; Agroexportables Ltda; Delta and Pine Land Co; ICA Colombia; Hazera Seed Co; Helena Chemical Co; Seed Soource Incorporation Stoneville; Stoneville Pedigreed Seed y Cooker Seed Co (31).

Tabla 2. Variedades de algodón GM cultivadas en el municipio del Espinal-Tolima, años 2007 - 2010 (Datos de inscripción de agricultores, proporcionados por el ICA y la Agremiación Remolino S.A).

AÑO SIEMBRA	VARIEDAD/ TECNOLOGÍA	EVENTO	PROMOTOR	GEN	TERMINADOR
2007	Nuopal/ Bollgard	MON 531	CaMV35S	*Cry1Ac*	3` poly (A)
2008	Nuopal/ Bollgard	MON 531	CaMV35S	*Cry1Ac*	3` poly (A)
	Delta Opal RR/ Roundup Ready®	MON 1445	Figwort35S	*CP4EPSPS*	T - E9
	DP 455 BG/RR/ Bollgard/ Roundup Ready®	MON 531 x MON1445	CaMV35S / Figwort35S	*Cry1Ac / CP4EPSPS*	3` poly (A) / T - E9
2009	Nuopal/ Bollgard	MON 531	CaMV35S	*Cry1Ac / Cry2Ab*	3` poly (A) / Nos
	DP 455 BG/RR/ Bollgard/ Roundup Ready®	MON 531 x MON 1445	CaMV35S / Figwort35S	*Cry1Ac / CP4EPSPS*	3` poly (A) / T - E9
	FM9063 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	CaMV35S / CaMV35S / Figwort35S / CaMV35S	*Cry1Ac / Cry2Ab / CP4EPSPS / CP4EPSPS*	3` poly (A) / NOS / T-E9 / T - E9
	FM9180 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex				
	FM9162 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex				
	FM9171/ Bollgard II x Roundup Ready Flex				
	Delta Opal RR/ Roundup Ready®	MON 1445	Figwort35S	*CP4EPSPS*	T - E9
2010	Nuopal/RR/ Bollgard/ Roundup Ready	MON 531 x MON 1445	CaMV35S / Figwort35S	*Cry1Ac / CP4EPSPS*	3` poly (A) / T - E9
	FM9162 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	CaMV35S / CaMV35S / Figwort35S / CaMV35S	*Cry1Ac / Cry2Ab / CP4EPSPS / CP4EPSPS*	3` poly (A) / NOS / T-E9 / T - E9
	FM9171 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex				
	FM9063 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex				

	FM9180 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex				
	DP 141 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex				
	DP 455 BG/RR/ Bollgard/ Roundup Ready®	MON 531 x MON 1445	CaMV35S / Figwort35S	*Cry1Ac / CP4EPSPS*	3` poly (A) / T - E9

Desde el año 1935 las compañías extranjeras han producido variedades de algodón que han sido cultivadas en el país y solo a partir de los años 70 aparecen variedades producidas en Colombia y que fueron cultivadas en el país, del listado de 124 variedades de algodón aproximadamente 22 variedades fueron producidas en Colombia y las demás se produjeron en otros países (anexo 5).

El documento de Garrido (31) del Instituto Von Humboldt, indica que en Colombia se encuentran 4 especies de algodón: *Gossypium arboreum* y *Gossypium herbaceum* en estado silvestre, y *Gossypium barbadense* y *Gossypium hirsutum* tanto en estado silvestre como cultivadas; la distribución geográfica de estas especies cubre aproximadamente 25 departamentos (78% del territorio nacional), sin embargo, ninguna de estas especies es originaria de Colombia.

Algunos estudios reportan que el algodón tiene más de 40 especies con las cuales puede ser cruzado y se ha encontrado hibridación con algodón producido convencionalmente (6, 30). Mientras que, Garrido (31) registra un listado de 20 posibles parientes silvestres de la especie *G. hirsutum* que podrían llegar a tener un cruce genético con esta especie, debido a las características genómicas que presentan en común. Sin embargo, establece que en Colombia se encuentran solo tres especies: *G. arboreum*, *G. barbadense* y *G. herbaceum*. En el anexo 6, se muestra un listado de 14 registros biológicos de parientes silvestres que se encuentran en los departamentos de Córdoba, Tolima, Huila, y Cesar, donde se ha cultivado comercialmente algodón genéticamente modificado y 107 registros

biológicos de parientes silvestres que se encuentran en el resto del país. La información fue recopilada vía electrónica de bases de datos de herbarios nacionales (de la Universidad Nacional de Colombia, del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI, Base de datos del Jardín Botánico de Medellín y de la base de datos del Instituto Von Humboldt).

Establecimiento de la estrategia de muestreo en campo.

El muestreo se realizó en el municipio del Espinal, departamento del Tolima, ubicado a 04º09``N y 74º53``O, a 323 msnm y con una temperatura que oscila entre los 27 y 40ºC (69). En el listado de inscripción de agricultores de la Agremiación Remolino S.A., habían 393 lotes cultivados con algodón transgénico, de los cuales se muestrearon 58 refugios de 62 lotes, que corresponden al 14.8% (tabla 3). Las variedades cultivadas eran: DP 141 B2F, DP 455 BG/RR, FM 9063 B2F, FM 9162 B2F, FM 9171 B2F, FM 9180 B2F y Nuopal RR; la mayoría de las zonas refugio muestreadas estaban cultivadas con la variedad Delta Opal RR y tres refugios estaban cultivados con la variedad DP 90 NAL.

De 43 lotes cultivados con algodón convencional inscritos en la Agremiación Remolino, se muestrearon 31 lotes, que corresponden al 72.1% (tabla 3). Las variedades de algodón convencional cultivadas eran: DP90 NAL, Corpoica M123, Corpoica M129 y Corpoica M137.

Se ubicó una zona con presencia de individuos asilvestrados de algodón, se tomaron muestras de 4 árboles de algodón (figura 5).

En total se muestrearon 89 lotes (tabla 3) y 4 árboles de algodón; sin embargo, en laboratorio se analizaron 83 lotes que corresponden a las muestras de 56 zonas refugio (14,3%, tabla 3), muestras de 27 lotes cultivados con algodón convencional (62,8%, tabla 3) y las muestras de los individuos asilvestrados (4 árboles de algodón). Esta disminución se debió a la eliminación de 6 lotes, 1 lote porque la

información de inscripción era errónea, estaba inscrito como convencional y lo que se cultivó fue transgénico variedad Nuopal; 2 refugios porque las muestras de semilla estaban inmaduras y 3 lotes cultivados con variedades convencionales M123 y M137, porque eran lotes experimentales de Corpoica.

Tabla 3. Lotes convencionales y zonas refugio inscritas, muestreadas y analizadas.

ALGODÓN	Lotes inscritos en la Agremiación		Lotes Muestreados			Lotes Analizados en laboratorio	
	No.	Ha.	No.	Ha.	%	No.	%
CONVENCIONAL	43	281,3	31	258	72,1	27	62,8
REFUGIO	393	3867,6	58	23,404	14,8	56	14,3
Total	436	4148,9	89	281,404		83	

Los puntos de muestreo fueron ubicados en un mapa del municipio del Espinal utilizando google earth en línea y se utilizaron tres colores para identificar los puntos de muestreo, en color amarillo se colocaron los puntos correspondientes a zonas refugio, en color verde se ubicaron los puntos correspondientes a lotes cultivados con variedades de algodón convencional y con color azul se identificaron los puntos correspondientes a los individuos asilvestrados (figura 6).

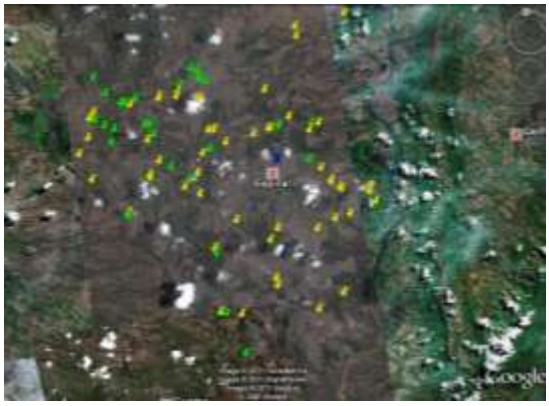
Figura 5. Individuos asilvestrados. Árboles de algodón muestreados.

Colecta de las muestras en campo. Los datos de cada lote se consignaron en un formato diseñado previamente, éste formato contiene la información colectada durante el muestreo (anexo 7). La información sobre fecha e historia de siembra del lote se registró en una libreta de campo.

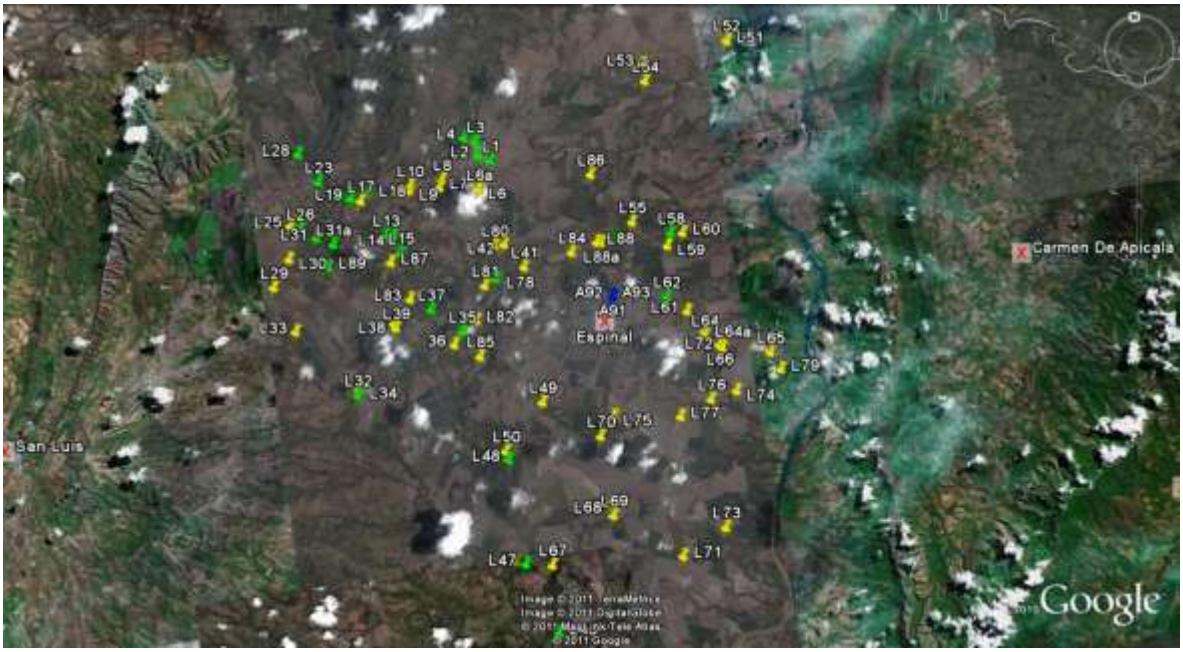
Figura 6. Ubicación de los puntos de muestreo. A. Mapa del Espinal–Tolima. B y C. Puntos de muestreo sin y con identificación del lote al que corresponden. Amarillo: representa los refugios, verde: lotes sembrados con algodón convencional y azul: individuos asilvestrados.

A

B



C



Detección de genes y proteínas transgénicas en el material recolectado.

Validación de las técnicas de extracción de DNA y PCR. Al utilizar el protocolo de extracción de Phillips y colaboradores (63) y Murray y Thompson (64) se obtuvo una concentración de DNA entre 56.8 a 532.8 ng/µl y la relación 260/280 osciló entre 1,63 - 2,0 (tabla 4); indicando que el DNA estaba libre de proteínas y fenoles (57). Sin embargo, al realizar PCR y visualizar el resultado en gel de agarosa no se presentaron bandas, respuesta que puede atribuirse a presencia de inhibidores de PCR en el DNA extraído (70).

Tabla 4. Cuantificación DNA extraído de hoja utilizando el protocolo propuesto por Phillips y colaboradores (63) y Murray y Thompson (64).

#	Muestra	Concentración Ácido Nucleico	Unidad	A260	A280	260/280
1	A1-1	24	ng/µl	0,479	0,293	1,63
6	A1-3	56,8	ng/µl	1,135	0,635	1,79
8	A85-1	532,8	ng/µl	10,656	5,231	2,00
10	A85-3	374,8	ng/µl	7,496	3,859	1,94
15	A1-2	268,1	ng/µl	5,363	2,928	1,83
18	A1-4	105,5	ng/µl	2,11	1,135	1,86
21	A85-2	409,4	ng/µl	8,188	4,199	1,95
24	A85-4	499,1	ng/µl	9,982	5,212	1,92

Con los protocolos de extracción de DNA de Bushra y colaboradores (56), Permingeat y colaboradores (57), Zhang y Stewart (58); Katterman y Shattuck (59), Gómez (60); CIP (62) y el de Guillermant y Laurence (61), no fue posible extraer DNA de buena calidad y libre de inhibidores para PCR. Esto se debió, probablemente, a que los protocolos se realizaron utilizando hojas muy jóvenes no expandidas (58), hojas no senescentes, túrgidas (59), material vegetal joven (60), o tejido fresco de plantas de 1 a 9 meses (56), mientras que el material vegetal con el que se trabajó en este estudio fueron hojas tomadas de plantas de 3 y 4 meses y que habían sido almacenadas por 150 días en freezer a -20ºC.

Además del material vegetal colectado, las características de la especie también pudieron influir en la obtención de resultados, ya que las plantas de algodón contienen altas cantidades de contaminantes que dificultan la extracción de DNA (71), como son polisacáridos, polifenoles, taninos y otros componentes secundarios que producen un pellet gelatinoso color café (56, 58-59), producto de la oxidación y unión de compuestos polifenólicos con proteínas y ácidos nucleicos de forma irreversible (56, 59, 71). Este pellet contiene DNA inadecuado para PCRs y digestión con enzimas de restricción (56, 58, 71).

En las extracciones que se habían obtenido utilizando estos protocolos, también se formó un pellet color café, pero a diferencia de los resultados obtenidos por estos autores no fue posible eliminar la contaminación aunque se realizó el paso de limpieza sugerido en cada uno de los protocolos.

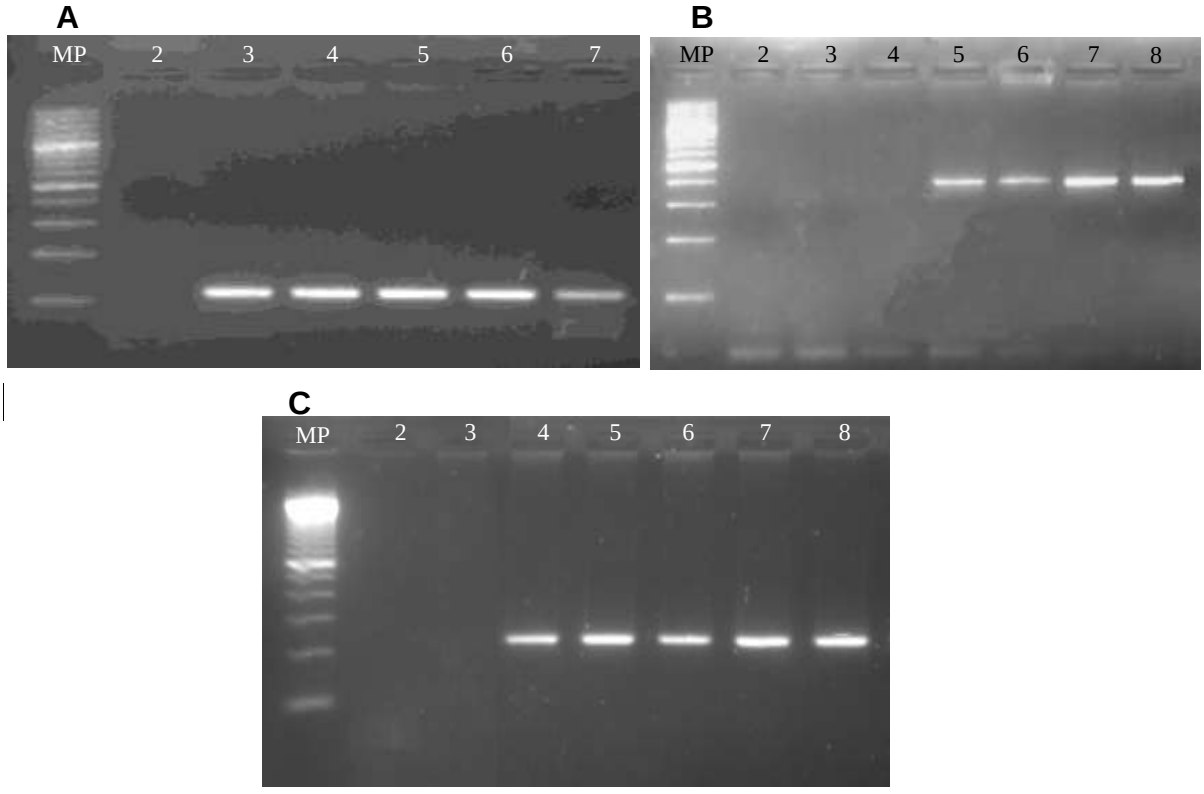
Falcón y Valera (65), sugieren combinar protocolos que permitan resolver estos problemas y reportan un paso de limpieza que utilizan cuando obtienen DNA que se encuentra muy saturado de sales o proteínas que impiden la amplificación de productos de PCR. Por tanto al utilizar el protocolo de extracción de DNA combinado de Phillips y colaboradores (63) y Falcón y Valera (65) se obtuvo DNA de buena calidad, libre de inhibidores.

La temperatura de anillamiento a utilizar para los primers FsACP fue de 63ºC, para Figwort de 60,4ºC y para *Cry1Ac* de 64,4ºC.

Todas las muestras de DNA extraídas de semillas de algodón de las variedades convencionales DP 90 NAL, Corpoica M123, M129 y M137 y de los individuos asilvestrados amplificaron con los primers FsACP, indicando que se obtuvo DNA de suficiente calidad y libre de inhibidores de PCR (5). Utilizando los primers *Cry1Ac*, todas las muestras amplificaron excepto las de los individuos asilvestrados. Las muestras de DNA de la variedad M123 y las de los individuos asilvestrados no amplificaron con los primers Figwort, mientras que en las demás

variedades si se obtuvo amplicones (figura 7). Este resultado nos muestra que las semillas de algodón convencional están contaminadas por mezcla, o son producto de procesos de hibridación entre plantas de algodón GM y no GM. Por tanto, como control negativo de las reacciones de PCR, se utilizó DNA extraído de semillas de los individuos asilvestrados.

