

**INFORME FINAL**

**CONVENIO INTERADMINISTRATIVO DE ASOCIACIÓN SUSCRITO ENTRE EL MINISTERIO DE  
AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
COLOMBIA, 2010**

**Jennifer Blanco Martínez cMSc.  
Leidy Rache Cardenal cMSc.  
Nadia Alfonso MSc.  
Alejandro Chaparro Giraldo PhD.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
BOGOTÁ  
2011**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	8
1. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA BASE DE DATOS PARA EL MONITOREO DEL FLUJO DE GENES DE CULTIVOS TRANSGÉNICOS EN COLOMBIA .....	9
1.1 Introducción .....	9
1.2 Metodología .....	9
1.3 Resultados .....	10
Búsqueda de Material Bibliográfico .....	10
Búsqueda de información empleando palabras clave .....	12
Clasificación y verificación de la información .....	13
Almacenamiento de la información .....	14
Diseño y construcción de la Base de Datos .....	14
2. ALGODÓN .....	19
2.1 EVALUACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS EN