Figura 7. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas de variedades convencionales. MP: Marcador de peso molecular 100 pb; carril 2, control sin DNA. **A. Primers utilizados para detectar FsACP**; carril 3, DNA Nuopal/RR; carril 4, DNA Corpoica M123; carril 5, DNA Corpoica M129; carril 6, DNA Corpoica M137; carril 7, DNA DP90 NAL; **B. Primers utilizados para detectar figwort**; carril 3, DNA individuos asilvestrados; carril 4, DNA Corpoica M123; carril 5, DNA Corpoica M129; carril 6, DNA Corpoica M137; carril 7, DNA DP90 NAL; carril 8, DNA Nuopal/RR. **C. Primers utilizados para detectar *Cry1Ac*;** carril 3, DNA individuos asilvestrados; carril 4, DNA Nuopal/RR; carril 5, DNA Corpoica M123; carril 6, DNA Corpoica M129; carril 7, DNA Corpoica M137; carril 8, DNA DP90 NAL.



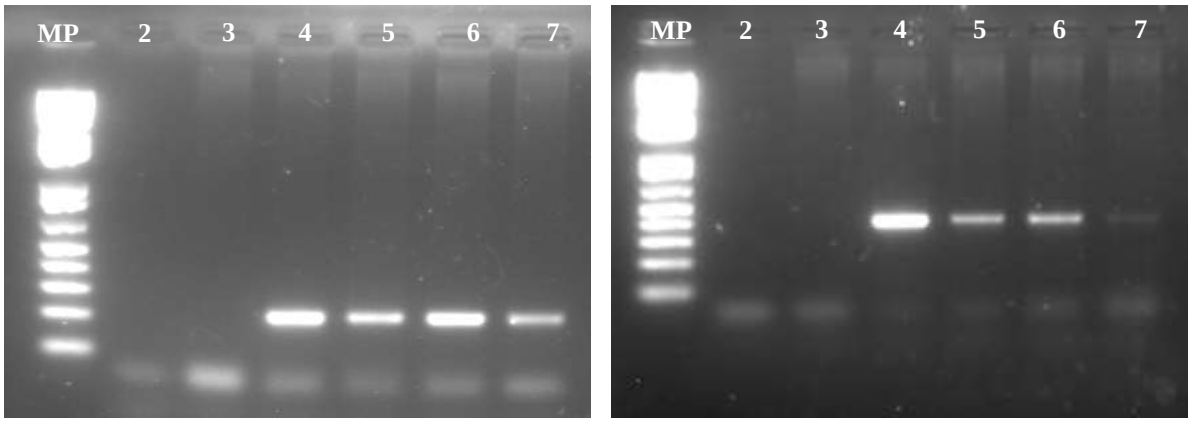
El ensayo sobre nivel de detección del kit de PCR mostró que es posible detectar 1 semilla transgénica en 100, 200 o 300 semillas no transgénicas como se muestra en la figura 8. Ortíz y colaboradores (54), determinaron que 300 semillas era el tamaño de muestra máximo con el cual era posible detectar una semilla transgénica y lo utilizaron en su estudio; por tanto, para el presente estudio, se determinó utilizar 300 semillas como tamaño de muestra para mezclar, moler y realizar extracción de DNA por duplicado.

Análisis de parentales femeninos.

Se utilizaron 751 tirillas de la prueba Inmunostrip para analizar 751 muestras que corresponden a las muestras de 83 lotes y los 4 individuos asilvestrados, los resultados fueron positivos para la proteína *Cry1Ac* cuando se marcaron dos bandas. En todas las tirillas se observó 1 banda correspondiente a la banda control, que indica que la prueba funcionó correctamente.

Figura 8. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas. Primers utilizados para detectar ***Cry1Ac*** **(A) y Promotor Figwort (B).** MP: Marcador de peso molecular 1Kb, carril 2; control sin DNA; carril 3, DNA individuos asilvestrados; carril 4, DNA Nuopal/RR; carriles 5-7, 100 semillas convencionales con 1 transgénica (100/1); 200/1 y 300/1 respectivamente.

A **B**



Se analizaron las muestras de 27 lotes cultivados con algodón convencional, teniendo en cuenta que en cada lote cultivado con algodón convencional, se

colectaron 9 muestras, se encontró que todas las muestras de 11 lotes fueron negativas para la expresión de la proteína *Cry1Ac* (figura 9A), ningún lote tuvo las 9 muestras positivas para la expresión de la proteína *Cry1Ac* y 16 lotes tuvieron al menos 1 muestra positiva para la expresión de la proteína *Cry1Ac* (figura 9B, tabla 5, anexo 8). De los lotes que tuvieron 1 muestra positiva, 2 lotes (L15 y L62) tenían lotes cultivados con algodón transgénico alrededor, ubicados a ±4 m, 1 lote (L78) se encontraba ubicado a ±5 m de la carretera vía Ibagué y el lote con algodón transgénico más cercano se ubicó a ±560 m. Los lotes que tuvieron 2, 3, 4 y 7 muestras positivas (L32, 47 y 48) lindaban con lotes cultivados con algodón transgénico ubicados a ±4 m, el lote 57 estaba separado de un lote con algodón transgénico por una carretera de más o menos 10 m. Sin embargo, un lote convencional (L58) con 2 muestras positivas y otro (L45) con 4 muestras positivas no tenía transgénicos ubicados alrededor.

Tabla 5. Resultados pruebas Inmunostrip.

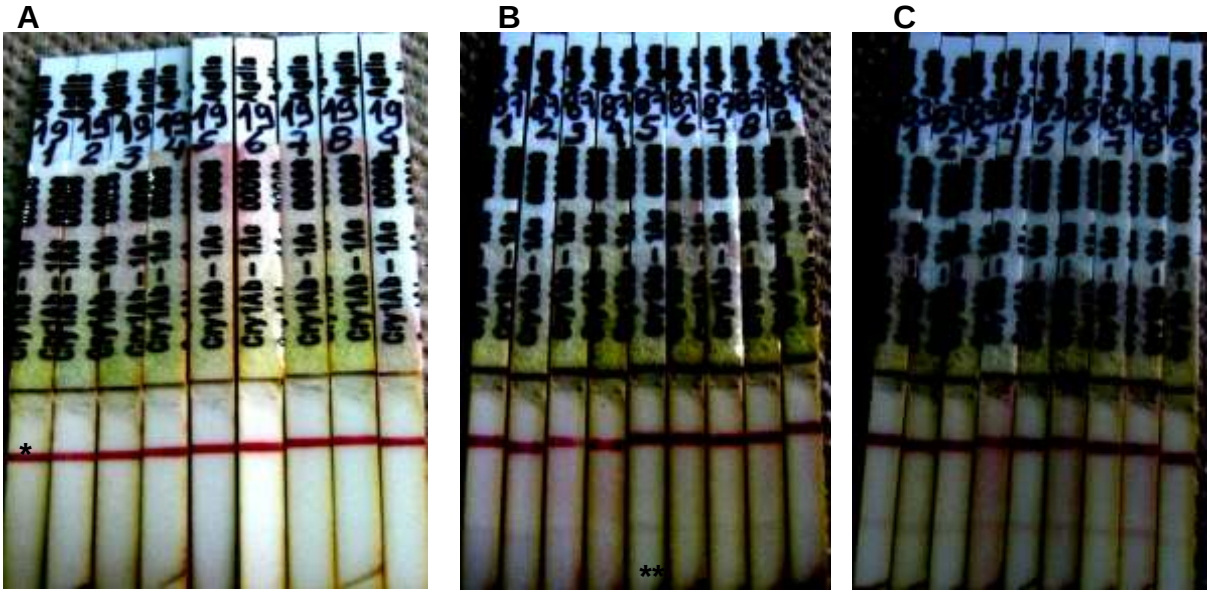
NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS	No. LOTES CONVENCIONALES	No. REFUGIOS	INDIVIDUOS ASILVESTRADOS	TOTAL
0	11	20	4	35
1	8	11	0	19
2	4	9	0	13
3	1	3	0	4
4	2	2	0	4
5	0	4	0	4
6	0	2	0	2
7	1	1	0	2
8	0	0	0	0
9	0	4	0	4
Total negativos	11	20	4	35
Total positivos	16	36	0	52

Teniendo en cuenta que en cada refugio, se colectaron 9 muestras, se encontró que de las 56 zonas refugio analizadas, 20 zonas tuvieron todas sus muestras negativas para la expresión de la proteína *Cry1Ac*, 4 refugios tuvieron las nueve muestras positivas para la expresión de la proteína *Cry1Ac* (figura 9 B, C) y 32 refugios tuvieron al menos 1 muestra positiva para la expresión de la proteína *Cry1Ac* (tabla 5, anexo 8). Las muestras de los individuos asilvestrados fueron negativas para la expresión de la proteína *Cry1Ac*.

Al aplicar las pruebas inmunostrip, en la mayoría de las tirillas en las que se marcaron las dos bandas, la intensidad de la banda inferior que corresponde a prueba positiva, era muy baja, apenas visible (figura 9). Shaukat y colaboradores (72), también obtuvieron bandas de baja intensidad al utilizar pruebas inmunostrip para detectar la presencia/ausencia de toxinas Cry en algodón Bt y atribuyeron la poca intensidad a una baja concentración de toxina que no estaría dentro del límite de detección. A su vez, reportan que el nivel de expresión del gen Bt varía desde muy bajo a alto y lo atribuyen a cambios por mezcla de semillas o segregación monogénica.

Sin embargo, teniendo en cuenta que en esta fase el análisis se hizo sobre hoja, la baja intensidad de la banda correspondiente a respuesta positiva, probablemente se debe a la edad del tejido utilizado para aplicar las pruebas (hojas tomadas de plantas de 3 y 4 meses y almacenadas por 150 días en freezer a -20ºC), ya que Zenner y colaboradores (48) y Olsen y colaboradores (73), encontraron que a medida que la planta de algodón se desarrolla, la concentración de la proteína *Cry1Ac* disminuye. Es decir, la expresión de la proteína varía dependiendo de la edad de la planta y su estado fisiológico, y esta variación puede estar relacionada al efecto que tienen las modificaciones climáticas, el nivel de fertilización y la disponibilidad de agua sobre las plantas de algodón.

Figura 9. Resultados prueba inmunostrip. A. Todas las muestras negativas. B. Al menos una muestra positiva. C. Todas las muestras positivas. * banda control. ** banda positiva para *Cry1Ac*. Obsérvese intensidad de la banda inferior, correspondiente a resultado positivo. (Se modificó el brillo y el contraste de las fotografías con el fin de hacer más visibles las bandas inferiores).



Saldarriaga (74) analizó la concentración de la toxina en las hojas terminales en el ciclo del cultivo del algodonero y encontró que 15 días después de la siembra la concentración de la proteína fue de 3,752 ppm, a los 90 días la concentración fue de 0,668 ppm y a los 105 y 120 días fue 0.

Al utilizar el protocolo de extracción de DNA combinado (63, 65), se obtuvo DNA en concentraciones de 61,2 – 1218,7 ng/µl, la relación 260/280 osciló entre 1,60 - 1,99, (anexo 9), el DNA fue de buena calidad y cuando se utilizó para los ensayos de PCR se obtuvo amplicones.

Utilizando este protocolo se realizaron 283 extracciones de DNA de hoja; sin embargo, no se consiguió aislar DNA de 46 muestras debido probablemente a la calidad del material vegetal que se colectó. Estas hojas eran adultas, con puntos color café en la mayoría de su superficie (figura 10) y senescentes, esta última característica según Katterman y Shattuck (59) impide obtener DNA en proporciones óptimas.

Figura 10. Hojas de algodón inadecuadas para realizar extracción de DNA.

La PCR utilizando primers para amplificar el gen endógeno FsACP, se hizo para 237 extracciones y en todas las muestras se obtuvo un amplicón de 116 pb (figura 11A). La utilización de estos primers como control positivo, permitió asegurar que el DNA era de suficiente calidad para amplificación de productos de PCR (5). Estos primers se utilizaron en el estudio de Seong y colaboradores (67), para diferenciar algodón de otros cultivos como maíz, soya, arroz y cebada y para amplificar el gen FsACP de algodón que expresa la proteína (FsACP) específica de la fibra de algodón. También han sido utilizados como controles en métodos de detección de algodón de Monsanto´s para amplificar este gen endógeno (67).

Con los primers para amplificar la región promotora del virus del mosaico Figwort, se utilizó DNA de 112 extracciones y se obtuvo un amplicón de 396 pb en al menos una muestra de 4 lotes cultivados con algodón convencional y en al menos una muestra de 1 refugio analizado; ninguna muestra fue positiva para la presencia de Figwort en 7 lotes cultivados con algodón convencional. Las muestras de los individuos asilvestrados fueron negativas para la presencia de Figwort (tabla 6, figura 11B, anexo 11).

Utilizando primers para amplificar el gen *Cry1Ac*, se realizó PCR con 237 extracciones de DNA y se obtuvo un amplicón de 228 pb en al menos una muestra de 10 lotes cultivados con algodón convencional y en al menos una muestra de 9 refugios. 11 zonas refugio tuvieron todas las muestras negativas para la presencia

del gen *Cry1Ac*, todas las muestras de 1 lote cultivado con algodón convencional y las muestras de los individuos asilvestrados fueron negativas para la presencia del gen *Cry1Ac* (tabla 6, figura 11C, anexo 11). El mismo tamaño de amplicón fue obtenido por Randhawa y colaboradores (66) en sus ensayos de PCR para detectar los eventos de algodón MON531 y MON15985.

Estos resultados muestran que se obtuvieron falsos negativos con la prueba inmunostrip en las muestras de 10 lotes cultivados con algodón convencional y en las muestras de 9 refugios. Sin embargo, es posible evitar los falsos negativos, utilizando hojas jóvenes y con menor tiempo de almacenamiento para aplicar esta prueba.

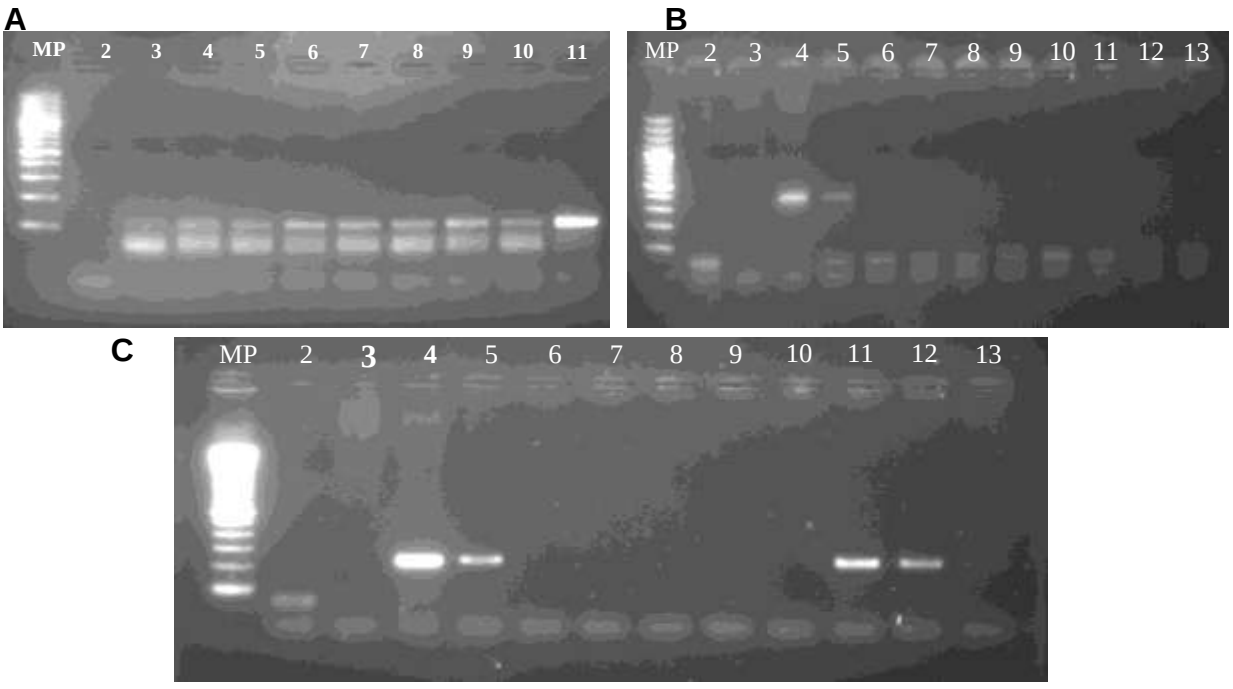
Tabla 6. Resultados PCR con DNA extraído de hojas.

NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS	No. LOTES CONVENCIONALES		No. REFUGIOS		INDIVIDUOS ASILVESTRADOS	
	Primers					
	Figwort	*Cry1Ac*	Figwort	*Cry1Ac*	Figwort	*Cry1Ac*
0	7	1	0	11	4	4
1	3	4	1	2	0	0
2	1	1	0	3	0	0
3	0	0	0	2	0	0
4	0	1	0	1	0	0
5	0	3	0	0	0	0
6	0	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
TOTAL NEGATIVOS	7	1	0	11	4	4
TOTAL POSITIVOS	4	10	1	9	0	0

Teniendo en cuenta que el flujo de transgenes puede ocurrir vía polen o vía semillas (2, 11, 26), en este estudio se prueba que existe flujo de genes vía semilla desde cultivos de algodón Bt hacia variedades convencionales de algodón y hacia algodón no Bt.

Al analizar los parentales femeninos mediante inmunostrip y PCR, se encontró que existe flujo de genes vía semilla en 26 lotes convencionales de 27 lotes muestreados (96% de los lotes convencionales) y en 45 refugios de 56 refugios muestreados (80,4% de los refugios). En los individuos asilvestrados no se detectó flujo de genes vía semilla.

Figura 11. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de hojas. **Primers utilizados para detectar FsACP (A)**, MP: Marcador de peso molecular 100 pb; carril 2, control sin DNA; carriles 3-11, muestras 1 a 9. **Primers utilizados para detectar Figwort (B)** y ***Cry1Ac*** **(C),** carril 3, DNA individuos asilvestrados; carril 4, DNA Nuopal/RR; carriles 5-13, DNA muestras 1 a 9.



El flujo de genes vía semilla que se presentó en lotes cultivados con variedades convencionales, ubicados cerca (±4 - 10m de distancia) de lotes cultivados con

variedades transgénicas, pudo deberse a germinación de semillas transgénicas que cayeron involuntariamente en estos lotes, o semillas que fueron diseminadas o esparcidas por el viento. Heuberger y colaboradores (2) y Messeguer (12) también reportan esta fuente como posible flujo de genes. Mientras que el flujo de genes observado en lotes convencionales que no estaban ubicados cerca a lotes cultivados con algodón transgénico pudo deberse a contaminación de semillas (5) (mezcla de semillas que puede ser de origen), o a semillas sembradas inadvertidamente durante la cosecha (12) o resultado de errores humanos cometidos durante la siembra, cosecha o procesamiento de la semilla (2).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que factores como el vertimiento de semillas en áreas de producción o durante las rutas de transporte de las semillas, la utilización de estas para alimentación de ganado y la posible dispersión ocasionada por el ser humano, también están involucrados y se han reportado como posibles causas por las que se presenta flujo de genes vía semillas (39). Es posible que el flujo de genes vía semillas observado en los lotes cultivados con algodón convencional ubicados a unos ±6 m de distancia de la carretera o vías de transporte, se deba a la caída de semillas durante el transporte de éstas.

En los refugios que presentaron de 1 a 7 muestras positivas, ese flujo de genes probablemente se debió a que hubo mezcla de semillas durante la siembra, ya sea porque la semilla estaba contaminada (mezcla de semillas de origen) o por mezcla mecánica (5), sobre todo cuando la siembra se realizó utilizando máquinas sembradoras o los mismos equipos para la siembra.

En el caso de los refugios que presentaron las 9 muestras positivas, no se puede hablar de flujo de genes vía semilla, ni de errores en la ubicación de la zona refugio, ya que el muestreo se hizo con la asistencia de los técnicos de campo de la Agremiación y cuando fue necesario se les preguntó a los propietarios del lote la ubicación de esta zona, puesto que no era posible diferenciar fenotípicamente las plantas de la zona refugio con las del lote transgénico y tampoco se encontraba

marcada la zona refugio. Es posible que la información que nos dieron acerca de la ubicación fuera errónea y que se hayan ignorado o incumplido las disposiciones legales vigentes sobre el establecimiento de refugios.

Respecto a los individuos asilvestrados, la ausencia de flujo de genes vía semilla, pudo deberse a que se encuentran alejadas de las fuentes de polen y semilla transgénica. Los árboles estaban ubicados entre la estación de policía y el terminal de transportes del municipio del Espinal; son árboles de más o menos 3 a 4 metros de altura y se encuentran en ese sector desde hace 5 a 7 años, según información suministrada por habitantes del municipio y técnicos de campo de la Agremiación Remolino S.A.

Resultados similares respecto a flujo de genes mediado por semillas desde algodón genéticamente modificado hacia algodón convencional fueron reportados por Heuberger y colaboradores (2) Kim y colaboradores (26) y Heuberger y colaboradores (75); quienes además, encontraron en Arizona flujo de genes en parcelas experimentales de algodón no Bt y mezcla de semillas en bolsas que debían contener solo semillas de algodón no Bt.

Sin embargo, el flujo de genes vía polen o por dispersión de semillas debe ser considerado sobre todo por las precauciones que deben tomarse con respecto a la liberación al ambiente de plantas genéticamente modificadas (26, 76). El flujo de genes vía semillas puede ocasionar problemas legales debidos a la dispersión de transgenes en lotes cultivados con variedades no GM, ya que podrían llegar a perjudicar a los agricultores de cultivos no GM (26). También, puede ocasionar inconvenientes si se requiere exportar semillas de algodón a países donde las características biotecnológicas no han sido aprobadas o no están reguladas (5).

Además, el flujo de transgenes podría amenazar los derechos de propiedad intelectual de las compañías biotecnológicas, las ventas de productos no transgénicos, las estrategias de manejo de resistencia de insectos y malezas (2,

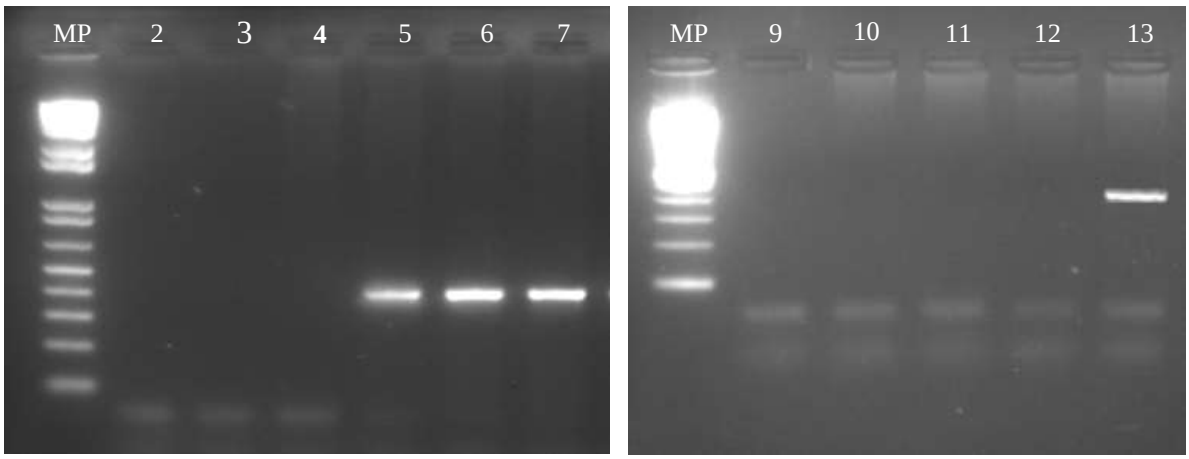
11, 27-28, 75) y podría aumentar el flujo de genes mediado por polen cuando surgen plantas adventicias producto del flujo de genes mediado por semillas y se presenta polinización cruzada con plantas adyacentes (2, 24, 50, 75, 77).

Análisis de la progenie*.*

Extracción de DNA de semillas, PCR y Elisa. La extracción de DNA de semillas se realizó con las muestras que resultaron negativas en los análisis de hoja y que corresponden a 12 lotes, uno convencional (lote 31) y 11 refugios (lotes 10, 33, 63, 64, 66, 77, 79, 81, 84, 86 y 88). La concentración del DNA obtenido osciló entre 8,7 y 85,8 ng/µL y la relación 260/280 entre 1,6 - 1,9 (anexo 10) indicando que se obtuvo DNA de buena calidad (66, 67), que al ser utilizado para PCR con los primers FsACP produjo amplicones en todas las muestras de DNA.

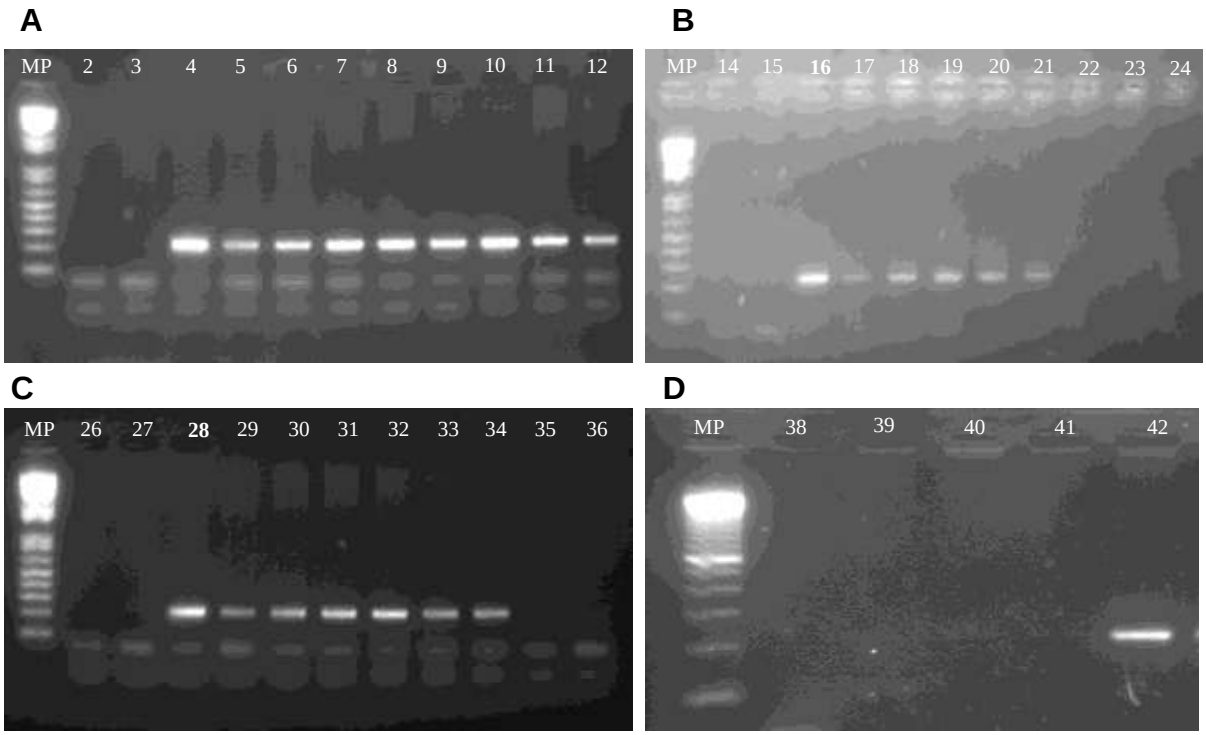
La PCR utilizando primers para amplificar el promotor Figwort se hizo con el DNA extraído del lote convencional y resultó positivo (figura 12). Las muestras de los individuos asilvestrados fueron negativas para la presencia del promotor Figwort (figura 12, tabla 7).

Figura 12. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas utilizando primers para detectar Figwort. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2, 3 y 9: control sin DNA; carril 4 y 10; DNA individuos asilvestrados; carril 5 y 13: DNA Nuopal/RR; carril 6: DNA semillas lote 31; carril 7: DNA semillas lote 31 duplicado; carril 11: DNA individuos asilvestrados; carril 12: DNA individuos asilvestrados duplicado.



Utilizando primers para amplificar el gen *Cry1Ac* se hizo PCR para las muestras de DNA de 11 refugios encontrándose 9 refugios positivos para la presencia del gen *Cry1Ac* y 2 refugios negativos, correspondientes a los lotes 79 y 88 (figura 13); la muestra de DNA del lote convencional (lote 31) resultó positiva para la presencia del gen *Cry1Ac* y los individuos asilvestrados resultaron negativos para la presencia del gen *Cry1Ac* (figura 13, tabla 7).

Figura 13. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de DNA extraído de semillas utilizando primers para detactar *Cry1Ac*. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb; carriles 2, 14, 26 y 38, control sin DNA; carril 3, 15, 27 y 39, DNA individuos asilvestrados; carril 4, 16, 28 y 42, DNA Nuopal/RR; carril 5 y 6, DNA semillas lote 10; carril 7 y 8, DNA semillas lote 31; carril 9 y 10, DNA semillas lote 33; carril 11 y 12, DNA semillas lote 63; carril 17 y 18, DNA semillas lote 64; carril 19 y 20, DNA semillas lote 66; carril 21 y 22, DNA semillas lote 77; carril 23 y 24, DNA semillas lote 79; carril 29 y 30, DNA semillas lote 81; carril 31 y 32, DNA semillas lote 84; carril 33 y 34, DNA semillas lote 86; carril 35 y 36, DNA semillas lote 88; carril 40 y 41, DNA semillas individuos asilvestrados.



Con la prueba Elisa se encontró que las muestras de 2 refugios fueron negativas para la expresión del gen *Cry1Ac* (refugios 79 y 88) y concuerdan con los refugios en los que no hubo amplificación del transgen *Cry1Ac* (figura 14, tabla 7). Las

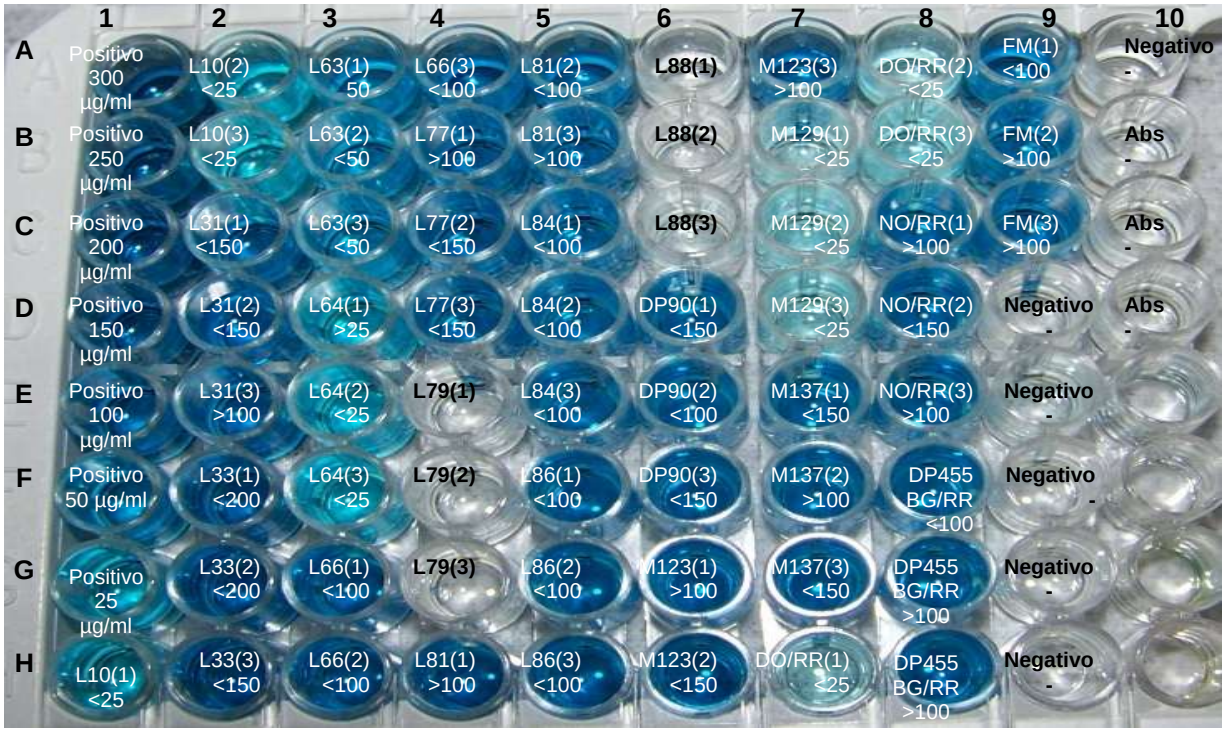
muestras de los 9 refugios restantes y la muestra del lote convencional analizadas con esta prueba y sus replicas fueron positivas para la expresión de la proteína *Cry1Ac* y la cuantificación de la proteína osciló aproximadamente entre menos de 25 y menos de 200 µg/ml (figura 14). A su vez se identificó traducción del transgen *Cry1Ac* en las muestras de semillas de las variedades convencionales DP 90 Nal, Corpoica M123, M129 y M137, el nivel de expresión de la proteína se cuantificó entre menos de 25 y menos de 150 µg/ml aproximadamente (figura 14).

Tabla 7. Resultados PCR con DNA extraído de semillas y resultados prueba ELISA

		CONVENCIONAL		**REFUGIO**		**INDIVIDUOS ASILVESTRADOS**	
		No. lotes Positivos	No. lotes Negativos	No. lotes Positivos	No. lotes Negativos	No. individuos Positivos	No. individuos Negativos
PCR	Primers figwort	1	0	-	-	0	4
	Primers *Cry1Ac*	1	0	9	2	0	4
ELISA	*Cry1Ac*	1	0	9	2		

Se encontraron positivos en las muestras analizadas tanto para presencia como para expresión del transgen *Cry1Ac*, lo que demuestra que existe flujo de genes vía polen desde algodón genéticamente modificado hacia variedades convencionales. Resultados similares fueron obtenidos por Heuberger y colaboradores (2), Llewellyn y colaboradores (4), Van Deynze y colaboradores (5), Zhang y colaboradores (6) y Freire (7), quienes reportaron flujo de genes desde parcelas cultivadas con algodón GM hacia algodón convencional. El flujo de transgenes de algodón vía polen se ha reportado en Estados Unidos, Australia, China, Sur África, Argentina, Arizona, Arkansas, Mississippi y Norte de California (5) .

Figura 14. Resultados prueba ELISA. Identificación de las muestras en la placa de la prueba ELISA y cálculo de la concentración de la proteína *Cry1Ac.*



El flujo de genes vía polen reportado en esta investigación debe ser analizado teniendo en cuenta que el flujo de genes vía semilla es muy alto, 80,4% en refugios y 96% en lotes cultivados con variedades convencionales de algodón, porcentaje que debe sumarse a la cantidad de cultivos de algodón GM que se encontraban en la zona durante el muestreo, y que conlleva a que la posibilidad de que se presente flujo de genes vía polen cambie significativamente, siendo mayor la probabilidad de que se presente. Si le sumamos a esto, que no existen establecidas distancias de aislamiento, se encontraron lotes de algodón convencional rodeados de lotes cultivados con algodón transgénico (separados por ±4-10m) y que la totalidad de los cultivadores inscritos en la agremiación, optaron por utilizar el esquema refugio 96/4, se puede concluir que la fuente de transgenes es muy grande y que esto influyó en nuestros resultados; puesto que aunque el análisis de flujo de genes vía polen solo se pudo hacer en 1 lote

convencional y 11 refugios, se muestra evidencia de la presencia de híbridos de algodón.

Además del escenario biológico en el que es analizado el flujo de genes vía polen que se observó, se debe tener en cuenta la presencia de insectos polinizadores, que ha sido reportada como la causa principal por la que se presenta flujo de genes vía polen y por tanto hibridación natural en el algodonero (5, 32-33), ya sea por la presencia de abejas (4- 6, 9, 32), abejorros y melissodes (5, 6), o abejorros (4, 6), u otros insectos como avispas, moscas, hibiscos y mariposas (6, 13).

Como causas secundarias se ha reportado la cantidad y comportamiento de los polinizadores debida a la disminución en aplicaciones de insecticidas que afectan la actividad del polinizador y la dispersión del polen (5-6, 14-15, 33), la ubicación de los lotes, las condiciones ambientales, el clima donde se cultiva algodón (4-6, 13, 16-18), la presencia de cultivos frutales cercanos (4) y el viento (5).

Con los resultados obtenidos en este estudio y teniendo en cuenta que no existe normatividad en cuanto a distancias de aislamiento entre cultivos de algodón genéticamente modificado y algodón convencional, se hace necesario evaluar la idea de establecer distancias de aislamiento entre estos lotes. Más aún si se tiene en cuenta que el lote convencional en el que se evidenció eventos de hibridación estaba alejado por ±4 m de distancia de lotes cultivados con algodón transgénico. En estudios realizados en otros países se ha demostrado que el flujo de genes vía polen, disminuye exponencialmente con el incremento de la distancia desde la fuente de polen (6, 9, 12), y que es dependiente de las condiciones ambientales; se ha detectado flujo de genes a 20 y 25 m en Arizona, Arkansas, Mississippi y Norte de California (5, 6) y más allá de 1600 m en USA y California (5, 26).

Respecto al flujo de genes observado en zonas refugio, varios autores (9, 19, 78, 79) establecen que depende de diversos factores como el tamaño del refugio, forma y distancia desde el cultivo Bt; longevidad del polen, proporción de

establecimiento, similaridad en tiempos de maduración y tamaño de las flores machos y hembras de los híbridos Bt y no Bt. En esta investigación es posible que el tamaño del refugio este influyendo en la presencia de flujo de genes vía polen, ya que el esquema refugio que se observó en todos los lotes cultivados con algodón transgénico fue 96/4, aunque también esta reglamentado el esquema 80/20, pero este no fue utilizado, es probable que con ese esquema se evite o por lo menos se disminuya el flujo de genes que se esta presentando. Además, la distancia del refugio desde el cultivo Bt, también puede estar influyendo ya que los refugios se ubicaron contiguos al algodón transgénico y algunos de los lotes cultivados con algodón convencional y los refugios lindaban y se encontraban cerca (entre 4-10 m de distancia) de lotes cultivados con algodón transgénico.

Con este estudio se demuestra que no se están cumpliendo las normas, ya que las zonas refugio tienen plantas Bt y los lotes convencionales tienen plantas transgénicas y por tanto se debe hacer cumplir las normas y evaluar estrategias que eviten o disminuyan el flujo de genes. Se propone evaluar y pensar nuevamente como y quien debe decidir el esquema refugio a utilizar, puesto que actualmente la decisión la toma el agricultor; y manejar el refugio para evitar resistencias y una zona buffer para evitar el flujo de genes.

En este estudio, y al igual que en el estudio de Heuberger y colaboradores (2), la fuente de flujo de genes de mayor importancia fue el flujo de genes mediado por semillas, a pesar que este tipo de flujo de genes ha recibido menor atención que el flujo de genes mediado por polen (2, 3).

2. Conclusiones y Recomendaciones

2.1 Conclusiones

Con el monitoreo de flujo de genes desarrollado en este estudio en la Agremiación Remolino S.A. del Espinal-Tolima en el primer semestre de 2010, se comprobó flujo de genes vía semilla en 96% de lotes cultivados con algodón convencional muestreados y en 80,4% de zonas refugio muestreadas, el flujo de genes vía polen en este escenario se comprobó en 83,3% de los lotes muestreados. En los individuos asilvestrados de algodón no se comprobó flujo de genes vía semillas ni vía polen.

En el 2010, en el municipio del Espinal (Tolima) se cultivaron las tecnologías transgénicas Bollgard x Roundup ready y Bollgard II x Roundup ready flex, que tienen los transgenes *Cry1Ac* y *CP4EPSPS*, las variedades convencionales DP90 NAL, Corpoica M123, M129 y M137. Solo se encontró individuos asilvestrados de algodón.

En campo se estableció como estrategia de muestreo colectar muestras de hojas y cápsulas de algodón en zonas refugio y en lotes cultivados con algodón convencional haciendo un recorrido en forma de W en la zona de muestreo seleccionando 9 plantas al azar y colectar muestras de los individuos silvestres que se lograran ubicar.

La secuencia promotora Figwort se identificó en el 18,5% de los lotes cultivados con algodón convencional y en el 33,3% de los refugios, y se detectó y/o verificó la expresión del transgen *Cry1Ac* en el 100% de los lotes cultivados con algodón convencional y en el 96,4% de los refugios muestreados.

2.2 Recomendaciones

Utilizar hojas de algodón jóvenes, no senescentes y túrgidas para el análisis de parentales.

Establecer un programa nacional de monitoreo para evitar el flujo de genes y todos los perjuicios que ocasiona éste, que sea financiado con recursos de las multinacionales, los agricultores y el estado con el fin de dar cumplimiento al objeto de la ley 740 de 2002 creada por Colombia.

Evaluar y pensar nuevamente como y quien debe decidir el esquema refugio a utilizar y manejar el refugio para evitar resistencias y una zona buffer para evitar el flujo de genes.

Obtener los datos de georeferenciación de todos los cultivos GM y no GM establecidos en el municipio que se va a muestrear para poder establecer las distancias entre cultivos.

Para limitar y hacer factible un estudio de flujo de genes se propone que el monitoreo se realice de la siguiente forma:

Identificar las tecnologías de algodón GM liberadas en el territorio nacional. Realizar un listado de los eventos, identificar las zonas del cassette y determinar los genes concluyentes.
Seleccionar 3 municipios por departamento.
Recopilar información sobre la ubicación de los lotes sembrados con algodón en la región que se va a estudiar y ubicarlos en un mapa de la región.
Confrontar en campo la información de georeferenciación y complementar el mapa.
Escoger al azar los lotes de muestreo.

Realizar el muestreo en el 10% de refugios, en el 10% de lotes sembrados con variedades convencionales de algodón y en cada una de las poblaciones de especies silvestres de algodón que se localicen en los municipios seleccionados.

En cada lote tomar 9 plantas al azar, siguiendo una distribución en forma de W, colectar 1 hoja y aplicar la prueba Inmunostrip para analizar los parentales femeninos.

Utilizar tubos eppendorf de 1,5 ml y puntas azules (100-1000 µL) despuntadas, previamente esterilizadas y limpiar el material vegetal con una toalla absorbente humedecida con alcohol al 70% y secarla con otra toalla. Si la prueba da negativo, colectar 5 cápsulas abiertas. Si la prueba inmunostrip da positiva, se tomará como flujo de genes vía semilla y no se utilizará para el análisis de flujo de genes vía polen.

Colocar las cápsulas en bolsas de papel previamente rotuladas, con su respectiva documentación y guardarlas en bolsas resellables individuales para su transporte, una vez estén en el lugar donde serán analizadas, eliminar la bolsa resellable y dejar solo la bolsa de papel, almacenar las semillas a temperatura ambiente, alejadas de zonas húmedas.

En cada sitio de muestreo registrar toda la información en una libreta de campo. Para analizar la progenie, aplicar la prueba ELISA por triplicado para cada muestra.

Anexos

Anexo 1. Protocolo de extracción de DNA de hojas (63, 65)

- Tomar una hoja, limpiarla con una toalla de papel absorbente previamente humedecida con alcohol al 70% y secarla.
- Cortar tres fragmentos cuadrados de hoja de aproximadamente 1.5 cm en un tubo eppendorf previamente esterilizado y marcado con el número de muestra.
- Agregar 200 µL el buffer de extracción 2X CTAB y macerar con una punta (100-1000 µL) previamente despuntada y esterilizada.
- Agregar 300 µL del buffer y continuar con la maceración del tejido vegetal.
- Agregar otros 300 µL del buffer, agitar en un vortex y centrifugar a 12000 rpm, durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 500 µL del mismo buffer y 7 µL de β – mercaptoetanol y mezclar bien en un vortex.
- Incubar las muestras en baño maría a 65°C , por 25 minutos, luego agitar en vortex y colocar por 25 minutos más a 65°C en baño maría (63).

- Agregar 50 µL de fenol y 50 µL de cloroformo y agitar en vortex.

- Centrifugar a 10000 gr por 2 minutos, rescatar la fase superior con cuidado sin tocar la interfase blanca que contiene las proteínas y ponerla en un tubo eppendorf limpio.

- Agregar 50 µL de fenol y 100 µL de cloroformo, agitar en vortex y centrifugar a 10000 gr por 2 minutos, rescartar la fase superior y ponerla en un tubo eppendorf limpio.

- Colocar 100 µL de cloroformo, mezclar bien en vortex y centrifugar a 10000 gr por 5 minutos, rescatar la fase superior a un tubo eppendorf nuevo.

- Precipitar el DNA agregando 10 µL de NaCl 2M y 250 µL de isopropanol y reposar la muestra a -20ºC durante 3 horas máximo.

- Centrifugar por 30 minutos a 12000 gr a 4ºC, eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 90% frío.
- Dejar secar, resuspender en 50 µL de buffer TE y adicionar 2 µL de RNAsa (65).

NOTA: Todo se lleva a cabo con centrífuga refrigerada a 4°C

Buffer de Extracción 2X CTAB

Reactivo	**Concentración Final**
Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA	20 mM
NaCl	1,4 M
CTAB	2% (P/V)
PVP	1% (P/V)

Buffer TE

Reactivo	**Concentración Final**
Tris-HCl pH 8.0	100 Mm
EDTA	1 Mm

Anexo 2. Protocolo extracción de DNA de semillas DNeasy Plant Maxi kit.

- Pesar 0.5 gr de polvo fino macerado y colocarlo en un tubo de 50 ml.
- Adicionar 5 ml del buffer AP1 (precalentado a 65ºC) y 10 µL de solución stock RNase A.
- Incubar la mezcla durante 10 minutos a 65ºC. Mezclar por inversión del tubo 2 o 3 veces durante la incubación.
- Adicionar 1.8 ml de buffer AP2, mezclar e incubar durante 10 minutos en hielo.
- Centrifugar a 3000-5000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar el sobrenadante dentro de una columna Maxi spin QIAshredder (lila) colocada en un tubo de colección de 50 ml y centrifugar a 3000-5000 g durante 5 minutos a 15-25ºC de temperatura. Transferir el sobrenadante del tubo de colección, sin revolver el pellet, a un tubo nuevo de 50 ml, precisando el volumen. Generalmente se recuperan 5-6 ml de lisado.
- Adicionar 1.5 volúmenes de buffer AP3/E y mezclar inmediatamente en vortex. Por ejemplo, para 5 ml, adicionar 7.5 ml de buffer AP3/E. Reducir la cantidad de buffer AP3/E, si el volumen es menor. Es posible que se forme un precipitado después de adicionar el buffer AP/3, pero esto no afecta el procedimiento.
- Pipetear la muestra (máximo 15 ml), incluyendo algún precipitado que pueda haberse formado, dentro de la columna Maxi spin DNeasy colocada en un tubo de colección de 50 ml. Centrifugar a 3000-5000 g durante 5 minutos a 15-25ºC. Descartar el sobrenadante. Reutilizar el tubo de colección en el siguiente paso.
- Adicionar 12 ml de buffer AW dentro de la columna Maxi spin DNeasy y centrifugar durante 10 minutos a 3000-5000 g para secar la membrana. Descartar el sobrenadante y el tubo de colección.
- Transferir la columna Maxi spin DNeasy a un tubo nuevo de 50 ml (suministrado en el kit). Pipetear 0.75-1 ml de buffer AE directamente sobre la membrana de la columna. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25ºC), y centrifugar por 5 minutos a 3000-5000 g.
- Adicionar otros 0.75-1 ml de buffer AE, y repetir el paso de elusión como se describió en el punto anterior.

Anexo 3. Protocolo kit PathoScreen (DAS) ELISA para detectar *Cry1Ab-1Ac* en plantas**.**

1. Pesar 150 mg de polvo de semilla, adicionar 1,5 ml de buffer PBST 1X. Mezclar y dejar reposar durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente. Utilizar solamente el sobrenadante como extracto de la muestra.
2. Preparar el conjugado enzimático diluyéndolo con RUB6. Agitar suavemente cada vial durante 10 segundos o agitar en vortex por 5 segundos antes de usarlo. Adicionar 110 µL de conjugado enzimático concentrado a 11 ml de diluyente RUB6, esta cantidad es suficiente para 1 placa. Mezclar el conjugado enzimático antes de adicionarlo a la placa.
3. Adicionar 100 µL de conjugado enzimático por pozo.
4. Realizar un esquema para identificación de cada uno de los pozos de la prueba. Adicionar 100 µL de cada muestra preparada dentro del pozo correspondiente de la prueba. Adicionar 100 µL de cada control positivo y negativo en los pozos correspondientes según el esquema. Mezclar el contenido de los pozos girando suavemente la placa sobre la mesa de trabajo.
5. Incubar la placa, colocándola en una caja húmeda sellada durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche en la nevera (4ºC).
6. Después de pasado el tiempo de incubación de la muestra y el conjugado enzimático, desocupar los pozos de la prueba en un recipiente de residuos, evitando que el contenido de los pozos de la prueba se mezcle. Rellenar todos los pozos de la prueba completamente con PBST 1X, y desocupar rápidamente. Repetir 7 veces el procedimiento. Es muy importante que todos los pozos de la prueba se laven a fondo. Después del lavado, mantener la placa boca abajo y golpear con firmeza sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de líquido.
7. Adicionar 100 µL de la solución de sustrato TMB en cada pozo de la placa.
8. Incubar la placa durante 20 minutos.
9. Medir la densidad óptica de los pozos de la prueba en un lector de placas a 650 nm o visualmente. Los pozos en los que se observa un color azul indican resultados positivos. Los pozos en lo que no hay desarrollo significativo de color indican resultados negativos. Los resultados de la prueba son válidos solo si los

pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos con buffer permanecen incoloros.

Buffer de lavado PBST. Preparar el buffer de lavado 1X PBST diluyendo una bolsa de buffer de lavado PBST 20X en 950 ml de agua destilada.

Preparación de controles: Resuspender el liofilizado del control positivo y el liofilizado del control negativo en 2 ml de buffer de lavado PBST 1X por botella. Después de preparar el control positivo y el negativo, hacer alícuotas de 120 µL que serán suficientes para un uso. Almacenar las alícuotas de control en freezer a -20. No deben descongelarse hasta justo antes de su uso.

Anexo 4. Tecnologías de algodón GM liberadas en Colombia, años 2003 -2010 (www.ica.gov.co).

Tecnología	Transgen	Característica	Situación Actual	Región	No. Resolución	Año	Compañía
Bollgard®	*Cry1Ac*	Resistencia a insectos lepidópteros	Siembras comerciales	Caribe húmedo colombiano	1247	2003	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
				Tolima, Huila y Valle del Cauca	3440	2003	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
				Caribe seco colombiano	1005	2004	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Ampliación zona para siembra comercial	Orinoquía colombiana	2202	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
Roundup Ready	CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Siembras comerciales	Caribe húmedo y Caribe seco colombiano	1006	2004	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
				Alto Magdalena y Valle del Cauca	366	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
Roundup Ready Flex	CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Ensayos de eficacia biológica y pruebas de evaluación agronómica	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena y Orinoquía	880	2008	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos		311	2008	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Siembras comerciales	Caribe Seco, Húmedo, Orinoquía, Valle Geográfico del río Cauca y Valle Geográfico del río Magdalena.	1258	2010	Compañía Agrícola Ltda & Cía. S.C.A.

Bollgard x Roundup Ready®	*Cry1Ac* / CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato. Resistencia a insectos lepidópteros	Estudios de bioseguridad	Caribe húmedo, seco, Alto Magdalena, Valle del Cauca y Meta (Tolima, Huila, Valle del Cauca, Meta Córdoba y Cesar).	3852	2005	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Siembras comerciales	Alto Magdalena y Valle del Cauca	358	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
				Caribe húmedo, Caribe seco y Orinoquía colombiana	2204	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos		2943	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
Bollgard II x Roundup Ready Flex.	*Cry1Ac* y *Cry2Ab* + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Estudios de bioseguridad	Caribe húmedo, seco, Alto Magdalena, Valle del Cauca y Meta (Tolima, Huila, Valle del Cauca, Meta Córdoba y Cesar).	3851	2005	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Siembras comerciales	Alto Magdalena y Valle del Cauca	1726	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Ampliación zona para siembra comercial	Caribe húmedo, Caribe seco, y Orinoquía colombiana.	2203	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos		2944	2007	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Evaluaciones agronómicas y siembras comerciales	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena y Orinoquía	1681	2008	Bayer CropSciencie S.A.

			Registro de la variedad DP141 B2RF	Valle geográfico del río Magdalena	5111	2009	Compañía Agrícola Colombiana Ltda & Cía. S.C.A.
			Registro de la variedad FiberMax FM9180	Valle geográfico del río Magdalena y Valle geográfico del río Cauca.	5112	2009	Bayer CropScience S.A.
			Registro de la variedad FiberMax FM 9063 B2F		5113		
			Registro de la variedad FiberMax 9171B2F		5114		
			Registro de la variedad FiberMax FM9162B2F		5115		
Bollgard II	*Cry1Ac* y *Cry2Ab*	Resistencia a insectos lepidópteros	Apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos		310	2008	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
LlCotton 25®	PAT	Tolerancia al glufosinato de amonio.	Apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos		307	2008	Bayer CropScience S.A.
			Estudios de eficacia biológica y pruebas de evaluación agronómica	Alto Magdalena, Caribe húmedo, seco, Valle del Cauca y Orinoquía Colombiana	1037	2009	
			Ampliación de zonas para siembras comerciales	Caribe húmedo	2403	2010	

Anexo 5. Variedades de algodón cultivadas en Colombia, años 1918- 2010 (31, 37, 38, 68)

No.	VARIEDAD	PRIMER AÑO SIEMBRA	ÚLTIMO AÑO SIEMBRA	No.	VARIEDAD	PRIMER AÑO SIEMBRA	ÚLTIMO AÑO SIEMBRA
1	Bourbon	1918	1935	63	Del cerro A 451-3	1982	1985
2	Lengupa	Antigua	1976	64	Del cerro A 263	1983	1985
3	Vergara	1933	1935	65	Gossica N23	1983	1985
4	Híbrido nativo	Antigua	1930	66	Gossica P11	1983	1985
5	Miraflores	Antigua	1958	67	Gossica P12	1984	1985
6	Sealand 542	1935	1957	68	Stonville 112	1989	-
7	Durango	1935	1936	69	Línea 91 BR2	1989	-
8	Delphos 6102	1935	1936	70	DES-119	1989	-
9	Express Brasil	1935	1948	71	KC-311	1989	-
10	Foster	1935	1948	72	KC-380	1989	-
11	Kaki	1935	1948	73	Coker 320	1989	-
12	Carolina Queen	1935	1948	74	Acala 1570-70	1989	-
13	DP (Deltapine) 12	1942	1949	75	Acala imperial	1989	-
14	DP 15	1948	1967	76	Acala SJ2	1989	-
15	Coker 124	1952	1959	77	Acala SJ5	1989	-
16	Earlystaple	1955	1958 -1962	78	Acala 3080	1989	-
17	Stoneville 3202	1958	1959	79	Acala 1517-77 BR	1989	-
18	Stoneville 7	1958	1959	80	Acala 1517-75	1989	-
19	DP staple	1958	-	81	Acala 1517E2	1989	-
20	Coker wilds	1958	-	82	DP 90	1991	-
21	Sealand	1958	-	83	DP 20	1990	-
22	Delfos 9169	1958	-	84	Stoneville 453	1991	-
23	Cemp 321	1958	-	85	Gossica MC 22	1992	-
24	Stoneville 2B	1958	-	86	Gossica MC 23	1992	-
25	Acala 4-42	1958	-	87	DP 5614	1992	-
26	Acala MV	1958	-	88	DP 51	1992	-
27	Coker Staple	1958	-	89	DP 5415	1992	-
28	Coker Wilt	1958	-	90	DP 5690	1993	-
29	DP S.L.	1961	1978	91	HS 46	1993	-
30	Plains	1962	1962	92	Acala 1517-91	-	-
31	Delfos	1962	1962	93	AG 207	-	-
32	Acala 1517 BR2	1964	-	94	AG 517	-	-
33	Stardel	1964	1965	95	AG 539	-	-
34	Stoneville 213	1965	1985	96	AG 815	-	-
35	DP 523	1965	1965	97	B 749	-	-
36	DP 5540	1965	1965	98	Caribeña M129 (Corpoica)	2000	-

37	Stoneville 7BR	1965	1965	99	Corpoica M123	2000-2010	-
38	DP 45	1966	1967	100	Delrut fibra larga	1998	-
39	Coker 201	1967	1981	101	Delta Opal	2000	-
40	DP 16	1969	1977	102	DP 393	-	-
41	Prima S .3	1970	1971	103	DP 493	-	-
42	Prima S. 4	1970	1971	104	DP 404 BG	-	-
43	Acala 1517-70	1971	-	105	DP acala 90	2007	-
44	DP 45A	1973	1976	106	Gaitana M- 109 (Corpoica)	2000	-
45	DP 25	1974	1974	107	H 23	-	-
46	Del cerro	1974	1985	108	Llanera M110 (Corpoica)	-	-
47	Stoneville 7ª	1974	1977	109	Makina	2000	-
48	Dixie King	1975	1976	110	Sinuana M 137 (Corpoica)	-	-
49	ICA Bravo	1975	1980	111	Stoneville KC 311	-	-
50	Stoneville 731 N	1976	1978	112	Vallenata M135 (Corpoica)	-	-
51	DP 55	1976	1984	113	DP 90 nacional	2010	-
52	DP 61	1977	1985	114	Corpoica M129	2010	-
53	Gossica N21	1977	1983	115	Sinuana M135	-	-
54	Gossica P21	1978	1983	116	DP 60	-	-
55	Stroman	1978	1978	117	Línea LA 1-29-4	1998	-
56	Stoneville 825	1979	1984	118	LC 151 (Oro blanco)	2007	-
57	Gossica N22	1980	1982	119	Opal	2007	-
58	Acala 1517-77	1980	1985	120	Stack gene	2007	-
59	Del cerro A 291	1979	-	121	DP 555	2007	-
60	Del cerro A 603	1979	1983	122	DP 5455	2008	-
61	Gossica M21	1981	1984	123	LCER 0060	2009	-
62	DP 41	1981	1985	124	LCER0056	2009	-

Anexo 6. Registros biológicos de parientes silvestres de algodón que se encuentran en el país (31, herbarios nacionales de la Universidad Nacional de Colombia, del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI, Base de datos del Jardín Botánico de Medellín y de la base de datos del Instituto Von Humboldt).

No.	**Género**	**Epiteto Específico**	**Departamento**	**Municipio**	**Localidad**	**Latitud**	**Longitud**
1	Gossypium	barbadense	Valle	Robles			
2	Gossypium	hirsutum, var. deltapine 16	Tolima	Espinal	Vereda Santana. Finca San Gerónimo		
3	Gossypium	hirsutum, var. deltapine 17	Tolima	Espinal	Vereda Santana. Finca San Gerónimo		
4	Gossypium	sp.	Valle	Andalucía	Estación ferrocarril		
5	Gossypium	sp.	Valle	Andalucía	Estación ferrocarril		
6	Gossypium	barbadense	Córdoba	Coveñas	Golfo de Morrosquillo		
7	Gossypium	herbaceum	Valle del Cauca		Granja Exp.Palmira.Alt.1088m..		
8	Gossypium	herbaceum	Valle del Cauca		Granja Experimental de Palmira.		
9	Gossypium	herbaceum	Valle del Cauca		Granja Experimental de Palmira.		
10	Gossypium	sp.	Córdoba		Entre Cerete y Cienaga de Oro, Hacienda La Hermita (Berastegui).		
11	Gossypium	sp.	Tolima		Carretera entre Honda y Mariquita.	51.927	-748.779
12	Gossypium	sp.	Córdoba		En la region del Sinu, cerca a la Hacienda MArtinica a 15 km de Monteria.		
13	Gossypium	sp.	Valle del Cauca		Entre Loboguerrero y Yumbo.		
14	Gossypium	barbadense	Cesar	San Martín	Pueblo Nuevo. Alrededores Ciénaga del Totumo	10	-75
15	Gossypium	barbadense	Guajira	Barrancas	Finca la Estrella		
16	Gossypium	herbaceum L	Antioquia	Ríonegro	Vijagual		
17	Gossypium	barbadense	Chocó	Acandí	San Francisco de Asís	8	-77
18	Gossypium	barbadense	Guajira		Carretera entre Tabaco y Estrella		

19	Gossypium	barbadense	Magdalena	Santa Marta	Cañaverales, Parque Tayrona		
20	Gossypium	sp.			Alrededores de Mojarras		
21	Gossypium	hirsutum	Vichada	Cumarimbo	PNN El Tuparro, caserío cerca de comunidad Guahibo, 50 Km. W del centro administrativo, vía a El Tapón	5	-68
22	Gossypium	sp.	Vichada	Cumarimbo	PNN El Tuparro, caserío cerca de comunidad Guahibo, 50 Km. W del centro administrativo, vía a El Tapón	5	-68
23	Gossypium	barbadense	Chocó	Acandí	San Francisco de Asís	8	-77
24	Gossypium	barbadense	Antioquia	Medellín			
25	Gossypium	sp.	Chocó	Carmen de Atrato	Vereda El Roble		
26	Gossypium	barbadense	Antioquia	Medellín	Barrio Velódromo, Calle 47D 78A15	6	-76
27	Gossypium	sp.	Antioquia	Medellín	Barrio Velódromo, Calle 47D 78A15	6	-76
28	Gossypium	barbadense	Antioquia	Fredonia	Paraje Sabaletas, Finca las Brisas		
29	Gossypium	barbadense	Caquetá	San Vicente del Caguán	Vereda Candilejas, Hato El Retorno. Laguna El Retorno. Bosque que rodea la laguna	1	-74
30	Gossypium	sp.	Guajira	Maicao	Corregimiento Albania, Carretera Albania a Tabaco, sitio la Estrella, río Ranchería		
31	Gossypium	barbadense		Río Satinga	Vereda San Isidro		
32	Gossypium	barbadense	Antioquia	Montebello	Vereda Sabanitas	6	-76
33	Gossypium	sp.	Antioquia	Betulia	Paraje Sabaletas		
34	Gossypium	sp.	Antioquia	Copacabana-Bello			
35	Gossypium	sp.	Antioquia	Hispania			
36	Gossypium	sp.	Guajira		Laguna los Juncos en la carretera entre Tabaco y Estrella		

37	Gossypium	sp.	Guajira	Maicao	Corregimiento Albania, Carretera Calabazito-Río Ranchería, sitio La Batea	11	-73
38	Gossypium	herbaceum	Antioquia	Medellín			
39	Gossypium	barbadense	Antioquia	Santa fé de Antioquia			
40	Gossypium	sp.	Antioquia	Medellín	Barrio Velódromo, Calle 47D 78A15	6	-76
41	Gossypium	barbadense L. var. peruvianum (Cav.) Mauer	Antioquia	Medellín	Facultad de Agronomía		
42	Gossypium	barbadense	Vaupés		Alto Vaupés. Alrededores de Miraflores		
43	Gossypium	hirsutum	Antioquia	Puerto Berrio		6	-74
44	Gossypium	hirsutum	Antioquia	Medellín	Barrio La América		
45	Gossypium	barbadense	Norte de Santander				
46	Gossypium	barbadense		Salamina			
47	Gossypium	barbadense L. var. peruvianum (Cav.) Mauer	Antioquia	Armenia			
48	Gossypium	arboreum	Nariño	Pasto	A 500 m del puente sobre el río Juanambú		
49	Gossypium	barbadense	Bolívar		Entre Sincelejo y Colosó		
50	Gossypium	barbadense	Nariño	Ancuyá	Carretera Ancuya a El Llano		
51	Gossypium	barbadense	Nariño	Ancuyá	Carretera a Condagua		
52	Gossypium	sp.	Nariño	Tablón	Carretera Panamericana. Remolino		
53	Gossypium	arboreum	Cauca	Patía	Alrededores de Mojarras		
54	Gossypium	arboreum	Nariño	Tumaco	A 500 m del puente sobre el río Juanambú		
55	Gossypium	arboreum	Nariño	Tumaco	Proximidades de Tangareal		
56	Gossypium	sp.	Nariño	Pasto	Puente Juanambú. Carretera Panamericana		
57	Gossypium	sp.	Putumayo	Mocoa	Carretera a Condagua		

58	Gossypium	herbaceum	Magdalena	Santa Marta	San Pedro Alejandrino, granja de la U.T.M		
59	Gossypium	barbadense	Bolívar		Entre Sincelejo y Colosó		
60	Gossypium	barbadense	Bolívar		Entre Sincelejo y Colosó		
61	Gossypium	barbadense	Magdalena		San Pedro Alejandrino, granja de la U.T.M		
62	Gossypium	barbadense	Magdalena		Eera Inta Sáenz Peña		
63	Gossypium	sp.	Amazonas	Miriti-Paraná	Santa Isabel, reserva indígena Miraña, chagra de Teresa Miraña.		
64	Gossypium	sp.	Caquetá	San Vicente Del Caguán	Vereda Candilejas, hato El Retorno, lag. El Retorno		
65	Gossypium	sp.	Amazonas	Leticia	Cabecera Municipal.		
66	Gossypium	sp.	Putumayo	Mocoa	Serranía del Churumbelo, vereda Bajo Afán, sector entre la parcela de estudio Sinchi y el puente sobre el río Mocoa.		
67	Gossypium	sp.	Caquetá	Florencia	Vereda La Holanda, finca Villa Lola		
68	Gossypium	sp.	Amazonas	Leticia	Resguardo indígena Ticuna-Uitoto, km 6-11, comunidad indígena Monilla Amena, km 9,8, vía Leticia-Tarapacá		
69	Gossypium	sp.	Vaupés	Morichal	Gran resguardo indígena del Vaupés, comunidad indígena de Wacurabá, cabecera cñ. Cuduyarí, vegetación creciendo alrededor de la comunidad (cultivada)		
70	Gossypium	arboreum	Cauca	Popayán	Vereda El Placer.		
71	Gossypium	barbadense	Caquetá	San Vicente del Caguán	Sabasn del Yari, Vda. Candilejas, hato El Retorno.	10.905	-7.428.333
72	Gossypium	barbadense	Huila	Baraya	.		
73	Gossypium	barbadense	Norte de Santander		Frontera colombo-venezolana, 30km de Rio de Oro por el Caño del Norte.		

74	Gossypium	barbadense	Magdalena		Isla de Salamanca.		
75	Gossypium	barbadense	Bolívar		Entre Sincelejo y Coloso.		
76	Gossypium	barbadense	La Guajira	Uribia	Rumbo a Ipanaru..		
77	Gossypium	barbadense	Cundinamarca	Nilo	Inspección de Pueblo Nuevo, hacienda Palermo y Paguez.		
78	Gossypium	barbadense.	Bolívar		Volcanes de lodo de Turbaco.		
79	Gossypium	barbadense	Santander	Suaita	Via San Jospe de Suaita a Guadalupe, trayecto vda. El Placer-San Jose de Suaita.	6.15	-73.35
80	Gossypium	barbadense	Atlántico	Usiacurí	Camino de Isabel López.		
81	Gossypium	barbadense	Santander	Suaita	Via San Jose de Suaita a Guadalupe, trayecto vda. El Placer-San Jose de Suaita.	6.15	-73.35
82	Gossypium	barbadense	Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina		Carretable en South End desde Elsy Bay hasta Bloeing Hole.		
83	Gossypium	barbadense	Norte de Santander		Valle del rio Peralonso, alrededores de Santiago.		
84	Gossypium	barbadense	Bolívar		Islas de San Bernardo, isla Mucura.		
85	Gossypium	barbadense	Bolívar		Islas de San Bernardo, isla Mucura.		
86	Gossypium	barbadense	Bolívar	Zambrano	Ciénaga de Zambrano.		
87	Gossypium	barbadense	Chocó	Quibdó	Barrio Niño Jesús.		
88	Gossypium	barbadense	Cundinamarca	Pandi	Vereda El Guarumo.	4.240.224	-7.451.984
89	Gossypium	barbadense	Santander	Suaita	Zona La Cascada y curva del Viento.	6.15	-73.35
90	Gossypium	barbadense	Bolívar		Archipiélago de San Bernardo, isla Mucura.		
91	Gossypium	barbadense	Bolívar		Archipiélago de San Bernardo, isla Mucura.		
92	Gossypium	herbaceum	Amazonas	Leticia	Trapecio,alrededores de Leticia.		
93	Gossypium	herbaceum	Amazonas		Trapecio amazónico, alrededores de Leticia.		
94	Gossypium	herbaceum	Amazonas	Leticia	Cabecera municipal.		

95	Gossypium	herbaceum	Casanare	Orocué	.		
96	Gossypium	herbaceum	Cundinamarca	Nilo	.		
97	Gossypium	herbaceum	Cundinamarca	Nilo	.		
98	Gossypium	sp.	Antioquia	Rionegro	Hacienda Montenegro, cerca a la Pintada.	57.433	-7.559.944
99	Gossypium	sp.	Magdalena		Sierra Nevada de Santa Marta, southeastern slope hoya del rio Donachui, ravine SE of Donachui.		
100	Gossypium	sp.	Magdalena		Sierra Nevada de Santa Marta, hoya del rio Donachi.		
101	Gossypium	sp.	Atlántico	Sabanalarga	12 km of Sabanalarga.		
102	Gossypium	sp.	Atlántico	Sabanalarga	12 km of Sabanalarga.		
103	Gossypium	sp.	Cauca		Houseyard in Finca El Trigal midway between rio Guachicono and Panamerican Highway.		
104	Gossypium	sp.	Putumayo	Mocoa	Mocoa y alrededores al norte.		
105	Gossypium	sp.	Putumayo	Mocoa	Mocoa y alrededores al norte.		
106	Gossypium	sp.	Vaupés		Alrededores de Miraflores.		
107	Gossypium	sp.	Caquetá		Quebrada Anduche, abandoned house site in derived.		
108	Gossypium	sp.	Caldas	Chinchiná	Granja cafetera.		
109	Gossypium	sp.	Chocó	Riosucio	Parque Nacional Natural Los Katios, camino a Tilupo, alto via Sautata, desviando por el camino a Tilupo, salto parte baja.		
110	Gossypium	sp.	Cundinamarca	Tocaima	.		
111	Gossypium	sp.	Cundinamarca	Tocaima	.		
112	Gossypium	sp.	La Guajira	Maicao	Carretera Calabazito-Rio Rancheria, sitio La Batea.	11.133.333	-72.566.666
113	Gossypium	sp.	Caldas	Villamaría	Granja Cafetera de Chinchina.		
114	Gossypium	sp.	Amazonas	Leticia	Camino hacia Tarapaca, km 17.		
115	Gossypium	sp.	Santander	Onzaga	.		

116	Gossypium	sp.	Santander	Puerto Wilches	.		
117	Gossypium	hirsutum	Vichada	Cumaribo	old homesite near Guahibio settlement ca. 50 km W of centro administrativo on road to El Tapón	53.333.333	-683.333.333
118	Gossypium	barbadense	La Guajira	Uribia	Corregimiento de Siapana		
119	Gossypium	sp.	Magdalena		Los Cocos		
120	Gossypium	hirsutum	Vichada	Cumaribo	old homesite near Guahibio settlement ca. 50 km W of centro administrativo on road to El Tapón	53.333.333	-683.333.333
121	Gossypium	barbadense	Chocó	Acandí	Sin Dato	838333	-771.167

Anexo 7. Formato colecta de muestras en campo.

MODELO DE FLUJO DE GENES PARA EL SEGUIMIENTO Y MONITOREO DE OGM LIBERADOS EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA

Lote No.	Fecha de colecta	Vereda	Finca	Propietario	Georref.	No. de hectáreas	Tipo de cultivo	Observaciones	Responsable de la colecta

TUTORIAL PARA LLENAR EL FORMATO

Lote No. M si es maíz
Números arábigos consecutivos para indicar el número del lote
Números romanos consecutivos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX) para indicar el número de planta dentro del lote
P ej. M-10-IX Indica que es la novena planta muestreada del lote de maíz número 10

Fecha de colecta Indicar la fecha de colecta con el formato día/mes/año en números arábigos
P ej. 01/07/2010 Indica que la colecta se realizó el día 1 del mes de Julio del año 2010

Vereda Indicar el nombre de la vereda a la cual pertenece el lote (Importante porque hay fincas que hacen parte de varias veredas)

Finca Indicar el nombre de la finca a la cual pertenece el lote

Propietario Indicar el nombre del propietario de la finca

Georref. Indicar la georreferencia de un punto del lote en coordenadas geográficas
P ej. N4°9'34.4" / W74°54'40.0"

No. de hectáreas Indicar el número de hectáreas del lote muestreado. En el caso de las zonas de refugio y las zonas buffer se debe especificar el área de estas zonas y el área total del campo sembrado con transgénico.

Tipo de cultivo R si es un refugio
B si es una zona buffer
C si es un cultivo convencional
L si es una raza local

Observaciones Espacio para poner observaciones relevantes con respecto al lote
P. ej: Distancia con respecto al lote de maíz transgénico más cercano. Existencia de barreras geográficas importantes. Tipo de semillas sembradas. Fecha de siembra y/o floración. Historia de siembra del lote. Otras observaciones.

Responsable de la colecta Indicar el nombre de la persona encargada de hacer la colecta.

Anexo 8. Resultados pruebas inmunostrip para identificar la proteína *Cry1Ac*.

CULTIVO	LOTE No.	PLANTA No.	POSITIVO	NEGATIVO
CV	1	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	2	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	3	1		X
		2	X	
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	4	1		X
		2	X	
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	5	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
		1		X
		2	X	

CULTIVO	LOTE No.	PLANTA No.	POSITIVO	NEGATIVO
REFUGIO (Delta Opal)	46	1		X
		2	X	
		3	X	
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	47	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5	X	
		6	X	
		7		X
		8		X
		9		X
CV	48	1		X
		2	X	
		3		X
		4		X
		5	X	
		6	X	
		7		X
		8	X	
		9		X
REFUGIO (DP 90 NAL)	49	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	50	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
		1	X	
		2		X

REFUGIO (Delta Opal)	6	3	X	
		4	X	
		5	X	
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	7	1		X
		2		X
		3		X
		4	X	
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	8	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6	X	
		7	X	
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	9	1		X
		2		X
		3		X
		4	X	
		5		X
		6	X	
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	10	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	11	1	Lote experimental	
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
		8		

REFUGIO (Delta Opal)	51	3		X
		4	X	
		5		X
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	52	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5	X	
		6		X
		7		X
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	53	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	54	1	X	
		2		X
		3		X
		4	X	
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8		X
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	55	1	X	
		2	X	
		3	X	
		4	X	
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	56	1	X	
		2	X	
		3	X	
		4	X	
		5	X	
		6		X
		7	X	
		8		X

		9					9	X	
CV	12	1	Lote experimental		CV	57	1	X	
		2					2		X
		3					3		X
		4					4		X
		5					5		X
		6					6		X
		7					7		X
		8					8	X	
		9					9		X
CV	13	1		X	CV	58	1		X
		2		X			2		X
		3		X			3		X
		4		X			4	X	
		5		X			5	X	
		6		X			6		X
		7		X			7		X
		8		X			8		X
		9		X			9		X
CV	14	1		X	REFUGIO (Delta Opal)	59	1		X
		2		X			2		X
		3	X				3		X
		4		X			4	X	
		5		X			5		X
		6		X			6	X	
		7		X			7	X	
		8	X				8	X	
		9		X			9		X
CV	15	1		X	REFUGIO (Delta Opal)	60	1		X
		2		X			2	X	
		3		X			3		X
		4		X			4	X	
		5		X			5		X
		6	X				6		X
		7		X			7		X
		8		X			8		X
		9		X			9		X
CV	16	1	Lote experimental		REFUGIO (Delta Opal)	61	1	X	
		2					2	X	
		3					3		X
		4					4		X
		5					5		X
		6					6		X
		7					7		X
		8					8		X
		9					9		X
REFUGIO (DP 90	17	1		X	CV	62	1		X
		2		X			2		X
		3		X			3	X	
		4		X			4		X
		5		X			5		X

NAL)		6		X			6		X
		7		X			7		X
		8		X			8		X
		9		X			9		X
CV	18	1		X	REFUGIO (Delta Opal)	63	1		X
		2		X			2		X
		3		X			3		X
		4	X				4		X
		5		X			5		X
		6		X			6		X
		7		X			7		X
		8		X			8		X
		9		X			9		X
CV	19	1		X	REFUGIO (Delta Opal)	64	1		X
		2		X			2		X
		3		X			3		X
		4		X			4		X
		5		X			5		X
		6		X			6		X
		7		X			7		X
		8		X			8		X
		9		X			9		X
CV	20	1		X	REFUGIO (Delta Opal)	65	1		X
		2		X			2		X
		3		X			3		X
		4		X			4		X
		5		X			5		X
		6		X			6		X
		7		X			7	X	
		8		X			8		
		9		X			9		
CV	21	1	Información errónea.		REFUGIO (Delta Opal)	66	1		X
		2					2		X
		3					3		X
		4					4		X
		5					5		X
		6					6		X
		7					7		X
		8					8		X
		9					9		X
CV	22	1		X	REFUGIO (Delta Opal)	67	1		
		2		X			2		
		3		X			3		X
		4		X			4	X	
		5		X			5	X	
		6		X			6		X
		7		X			7		X
		8		X			8		
		9		X			9		X
		1		X			1		X

CV	23	2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	24	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	25	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	26	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	27	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	28	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X

REFUGIO (Delta Opal)	68	2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	69	1		X
		2	X	
		3		X
		4		X
		5	X	
		6		X
		7		X
		8	X	
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	70	1		X
		2		X
		3	X	
		4		X
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	71	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	72	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5	X	
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	73	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	

		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	29	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	30	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5	X	
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	31	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	32	1	X	
		2		X
		3	X	
		4	X	
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	33	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta	34	1	X	
		2	X	
		3		X
		4		X
		5		X

		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	74	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6	X	
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (DP 90 NAL)	75	1	X	
		2	X	
		3		X
		4	X	
		5		X
		6		X
		7	X	
		8	X	
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	76	1		X
		2	X	
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	77	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	78	1		X
		2		X
		3	X	
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	79	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X

Opal)		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	35	1	X	
		2	X	
		3	X	
		4	X	
		5	X	
		6		X
		7		X
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	36	1	X	
		2	X	
		3	X	
		4	X	
		5		X
		6		X
		7	X	
		8		X
		9		X
CV	37	1		X
		2	X	
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	38	1	X	
		2		X
		3	X	
		4	X	
		5		X
		6	X	
		7	X	
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	39	1		X
		2		X
		3	X	
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8	X	
		9		X
		1		
		2		
		3		

		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	80	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	81	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	82	1		X
		2		X
		3	X	
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	83	1	X	
		2	X	
		3	X	
		4	X	
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	84	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
		1	X	
		2	X	
		3	X	

REFUGIO (Delta Opal)	40	4	Semillas Inmaduras	
		5		
		6		
		7		
		8		
		9		
REFUGIO (Delta Opal)	41	1		X
		2	X	
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8	X	
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	42	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	43	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8		X
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	44	1	Semillas inmaduras	
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
		8		
		9		
CV	45	1		X
		2		X
		3		X
		4	X	
		5		X
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9		X

REFUGIO (Delta Opal)	85	4	X	
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	86	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	87	1	X	
		2	X	
		3	X	
		4	X	
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	88	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	89	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9	X	
As	90	1		X
As	91	1		X
As	92	1		X
As	93	1		X

CV: Convencional.

Anexo 9. Cuantificación DNA extraído de hoja.

#	Identificación de la muestra	Concentración DNA (ng/µl)	A260	A280	260/280
1	L1, M1	329,3	6,6	4,1	1,6
2	L1, M1	329,8	6,6	4,1	1,6
3	L1, M2	610,4	12,2	6,5	1,89
4	L1, M2	609,6	12,2	6,5	1,89
5	L1, M3	545,5	10,9	5,6	1,94
6	L1, M3	546	10,9	5,6	1,94
7	L1, M4	478,6	9,6	5,0	1,91
8	L1, M4	478,5	9,6	5,0	1,91
9	L1, M5	397,1	7,9	4,7	1,68
10	L1, M5	396,2	7,9	4,8	1,67
11	L1, M6	772,6	15,5	8,1	1,9
12	L1, M6	772,3	15,5	8,1	1,9
13	L1, M7	475,7	9,5	5,5	1,72
14	L1, M7	473,8	9,5	5,6	1,71
15	L1, M8	659,2	13,2	6,7	1,95
16	L1, M8	658,4	13,2	6,7	1,95
17	L1, M9	422,6	8,5	4,9	1,7
18	L1, M9	420,5	8,4	4,9	1,69
19	L2, M1	677,6	13,6	7,2	1,88
20	L2, M1	678,4	13,6	7,2	1,87
21	L2, M2	668,2	13,4	6,8	1,94
22	L2, M2	667,9	13,4	6,8	1,94
23	L2, M3	394,1	7,9	4,7	1,68
24	L2, M3	394	7,9	4,6	1,68
25	L2, M4	485,9	9,8	5,9	1,64
26	L2, M4	486	9,7	5,9	1,64
27	L2, M5	603,3	12,1	6,2	1,92
28	L2, M5	603,2	12,1	6,3	1,92
29	L2, M6	313,1	6,3	3,9	1,6
30	L2, M6	315	6,4	3,9	1,64
31	L2, M7	463,9	9,3	5,4	1,71
32	L2, M7	464,4	9,3	5,4	1,71
33	L2, M8	581,5	11,6	6,0	1,93
34	L2, M8	580,1	11,6	6,0	1,93
35	L2, M9	350,6	7,0	4,3	1,62
36	L2, M9	350	7,0	4,3	1,62
37	L5, M1	149	3,0	1,7	1,66

#	Identificación de la muestra	Concentración DNA (ng/µl)	A260	A280	260/280
279	L29, M7	128,8	1,8	1,0	1,74
280	L29, M7	127,9	1,8	1,0	1,75
281	L29, M8	132,2	1,9	1,2	1,64
282	L29, M8	130,7	1,9	1,1	1,67
283	L29, M9	384,9	6,9	3,6	1,9
284	L29, M9	385,9	7,0	3,7	1,89
285	L31, M1	527	10,5	6,2	1,7
286	L31, M1	533,1	10,6	6,3	1,7
287	L31, M2	92,7	1,1	0,6	1,88
288	L31, M2	92,3	1,1	0,6	1,89
289	L31, M3	85,3	1,1	0,7	1,68
290	L31, M3	84,9	1,1	0,7	1,65
291	L31, M4	218,4	3,2	1,7	1,83
292	L31, M4	219,2	3,1	1,8	1,83
293	L31, M5	271	4,2	2,5	1,73
294	L31, M5	270	4,2	2,4	1,74
295	L31, M6	61,2	1,2	0,8	1,61
296	L31, M6	64,3	1,3	0,7	1,91
297	L31, M7	147,2	2,2	1,1	1,98
298	L31, M7	147,8	2,2	1,1	1,97
299	L31, M8	238,6	3,6	2,0	1,79
300	L31, M8	230,6	3,4	1,9	1,79
301	L31, M9	420,5	8,4	4,3	1,95
302	L31, M9	423	8,5	4,3	1,95
303	L33, M1	167,3	2,6	1,4	1,84
304	L33, M1	163,8	2,5	1,3	1,87
305	L33, M2	72,9	1,0	0,5	1,84
306	L33, M2	73	0,9	0,5	1,84
307	L33, M3	514,1	10,2	6,0	1,69
308	L33, M3	514,1	10,2	6,1	1,69
309	L33, M4	88,3	1,0	0,6	1,7
310	L33, M4	88,1	0,9	0,6	1,69
311	L33, M5	290,9	5,8	2,9	1,99
312	L33, M5	293,3	5,9	2,9	1,99
313	L33, M6	571,7	11,4	6,8	1,68
314	L33, M6	574,6	11,4	6,9	1,68
315	L33, M7	289,7	5,8	3,1	1,89

38	L5, M1	148,3	3,0	1,8	1,67
39	L5, M2	237,8	4,8	2,9	1,64
40	L5, M2	233,4	4,7	2,9	1,64
41	L5, M3	282,1	5,6	3,3	1,73
42	L5, M3	282,2	5,6	3,3	1,73
43	L5, M4	235,8	4,7	2,7	1,7
44	L5, M4	235,8	4,7	2,8	1,7
45	L5, M5	123,1	2,5	1,5	1,62
46	L5, M5	123,2	2,5	1,5	1,62
47	L5, M6	653,3	13,1	7,5	1,74
48	L5, M6	641,8	12,8	7,8	1,64
49	L5, M7	317	6,3	3,6	1,76
50	L5, M7	315	6,3	3,5	1,76
51	L5, M8	218,8	4,4	2,6	1,69
52	L5, M8	219,2	4,4	2,6	1,67
53	L5, M9	297,1	5,9	3,6	1,67
54	L5, M9	297,9	6,0	3,5	1,72
55	L10, M1	804,7	16,1	8,9	1,79
56	L10, M1	805,6	16,1	9,0	1,79
57	L10, M2	1089,4	21,8	11,9	1,82
58	L10, M2	1088,9	21,8	11,9	1,82
59	L10, M3	437,3	8,8	5,4	1,64
60	L10, M3	436,9	8,7	5,3	1,64
61	L10, M4	414,8	8,3	4,5	1,83
62	L10, M4	415,8	8,3	4,5	1,84
63	L10, M5	524,7	10,5	6,3	1,68
64	L10, M5	525,1	10,5	6,3	1,68
65	L10, M6	1221	24,4	13,3	1,84
66	L10, M6	1218,7	24,4	13,4	1,82
67	L10, M7	378,8	7,6	4,6	1,62
68	L10, M7	379,8	7,6	4,7	1,62
69	L10, M8	339,4	6,8	4,2	1,63
70	L10, M8	338,8	6,8	4,2	1,62
71	L10, M9	445	8,9	5,5	1,63
72	L10, M9	445	8,9	5,4	1,64
73	L13, M1	325,4	6,8	4,0	1,71
74	L13, M1	326,6	6,8	4,0	1,72
75	L13, M2	427,8	8,6	5,1	1,68
76	L13, M2	427,1	8,5	5,1	1,68
77	L13, M3	401,8	8,4	4,8	1,76
78	L13, M3	401,7	8,4	4,8	1,76

316	L33, M7	295,7	5,9	3,1	1,9
317	L33, M8	428,2	8,6	5,4	1,6
318	L33, M8	391,3	7,8	4,0	1,97
319	L33, M9	135,5	1,9	1,2	1,68
320	L33, M9	135,3	1,9	1,2	1,68
321	L42, M1	438,8	8,8	5,2	1,68
322	L42, M1	439,9	8,8	5,2	1,68
323	L42, M2	391,6	7,8	4,7	1,68
324	L42, M2	401,3	8,0	4,8	1,67
325	L42, M3	173,2	2,2	1,2	1,83
326	L42, M3	173,3	2,2	1,2	1,84
327	L42, M4	538,5	10,7	6,1	1,77
328	L42, M4	541	10,8	6,1	1,76
329	L42, M5	345,9	5,7	3,2	1,76
330	L42, M5	349,1	5,8	3,3	1,76
331	L42, M6	308,7	4,9	2,6	1,86
332	L42, M6	309,7	5,0	2,7	1,85
333	L42, M7	369,4	7,4	4,6	1,62
334	L42, M7	368,8	7,4	4,6	1,62
335	L42, M8	323,7	5,2	3,2	1,67
336	L42, M8	316,8	6,4	4,0	1,61
337	L42, M9	317,4	5,2	2,9	1,79
338	L42, M9	323,2	5,2	2,9	1,78
339	L50, M1	306,5	4,9	2,6	1,84
340	L50, M1	307,1	5,0	2,6	1,84
341	L50, M2	463,2	9,3	5,3	1,72
342	L50, M2	463	9,3	5,4	1,72
343	L50, M3	346,6	5,7	3,2	1,8
344	L50, M3	346,1	5,7	3,2	1,8
345	L50, M4	466,2	9,3	5,3	1,75
346	L50, M4	467,7	9,4	5,3	1,76
347	L50, M5	474	9,4	5,4	1,75
348	L50, M5	473,1	9,4	5,4	1,75
349	L50, M6	150,2	1,8	1,0	1,82
350	L50, M6	149,8	1,8	1,0	1,79
351	L50, M7	300,5	4,8	2,6	1,88
352	L50, M7	300,4	4,8	2,6	1,87
353	L50, M8	295,8	5,9	3,6	1,63
354	L50, M8	297	5,9	3,6	1,64
355	L50, M9	735,9	14,7	7,8	1,89
356	L50, M9	713,9	14,3	7,8	1,82

79	L13, M4	402,6	8,5	5,0	1,71
80	L13, M4	404,1	8,5	5,0	1,71
81	L13, M5	328,2	7,0	4,2	1,65
82	L13, M5	327,5	7,0	4,2	1,65
83	L13, M6	396,7	7,9	4,8	1,65
84	L13, M6	396	7,9	4,8	1,65
85	L13, M7	472,2	9,4	5,8	1,61
86	L13, M7	471,9	9,4	5,9	1,61
87	L13, M8	418,5	8,4	5,0	1,66
88	L13, M8	418,5	8,4	5,0	1,66
89	L13, M9	407,3	8,2	5,0	1,63
90	L13, M9	407,7	8,2	5,0	1,63
91	L17, M1	588,4	11,8	6,6	1,76
92	L17, M1	587,4	11,8	6,7	1,76
93	L17, M2	605,5	12,1	6,2	1,96
94	L17, M2	613,8	12,3	6,2	1,97
95	L17, M3	221,4	4,7	2,5	1,87
96	L17, M3	221,6	4,7	2,5	1,87
97	L17, M4	372,5	7,8	4,6	1,68
98	L17, M4	372,8	7,8	4,6	1,68
99	L17, M5	364,3	7,3	4,4	1,66
100	L17, M5	364,1	7,3	4,4	1,66
101	L17, M6	282,6	5,7	3,3	1,72
102	L17, M6	283,7	5,7	3,3	1,72
103	L17, M7	297,7	6,0	3,4	1,76
104	L17, M7	301,3	6,0	3,4	1,77
105	L17, M8	310,4	6,2	3,4	1,79
106	L17, M8	311,1	6,2	3,5	1,8
107	L17, M9	232,1	4,6	2,8	1,67
108	L17, M9	235,7	4,7	2,8	1,68
109	L19, M1	439,2	8,8	5,0	1,74
110	L19, M1	338	8,8	5,0	1,74
111	L19, M2	226,1	3,3	2,0	1,69
112	L19, M2	226,6	3,3	2,0	1,69
113	L19, M3	492,2	9,8	5,0	1,98
114	L19, M3	495,2	9,9	5,0	1,98
115	L19, M4	289,6	4,6	2,7	1,75
116	L19, M4	288,5	4,6	2,6	1,74
117	L19, M5	224,1	3,3	2,0	1,61
118	L19, M5	219	3,2	2,0	1,63
119	L19, M6	376,2	7,5	4,7	1,6

357	L63, M1	542	10,8	5,7	1,88
358	L63, M1	538,6	10,7	5,7	1,88
359	L63, M2	369,5	7,4	4,0	1,81
360	L63, M2	371,9	7,4	4,1	1,81
361	L63, M3	303,1	6,0	3,5	1,7
362	L63, M3	303	6,0	3,5	1,7
363	L63, M4	321,1	6,4	3,9	1,66
364	L63, M4	327,8	6,6	4,0	1,66
365	L63, M5	620,9	12,4	6,8	1,82
366	L63, M5	620	12,4	6,8	1,82
367	L63, M6	183,9	2,7	1,6	1,74
368	L63, M6	182,3	2,7	1,5	1,73
369	L63, M7	319,4	6,4	3,7	1,68
370	L63, M7	321,7	6,4	3,8	1,68
371	L63, M8	459,8	9,2	5,4	1,71
372	L63, M8	460,2	9,2	5,4	1,7
373	L63, M9	283,5	5,7	3,2	1,79
374	L63, M9	289,9	5,8	3,2	1,8
375	L64, M1	504,3	10,1	5,9	1,72
376	L64, M1	573,2	11,4	6,7	1,72
377	L64, M2	116,3	1,1	0,6	1,81
378	L64, M2	118,5	1,2	0,7	1,8
379	L64, M3	334,1	6,6	4,1	1,65
380	L64, M3	323,3	6,5	3,9	1,65
381	L64, M4	382,5	7,6	4,5	1,7
382	L64, M4	383	7,6	4,5	1,69
383	L64, M5	896,4	17,9	10,0	1,8
384	L64, M5	838,5	16,8	8,5	1,98
385	L64, M6	656,6	13,1	7,3	1,81
386	L64, M6	653,2	13,1	7,3	1,79
387	L64, M7	112,8	1,5	0,8	1,68
388	L64, M7	114,5	1,5	0,9	1,65
389	L64, M8	107,4	1,4	0,8	1,83
390	L64, M8	108,5	1,4	0,8	1,79
391	L64, M9	95,3	1,2	0,7	1,71
392	L64, M9	95,4	1,2	0,7	1,73
393	L66, M1	335,3	5,5	3,1	1,74
394	L66, M1	334,7	5,5	3,1	1,74
395	L66, M2	255,3	3,9	2,3	1,71
396	L66, M2	256,1	3,9	2,3	1,73
397	L66, M3	204,6	3,3	1,9	1,76

120	L19, M6	375,8	7,5	4,7	1,6
121	L19, M7	324,2	5,3	3,0	1,78
122	L19, M7	324,7	5,3	3,0	1,77
123	L19, M8	336,3	5,5	3,0	1,85
124	L19, M8	336,5	5,5	3,0	1,84
125	L19, M9	189,9	3,1	1,6	1,86
126	L19, M9	190	3,1	1,7	1,87
127	L20, M1	501,9	10,0	5,8	1,72
128	L20, M1	501,8	10,0	5,8	1,72
129	L20, M2	437.6	8,8	4,9	1,77
130	L20, M2	436,6	8,7	4,9	1,77
131	L20; M3	309,5	6,2	3,8	1,61
132	L20; M3	309	6,2	3,8	1,61
133	L20; M4	498	10,0	5,4	1,83
134	L20; M4	497,4	10,0	5,2	1,89
135	L20; M5	267,8	5,4	3,3	1,62
136	L20; M5	268,4	5,4	3,3	1,61
137	L20; M6	228,4	3,4	1,8	1,88
138	L20; M6	228,1	3,4	1,8	1,9
139	L20; M7	220	4,4	2,4	1,85
140	L20; M7	219,5	4,4	2,4	1,86
141	L20; M8	499,6	10,0	5,6	1,78
142	L20; M8	501,3	10,0	5,6	1,78
143	L20; M9	480,6	9,6	5,3	1,79
144	L20; M9	482,2	9,7	5,4	1,78
145	L22; M2	660,4	13,2	7,1	1,85
146	L22; M2	662,5	13,3	7,1	1,86
147	L22; M3	382,2	7,7	4,5	1,68
148	L22; M3	382,4	7,7	4,6	1,68
149	L22; M4	495,8	9,9	5,8	1,72
150	L22; M4	495,1	9,9	5,8	1,72
151	L22; M5	587,3	11,8	6,7	1,76
152	L22; M5	585,4	11,7	6,6	1,77
153	L22; M6	208,5	3,0	1,8	1,61
154	L22; M6	207	3,0	1,8	1,62
155	L22; M7	305,1	4,9	2,7	1,81
156	L22; M7	305,1	4,9	2,7	1,81
157	L22; M8	76	2,1	1,2	1,73
158	L22; M8	76,5	2,1	1,2	1,73
159	L23, M1	336,7	6,7	4,1	1,67
160	L23, M1	336,8	6,7	4,1	1,66

398	L66, M3	205,1	3,3	1,9	1,76
399	L66, M4	429,2	8,6	5,2	1,66
400	L66, M4	429,1	8,5	5,1	1,66
401	L66, M5	192,9	2,7	1,5	1,77
402	L66, M5	191,6	2,6	1,5	1,77
403	L66, M6	172,8	2,2	1,3	1,74
404	L66, M6	178,9	2,4	1,4	1,77
405	L66, M7	153	2,2	1,2	1,84
406	L66, M7	153,6	2,2	1,2	1,85
407	L66, M8	640,2	12,8	7,0	1,83
408	L66, M8	645,4	12,9	7,0	1,82
409	L66, M9	333,1	5,5	3,0	1,79
410	L66, M9	335,4	5,5	3,1	1,77
411	L68; M1	259,6	4,0	2,1	1,83
412	L68; M1	258,5	4,0	2,1	1,81
413	L68; M2	145,8	2,2	1,2	1,78
414	L68; M2	145,4	2,1	1,2	1,77
415	L68; M3	560,9	11,2	6,3	1,76
416	L68; M3	560,4	11,2	6,4	1,76
417	L68; M4	522,7	10,4	6,3	1,65
418	L68; M4	523	10,4	6,3	1,65
419	L68; M5	444,7	8,9	5,5	1,63
420	L68; M5	444	8,8	5,4	1,63
421	L68; M6	124,4	1,8	1,1	1,7
422	L68; M6	124,4	1,8	1,1	1,71
423	L68; M7	168,1	2,2	1,3	1,68
424	L68; M7	166,6	2,1	1,3	1,69
425	L68; M8	269,4	4,2	2,4	1,76
426	L68; M8	271,2	4,2	2,4	1,74
427	L68; M9	186,9	3,7	1,9	1,88
428	L68; M9	416,7	8,3	4,3	1,91
429	L77; M1	559,5	11,2	6,7	1,68
430	L77; M1	558	11,2	6,6	1,69
431	L77; M2	344,2	6,8	3,5	1,99
432	L77; M2	348,1	6,9	3,5	1,99
433	L77; M3	745,1	14,9	8,1	1,83
434	L77; M3	743,4	14,9	8,2	1,83
435	L77; M4	62,4	1,3	0,7	1,66
436	L77; M4	135	1,9	1,2	1,68
437	L77; M5	255,5	3,9	2,2	1,79
438	L77; M5	258	4,0	2,3	1,77

161	L23, M2	675,9	13,5	7,5	1,81
162	L23, M2	676,4	13,5	7,5	1,81
163	L23, M3	330,3	6,6	4,1	1,62
164	L23, M3	331,5	6,6	4,1	1,62
165	L23, M4	212,6	3,1	1,6	1,87
166	L23, M4	212,5	3,1	1,6	1,87
167	L23, M5	275,9	4,3	2,3	1,89
168	L23, M5	274,4	4,3	2,3	1,9
169	L23, M6	400,7	8,0	4,7	1,71
170	L23, M6	408	8,2	4,8	1,7
171	L23, M7	169,9	2,2	1,2	1,89
172	L23, M7	170,3	2,2	1,2	1,9
173	L23, M8	806,5	16,1	8,2	1,96
174	L23, M8	803,5	16,1	8,3	1,95
175	L23, M9	178,3	2,4	1,3	1,87
176	L23, M9	177,3	2,4	1,3	1,87
177	L24, M1	481,4	9,6	5,2	1,85
178	L24, M1	482,5	9,7	5,2	1,85
179	L24, M2	265,7	5,3	3,1	1,69
180	L24, M2	266,4	5,3	3,2	1,69
181	L24, M3	346,5	5,7	3,1	1,85
182	L24, M3	348,9	5,8	3,1	1,84
183	L24, M4	133,8	1,5	0,8	1,81
184	L24, M4	131,9	1,5	0,8	1,8
185	L24, M5	217,4	3,2	1,7	1,89
186	L24, M5	217,4	3,2	1,7	1,91
187	L24, M6	763,4	15,3	8,4	1,83
188	L24, M6	766,2	15,3	8,4	1,82
189	L24, M7	469,2	9,4	5,1	1,84
190	L24, M7	468,2	9,4	5,1	1,83
191	L24, M8	442,1	8,8	5,4	1,64
192	L24, M8	442,7	8,9	5,4	1,64
193	L24, M9	346,6	6,9	3,8	1,81
194	L24, M9	346,4	6,9	3,8	1,81
195	L25, M1	427	8,5	5,0	1,74
196	L25, M1	428,6	8,6	4,9	1,74
197	L25, M2	599	12,0	6,7	1,78
198	L25, M2	598,1	12,0	6,7	1,78
199	L25, M3	114,3	1,1	0,6	1,84
200	L25, M3	114,3	1,1	0,6	1,88
201	L25, M4	236,7	4,7	2,5	1,93

439	L77; M6	253,6	3,9	2,1	1,83
440	L77; M6	252,3	3,9	2,1	1,81
441	L77; M7	233,7	3,5	2,1	1,63
442	L77; M7	234,2	3,4	2,1	1,64
443	L77; M8	524,8	10,5	6,1	1,7
444	L77; M8	525,5	10,5	6,2	1,7
445	L77; M9	380,6	7,6	4,6	1,66
446	L77; M9	380,7	7,6	4,6	1,65
447	L79; M1	330,8	5,4	3,0	1,8
448	L79; M1	330,6	5,4	3,0	1,79
449	L79; M2	1118,3	22,4	13,2	1,7
450	L79; M2	1129,8	22,6	13,2	1,71
451	L79; M3	261	4,0	2,3	1,75
452	L79; M3	256,7	3,9	2,2	1,81
453	L79; M4	408,2	8,1	5,1	1,6
454	L79; M4	467,5	8,9	5,6	1,62
455	L79; M5	293,4	4,7	2,6	1,77
456	L79; M5	293	4,7	2,6	1,78
457	L79; M9	210	3,0	1,7	1,72
458	L79; M9	210,2	3,0	1,8	1,72
459	L80; M1	204,4	2,9	1,7	1,74
460	L80; M1	205,2	2,9	1,6	1,75
461	L80; M2	74,6	1,4	0,8	1,8
462	L80; M2	75,8	1,5	0,8	1,81
463	L80; M3	416	7,1	4,0	1,78
464	L80; M3	416,9	7,1	4,0	1,77
465	L80; M4	504	10,0	5,9	1,69
466	L80; M4	506	10,1	6,0	1,7
467	L80; M5	341,5	5,6	3,2	1,76
468	L80; M5	342,2	5,6	3,2	1,76
469	L80; M6	340,9	5,6	3,3	1,73
470	L80; M6	341,3	5,6	3,3	1,73
471	L80; M7	201,7	2,8	1,8	1,62
472	L80; M7	201,6	2,8	1,8	1,63
473	L80; M8	724,9	14,5	7,2	1,99
474	L80; M8	729,1	14,5	7,3	1,99
475	L80; M9	790,8	15,8	8,4	1,87
476	L80; M9	785,4	15,7	8,9	1,77
477	L81; M1	94,7	1,1	0,6	1,7
478	L81; M1	96,8	1,2	0,7	1,66
479	L81; M2	193	2,7	1,6	1,69

202	L25, M4	238,4	4,8	2,5	1,91
203	L25, M5	159,5	2,0	1,2	1,7
204	L25, M5	159,6	2	1,2	1,69
205	L25, M6	177,1	2,4	1,2	1,92
206	L25, M6	174,2	2,3	1,2	1,93
207	L25, M7	183,2	2,5	1,4	1,76
208	L25, M7	182,4	2,5	1,4	1,76
209	L25, M8	204	2,9	1,7	1,68
210	L25, M8	203,5	2,9	1,7	1,68
211	L25, M9	90,2	1,00	0,5	1,89
212	L25, M9	90	1	0,6	1,79
213	L26, M1	995,2	19,9	10,9	1,81
214	L26, M1	928,8	18,6	9,3	1,99
215	L26, M2	545,4	11,0	6,1	1,79
216	L26, M2	540,4	10,8	6,0	1,79
217	L26, M3	429,7	8,6	4,9	1,75
218	L26, M3	429,1	8,6	4,8	1,76
219	L26, M4	702,6	14,1	8,0	1,75
220	L26, M4	698,9	14,0	8,0	1,74
221	L26, M5	431,5	8,6	4,4	1,98
222	L26, M5	431,8	8,6	4,4	1,96
223	L26, M6	548,1	11,0	6,3	1,74
224	L26, M6	543,1	10,9	6,2	1,75
225	L26, M7	187,7	2,6	1,6	1,63
226	L26, M7	186,6	2,5	1,6	1,63
227	L26, M8	179,7	2,4	1,5	1,61
228	L26, M8	180,1	2,4	1,5	1,61
229	L26, M9	223,3	3,3	1,9	1,72
230	L26, M9	223,1	3,3	1,9	1,7
231	L27, M1	336,8	5,5	3,1	1,79
232	L27, M1	338,3	5,6	3,1	1,79
233	L27, M2	492,3	9,9	6,0	1,64
234	L27, M2	491,3	9,8	6,0	1,64
235	L27, M3	367	6,2	3,4	1,79
236	L27, M3	367,2	6,2	3,4	1,79
237	L27, M4	394,8	7,9	4,8	1,64
238	L27, M4	398,2	8,0	4,9	1,64
239	L27, M5	141,8	1,6	0,9	1,66
240	L27, M5	142,4	1,7	0,9	1,67
241	L27, M6	480,6	9,6	5,7	1,69
242	L27, M6	480,1	9,6	5,7	1,67

480	L81; M2	193,5	2,7	1,5	1,68
481	L81; M3	241,7	3,6	2,0	1,82
482	L81; M3	243,1	3,6	2,0	1,83
483	L81; M4	502,6	10,0	6,1	1,64
484	L81; M4	568	11,3	6,4	1,76
485	L81; M5	189,2	2,5	1,5	1,7
486	L81; M5	191,3	2,6	1,5	1,7
487	L81; M6	134	1,9	1,1	1,81
488	L81; M6	135,1	1,9	1,0	1,8
489	L81; M7	111,6	1,4	0,9	1,72
490	L81; M7	112	1,4	0,8	1,73
491	L81; M8	104,3	1,3	0,8	1,72
492	L81; M8	104,1	1,3	0,8	1,71
493	L81; M9	240,5	3,6	2,0	1,79
494	L81; M9	243,2	3,6	2,1	1,79
495	L84; M1	154,9	2,3	1,3	1,77
496	L84; M1	156,2	2,4	1,4	1,75
497	L84; M2	265,2	4,1	2,2	1,79
498	L84; M2	263	4,1	2,2	1,79
499	L84; M3	192,3	2,6	1,6	1,68
500	L84; M3	192,4	2,7	1,6	1,67
501	L84; M4	406,4	8,1	5,0	1,61
502	L84; M4	407,1	8,1	5,1	1,61
503	L84; M5	169,3	2,1	1,4	1,62
504	L84; M5	168,6	2,2	1,4	1,62
505	L84; M6	93,2	1,2	0,6	1,98
506	L84; M6	94,4	1,2	0,6	1,92
507	L84; M7	195,5	2,7	1,7	1,64
508	L84; M7	195,5	2,7	1,6	1,65
509	L84; M8	96,2	1,1	0,6	1,88
510	L84; M8	96,6	1,1	0,6	1,85
511	L84; M9	362,9	6,1	3,3	1,81
512	L84; M9	362,9	6,1	3,4	1,81
513	L86; M1	265,4	4,1	2,3	1,76
514	L86; M1	267,6	4,1	2,4	1,77
515	L86; M2	489,2	9,8	5,9	1,65
516	L86; M2	487,3	9,8	5,9	1,65
517	L86; M3	265,5	4,1	2,4	1,69
518	L86; M3	265,4	4,1	2,5	1,68
519	L86; M4	644,2	12,9	7,4	1,74
520	L86; M4	642	12,8	7,4	1,73

243	L27, M7	169,7	2,2	1,3	1,64
244	L27, M7	170,6	2,2	1,3	1,66
245	L27, M8	255,8	3,9	2,2	1,76
246	L27, M8	258,3	4,0	2,3	1,77
247	L27, M9	202,6	2,9	1,5	1,82
248	L27, M9	202,6	2,9	1,6	1,81
249	L28, M1	889,6	17,8	9,7	1,83
250	L28, M1	890,5	17,8	9,8	1,83
251	L28, M2n	251	3,8	2,2	1,71
252	L28, M2	251,8	3,8	2,2	1,72
253	L28, M3	310,2	5,0	2,7	1,86
254	L28, M3	309,7	5,0	2,6	1,87
255	L28, M4	281,5	4,4	2,7	1,68
256	L28, M4	236,3	4,7	2,3	1,98
257	L28, M5	214	4,3	2,2	1,94
258	L28, M5	216,9	4,3	2,2	1,94
259	L28, M6	182,2	2,5	1,4	1,67
260	L28, M6	182,3	2,4	1,5	1,67
261	L28, M7	472,8	9,5	5,5	1,7
262	L28, M7	471,7	9,4	5,5	1,69
263	L28, M8	199,7	2,8	1,6	1,69
264	L28, M8	200,5	2,8	1,7	1,69
265	L28, M9	856,4	17,1	9,4	1,83
266	L28, M9	859,1	17,2	9,3	1,84
267	L29, M1	410	8,2	4,1	1,98
268	L29, M1	405,2	8,1	4,1	1,98
269	L29, M2	82,4	1,0	0,5	1,72
270	L29, M2	91,8	1,1	0,7	1,73
271	L29, M3	176,9	2,8	1,6	1,79
272	L29, M3	176,3	2,8	1,5	1,79
273	L29, M4	98,1	1,1	0,6	1,88
274	L29, M4	97,9	1,2	0,6	1,93
275	L29, M5	617,1	12,3	7,0	1,76
276	L29, M5	616,8	12,3	6,9	1,76
277	L29, M6	146,1	2,1	1,2	1,77
278	L29, M6	145,7	2,2	1,2	1,77

521	L86; M5	293,1	5,8	3,1	1,9
522	L86; M5	300,9	6,0	3,2	1,88
523	L86; M6	311,1	5,0	2,8	1,74
524	L86; M6	302,7	4,8	2,8	1,73
525	L86; M7	374,9	7,5	4,6	1,6
526	L86; M7	375,9	7,5	4,7	1,61
527	L86; M8	286	4,5	2,5	1,79
528	L86; M8	291,4	4,6	2,6	1,77
529	L86; M9	372	7,4	4,7	1,6
530	L86; M9	373,1	7,4	4,7	1,6
531	L88; M1	620,4	12,4	7,1	1,74
532	L88; M1	623,7	12,5	7,1	1,73
533	L88; M2	433	8,7	5,1	1,68
534	L88; M2	433,8	8,7	5,2	1,69
535	L88; M3	536,6	10,7	6,1	1,75
536	L88; M3	537,1	10,7	6,1	1,76
537	L88; M4	237,8	3,5	2,1	1,74
538	L88; M4	239,2	3,5	2,1	1,75
539	L88; M5	398,2	8,0	4,8	1,63
540	L88; M5	398,1	7,9	4,9	1,63
541	L88; M6	374	7,4	4,6	1,62
542	L88; M6	373,4	7,5	4,6	1,62
543	L88; M7	259,2	3,9	2,2	1,82
544	L88; M7	259,3	3,9	2,2	1,83
545	L88; M8	524,4	10,5	6,1	1,73
546	L88; M8	526,2	10,5	6,1	1,73
547	L88; M9	224	3,3	1,9	1,76
548	L88; M9	224,7	3,3	1,9	1,75
549	S90	159,3	2,0	1,2	1,62
550	S90	160,9	2,0	1,2	1,61
551	S91	198,5	2,8	1,6	1,67
552	S91	195,9	2,7	1,6	1,68
553	S92	495,7	9,9	5,7	1,71
554	S92	496,6	9,9	5,8	1,72
555	S93	221,1	3,2	1,9	1,63
556	S93	221,1	3,2	1,9	1,62

L: lote; M: muestra; S: asilvestrado.

Anexo 10. Cuantificación DNA extraído de semilla.

#	Identificación de la muestra	Concentración DNA (ng/µl)	A260	A280	260/280
1	L10; M1	77,2	1,545	0,837	1,85
2	L10; M1	76,9	1,538	0,858	1,79
3	L10; M2	83,2	1,664	0,931	1,79
4	L10; M2	83	1,66	0,93	1,79
5	L31; M1	57,1	1,142	0,651	1,76
6	L31; M1	56	1,121	0,652	1,72
7	L31; M2	49,3	0,986	0,567	1,74
8	L31; M2	49,6	0,992	0,564	1,76
9	L33; M1	34,3	0,687	0,401	1,71
10	L33; M1	35	0,7	0,412	1,7
11	L33; M2	41,8	0,836	0,473	1,77
12	L33; M2	41,9	0,838	0,481	1,74
13	L63; M1	85,8	1,716	0,97	1,77
14	L63; M1	84,5	1,69	0,95	1,78
15	L63; M2	55,8	1,117	0,631	1,77
16	L63; M2	55,2	1,104	0,615	1,8
17	L64; M1	29,9	0,598	0,338	1,77
18	L64; M1	30,3	0,605	0,347	1,74
19	L64; M2	52,1	1,042	0,636	1,64
20	L64; M2	52,6	1,052	0,631	1,67
21	L66; M1	34,6	0,693	0,397	1,74
22	L66; M1	34,5	0,69	0,4	1,73
23	L66; M2	61,1	1,222	0,68	1,8
24	L66; M2	62,2	1,244	0,695	1,79
25	L77; M1	48,8	0,975	0,602	1,62
26	L77; M1	46,4	0,928	0,563	1,65
27	L77; M2	27,2	0,544	0,322	1,69
28	L77; M2	25,6	0,512	0,296	1,73
29	L79; M1	32,2	0,644	0,363	1,77
30	L79; M1	31,7	0,634	0,367	1,73
31	L79; M2	64,7	1,294	0,723	1,79
32	L79; M2	65,1	1,302	0,723	1,8
33	L81; M1	41	0,819	0,5	1,64
34	L81; M1	42,3	0,846	0,521	1,62
35	L81; M2	32,1	0,642	0,375	1,71
36	L81; M2	32,5	0,651	0,376	1,73
37	L84; M1	31,9	0,638	0,369	1,73
38	L84; M1	33	0,66	0,387	1,71
39	L84; M2	33,4	0,669	0,382	1,75
40	L84; M2	33,6	0,673	0,394	1,71
41	L86; M1	35,5	0,71	0,438	1,62
42	L86; M1	34,2	0,684	0,42	1,63
43	L86; M2	34,8	0,697	0,435	1,6
44	L86; M2	35,3	0,705	0,429	1,64
45	L88; M1	36,6	0,731	0,418	1,75
46	L88; M1	36,7	0,733	0,433	1,7
47	L88; M2	27,6	0,552	0,313	1,77
48	L88; M2	27,1	0,542	0,31	1,75
49	S90	76,3	1,526	0,868	1,76
50	S90	74,8	1,496	0,856	1,75
51	S91	64	1,28	0,737	1,74
52	S91	63,8	1,276	0,728	1,75
53	S92	75,4	1,508	0,864	1,75
54	S92	75	1,501	0,862	1,74
55	S93	52,8	1,056	0,607	1,74
56	S93	52,5	1,05	0,592	1,77
57	BG/RR	28,4	0,568	0,316	1,8
58	BG/RR	31,2	0,623	0,35	1,78
59	DO/RR	40,9	0,817	0,44	1,86
60	DO/RR	40,9	0,818	0,456	1,79
61	NO/RR	18	0,359	0,21	1,72
62	NO/RR	18	0,361	0,206	1,75
63	FM9171	44,6	0,893	0,487	1,83
64	FM9171	46	0,92	0,511	1,8
65	M123	67,7	1	0,55	1,82
66	M123	64,6	0,999	0,555	1,8
67	M129	71,5	1,242	0,68	1,83
68	M129	70,8	1,252	0,704	1,78
69	M137	54,1	1,081	0,607	1,78
70	M137	53,8	1,075	0,596	1,8
71	DP90	19,9	0,397	0,21	1,89
72	DP90	20,5	0,41	0,218	1,89
73	100/1	76	1,52	0,863	1,76
74	100/1	75,3	1,505	0,873	1,72
75	200/1	74,7	1,493	0,844	1,77
76	200/1	74,2	1,485	0,84	1,77
77	300/1	79	1,581	0,879	1,8
78	300/1	79,5	1,591	0,899	1,77

Anexo 11. Resultados PCR con DNA extraído de hojas.

PRIMERS FIGWORT				
CULTIVO	Lote No.	Planta No.	Positivo	Negativo
CV	1	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	2	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8	X	
		9		X
CV	5	1		X
		2		X
		3	X	
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	13	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (DP90 NAL)	17	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	19	1		X
		2		X
		3		X

PRIMERS FIGWORT				
CULTIVO	Lote No.	Planta No.	Positivo	Negativo
CV	20	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	22	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	23	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	26	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	28	1	X	
		2	X	
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	31	1		X
		2		X
		3		X

		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
As	90	1		X
	91	1		X
	92	1		X
	93	1		X

		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X

PRIMERS *Cry1Ac*				
CULTIVO	Lote No.	Planta No.	Positivo	Negativo
CV	1	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8		X
		9		X
CV	2	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8	X	
		9	X	
CV	5	1		X
		2		X
		3	X	
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8		X
		9		X
CV	13	1	X	
		2		X
		3		X
		4	X	
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9		X
		1	X	
		2		X
		3		X

PRIMERS *Cry1Ac*				
CULTIVO	Lote No.	Planta No.	Positivo	Negativo
CV	31	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	33	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	42	1		X
		2		X
		3	X	
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	50	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6	X	
		7		X
		8	X	
		9	X	
		1		X
		2		X
		3		X

REFUGIO (DP90 NAL)	17	4		X
		5	X	
		6	X	
		7		X
		8		X
		9		X
CV	19	1		X
		2		X
		3		X
		4	X	
		5		X
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9	X	
CV	20	1		X
		2	X	
		3	X	
		4	X	
		5		X
		6	X	
		7		X
		8		X
		9	X	
CV	22	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
CV	23	1	X	
		2	X	
		3	X	
		4		X
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9	X	
REFUGIO (Delta Opal)	24	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8	X	
		9	X	
		1	X	
		2	X	
		3		X

REFUGIO (Delta Opal)	63	4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	64	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	66	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	68	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8	X	
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	77	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	79	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
		1	X	
		2		X
		3		X

REFUGIO (Delta Opal)	25	4		X
		5	X	
		6	X	
		7	X	
		8	X	
		9		X
CV	26	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	27	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8		X
		9	X	
CV	28	1	X	
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	29	1	X	
		2		X
		3	X	
		4		X
		5	X	
		6	X	
		7		X
		8		X
		9		X
Asilvestrado	90	1		X
	91	1		X
	92	1		X
	93	1		X

REFUGIO (Delta Opal)	80	4		X
		5		X
		6		X
		7	X	
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	81	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	84	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	86	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X
REFUGIO (Delta Opal)	88	1		X
		2		X
		3		X
		4		X
		5		X
		6		X
		7		X
		8		X
		9		X

CV: Convencional

Bibliografía

1. James C. 2009. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Ithaca, New York.

2. Heuberger S; Kirk CE; Tabashnik BE; Carrière Y. 2010. Pollen and seed mediated transgene flow in commercial cotton seed production fields. Plos One. 5(11): 1-8.

3. Beckie HJ y Hall LM. 2008. Simple to complex: Modelling crop pollen-mediated gene flow. Plant Science. 175: 615-628.

4. Llewellyn D; Tyson Ch; Constable G; Duggan B; Beale S y Steel P. 2007. Containment of regulated genetically modified cotton in the field. Agriculture Ecosystems & Environment. 121: 419-429.

5. Van Deynze A; Sundstrom FJ y Bradford KJ. 2005. Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. Crop Sci. 45: 1565-1570.

6. Zhang HB; Ping PX; Long GT; Lian WQ y Anderson TA. 2005. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Molecular Biotechnology. 31: 11-20.

7. Freire EC. 2002. Fluxo génico entre algodoeiros convencionais e transgénicos. Rev. Bras. Ol. Fibros., Campina Grande. 6(1): 471-482.

8. Shirong J. 2002. Studies on gene flow in China – A review. Biotechnology research institute. Chinese Academy of Agricultural Sciences. In: The 7th international symposium on the biosafety of genetically modified organisms. Beijing, China. 301 p.

9. Llewellyn D y Fitt G. 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. Molecular Breeding. 2: 157-166.

10. Glover J. 2002. Gene flow study: Implications for GM crop release in Australia. Bureau of Rural Sciences, Cranberra. 81 p.

11. Mallory SC y Zapiola M. 2008. Gene flow from glyphosate resistant crops. Pest Management Science. 64: 428-440.

12. Messeguer J. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73: 201-212.

13. Tian J; Liu K y Hu G. 2004. Pollination ecology and pollination system of *Impatiens reptans* (Balsaminaceae) endemic to China. Annals of Botany. 93: 167-175.

14. Carpenter JE y Gianessi LP. 2001. Agricultural biotechnology: Updated benefit estimates. National Center for Food and Agricultural Policy. Washington. 46 p.

15. Betz FS; Hammond BG; y Fuchs RL. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 32: 156-173.

16. Amand PC; Skinner DZ y Peaden RN. 2000. Risk of alfalfa transgene dissemination and scale dependent effects. Theor Appl Genet. 101: 107-114.

17. Hokanson SC; Grumet R y Hancock JF. 1997. Effect of border rows and trap/donor ratios on pollen mediated gene movement. Ecological Applications. 7(3): 1075-1081.

18. Elliott LJ; Mason DC; Wilkinson MJ; Allainguillaume J; Norris C; Matthew A y Welters R. 2004. The role of satellite image processing for national scale estimates of gene flow from genetically modified crops: rapeseed in the UK as a model. Journal of Applied Ecology. 41: 1174-1184.

19. Chilcutt ChF y Tabashnik BE. 2004. Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. PNAS. 101(20): 7526-7529.

20. Rognli OA; Nilsson NO y Nurminiemi M. 2000. Effects of distance and pollen competition on gene flow in the wind pollinated grass *Festuca pratensis* Huds. Heredity. 85: 550-560.

21. Gueritaine G; Sester M; Eber F; Chevre AM y Darmency H. 2002. Fitness of backcross six of hybrids between transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). Molecular Ecology. 11: 1419-1426.

22. Ilardi V y Barba M. 2001. Assessment of functional transgene flow in tomato fields. Molecular Breeding. 8: 311-315.

23. Rieger MA; Lamond M; Preston C; Powles SB; Roush R. 2002. Pollen mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. Science. 296(5577): 2386-2388.

24. Beckie HJ; Warwick SI; Nair H; Swartz GS. 2003. Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). Ecological Applications. 13(5): 1276-1294.

25. Burke JM y Rieseberg LH. 2003. Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. Science. 300(5623): 1250.

26. Kim ChG; Lee B; Kim DI; Park JE; Kim HJ; Park KW; Yi H; Jeong SCh; Yoon WK; Harn ChH y Kim HM. 2008. Detection of gene flow from GM to non-GM watermelon in a field trial. Journal of plant biology. 51(1): 74-77.

27. Mellon M y Rissler J. 2004. Gone to seed: Transgenic contaminants in the traditional seed supply. Union of Concerned Scientists. UCS publications. 70 p.

28. Smyth S; Khachatourians GG y Phillips P. 2002. Liabilities and economics of transgenic crops. Nature biotechnology. 20: 537-541.

29. Agrobio. 2011. Estadísticas de cultivos GM 2010. En: www.agrobio.org /index.php?option com_content&task=view&id=7350. Consulta julio de 2011.

30. Fryxell PA; Craven LA; Stewart JM. 1992. A revision of Gossypium sect. Grandicalyx (Malvaceae), including the description of six new species. Systematic Botany. 17(1): 91-114.

31. Garrido LM. 2007. Algodón (*Gossypium hirsutum* L.). Capítulo 1. 19-45 p. En: Garrido LM; Vivas SA y Orjuela RM. 2007. Búsqueda, identificación, compilación y estructuración de la información de tres especies de uso agrícola: algodón (*Gossypium hirsutum* L.), maíz (*Zea mays* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) y de sus parientes silvestres para la evaluación de riesgo por introducción, uso o liberación al ambiente de organismos vivos modificados – OVM. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá D.C., Colombia. 132 p.

32. Gómez F. 1983. Cruzamiento natural del algodón en la zona del Espinal. Informe para día de campo en algodón. ICA – Nataima.

33. Mendoza OA y Aramendiz TH. 1985. Cruzamiento natural del algodonero (*Gossypium hirsutum* L.). Revista ICA (Colombia). 20(4): 221-227.

34. Díaz JA y Montenegro TH. 2002. Estimación de la distancia a la cual el polen del algodonero (*Gossypium hirsutum* L.) es trasladado por polinizadores. Boletín Técnico Instituto Colombiano Agropecuario. Bogotá 22 p.

35. Hodson JE y Carrizosa P. (comp.). 2007. Desarrollo de capacidades para evaluación y gestión de riesgos y monitoreo de organismos genéticamente modificados (OGM). Tomo I. Resultados de proyectos específicos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 99 p.

36. Espinal CF; Martínez HJ; Pinzón RN y Barrios CA. 2005. La cadena de algodón en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Bogotá. 44 p. http:/www.agrocadenas.gov.co.

37. Brochero MF. 1995. El cultivo del algodón en Colombia y su crisis. Consideraciones para su reactivación. Produmedios. 138 p.

38. Norato FT. 2005. El algodonero. Manejo integrado del cultivo en Colombia. Módulos 1 y 3 del tutorial: El Algodonero, manejo integrado del cultivo en Colombia. Tecnimpresos, Ibagué. 216 p.

39. SIOVM (Sistema de información de organismos vivos modificados) (en línea). México, D.F.: Proyecto GEF- CIBIOGEM/CONABIO. Disponible en web: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/doctos/consulta_SIOVM.html. Consulta: Agosto de 2010.

40. Richards JS; Stanley JN y Gregg PC. 2005. Viability of cotton and canola pollen on the proboscis of *Helicoverpa armigera*: implications for spread of transgenes and pollination ecology. Ecological Entomology. 30: 327-333.

41. Espitia CM; Araméndiz TH y Cadena TJ. 2008. Correlaciones y análisis de sendero en algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en el Caribe colombiano. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 61(1): 4325-4335.

42. Conalgodón. 2010. Indicadores del cultivo del algodón en Colombia: área producción, rendimientos, número de agricultores, comercio exterior y empleo

generado 1950-2006. Fuente: Unidad de Estadística y análisis económico-Conalgodón.

43. Santos AO; Delgado RA; Argüelles J y Garramuño A. 2009. Evaluación del comportamiento del complejo *Spodoptera* con la introducción de algodón transgénico al Tolima, Colombia.

44. James C. 2010. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. ISAAA: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Ithaca, New York.

45. Cera, 2010. Safety Assessment of Bollgard Cotton Event 531 y Safety Assessment of Bollgard II Cotton Event 15985. En: http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_databas. Consulta Agosto de 2010.

46. Singh ChK; Ojha A y Kachru DN. 2007. Detection and characterization of *Cry1Ac* transgene construct in Bt cotton: Multiple polymerase chain reaction approach. Journal of AOAC international. 90(6): 1517-1525.

47. Catálogo Algodón. Valle geográfico del río Magdalena. Monsanto.

48. Zenner I; Mejía RA; Bayona MA; Álvarez JA; Saldarriaga JJ; Arévalo HA; Cortés SR; Mojica SL; Calderón ML; Díaz JL. 2008. Determinación de la concentración de la proteína *Cry1Ac* del *Bacillus thuringiensis* en plantas de algodonero transgénico. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Cargraphics S.A. 40 p.

49. Agrobio. 2010. Estadísticas de cultivos GM 2009. En: www.agrobio.org /index.php?option com_content&task=view&id=7350. Consulta abril de 2010.

50. Goggi AS; Caragea P; López SH; Westgate M; Arritt R y Clark C. 2006. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. Field Crops Research. 99: 147-157.

51. Ma BL; Subedi KD y Reid LM. 2004. Extent of cross fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. Crop Science. 44: 1273-1282.

52. Watrud LS; Lee EH; Fairbrother A; Burdick C; Reichman JR; Bollman M; Storm M; King G y Van de Water PK. 2004. Evidence for landscape level, pollen mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with *CP4 EPSPS* as a marker. PNAS. 101(40): 14533-14538.

53. Benavides MJ; Garrido LM; Orjuela RM y Vivas SA. 2007. Producto de información para la evaluación de riesgos ambientales de los organismos genéticamente modificados. Tomo I. 69-99 p. En: Hodson JE y Carrizosa PMS (comp.). Desarrollo de capacidades para evaluación y gestión de riesgos y monitoreo de organismos genéticamente modificados (OGM). Tomo I. Resultados de proyectos específicos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 99 p.

54. Ortiz GS; Ezcurra E; Schoel B; Acevedo F; Soberón J y Snow A. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, México (2003-2004). PNAS 102(35): 12338-12343.

55. Maldonado C; Álvarez EL y Castellanos J. 2007. Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D.C. Colombia. 70 p.

56. Bushra Ch; Afshan Y; Tayyab H y Riazuddin S. 1999. Mini scale genomic DNA extraction from cotton. Plant molecular biology reporter. 17: 1-7.

57. Permingeat HR; Romagnoli MV y Vallejos RH. 1998. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. Plant Molecular Biology Reporter. 16: 1-6.

58. Zhang J y Stewart J. 2000. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. The Journal of Cotton Science. 4: 193-201.

59. Katterman FRH y Shattuck VI. 1983. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. Preparative biochemistry. 13(4): 347-359.

60. Gómez MI. 2008. Extracción de DNA para especies vegetales. Corpoica. 5 p.

61. Guillemaut P y Laurence MD. 1992. Isolation of plant DNA: A fast, Inexpensive, and reliable method. Plant molecular biology reporter. 10(1): 60-65.

62. CIP. 1997. Protocolo para extracción de DNA según el método CTAB, modificado en el laboratorio de biología molecular de la subdirgeb-INIA. Pág. 36. www.inia.gob.pe.

63. Phillips MW; Astorga DC; Quirós SO. 2003. Método 2X CTAB – minipreparaciones. CATIE, Turrialba, Costa Rica. (Documento mimeografiado).

64. Murray M y Thompson W. 1980. The isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.

65. Falcón LI y Valera A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. En: Ecología Molecular. Eguiarte LE; Souza V y Aguirre X. (compiladores). INE, Semarnat, CONABIO. México, pp. 499-515.

66. Randhawa GJ; Chhabra R y Singh M. 2010. Decaplex and real –time PCR based detection of MON531 and MON15985 Bt cotton events. Journal of agricultural and food chemistry. 58(18): 9875-9881.

67. Seong HL; Jin KK y Bu YY. 2007. Detection methods for biotech cotton MON 15985 and MON 88913 by PCR. Journal of agricultural and food chemistry. 55: 3351-3357.

68. Álvarez AG. 1990. Bases técnicas para el cultivo del algodón en Colombia. Cuarta edición. Federación nacional de algodoneros. Editora Guadalupe Ltda. Bogotá-Colombia. 711 p.

69. Tolima. Disponible en web: http://www.tolima.gov.co/municipios/espinal/aspectos.html. Consulta: Julio de 2011.

70. Kenneth HR. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. En: PCR methods and applications. S185-S194 p.

71. Dabo SM; Mitchell ED y Melcher U. 1993. A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. Analytical biochemistry. 210:34-38.

72. Shaukat A; Shahid H; Shahid M; Ghulam MA y Yusuf Z. 2010. Status of Bt cotton cultivation in major growing areas of Pakistan. Pak. J. Bot. 42 (3): 1583-1594.

73. Olsen KM; Daly JC; Holt HE y Finnegan EJ. 2005. Season long variation in expression of *Cry1Ac* gene and efficacy of *Bacillus thuringiensis* toxin in transgenic cotton against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 98(3): 1007-1017.

74. Saldarriaga AJ. 2008. Determinación de la concentración de la proteína *Cry1Ac* del *Bacillus thuringiensis* en plantas del algodón transgénico *Gossypium hirsutum* L. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Agronómica. U.D.C.A. 96 p.

75. Heuberger S; Yafuso C; Degrandi HG; Tabashnik BE; Carrière Y y Dennehy TJ. 2008. Outcrossed cotton seed and adventitious *Bt* plants in Arizona refuges. Environ. Biosafety Res. 7: 87-96.

76. Chapman MA y Burke JM. 2006. Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. New Phytologist. 170: 429-443.

77. Bannert M y Stamp P. 2007. Cross pollination of maize at long distance. European Journal of Agronomy. 27: 44-51.

78. Luna SV; Figueroa JM; Baltazar BM; Gomez RL; Townsend R y Schoper JB. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. Crop Science. 41: 1551-1557.

79. Morris WF; Kareiva PM y Raymer PL. 1994. Do Barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops? Ecological Applications. 4(1): 157-165.

80. Ellstrand NC; Prentice HC; Hancock JF. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. Annual Review of Ecology and Systematics. 30: 539-563.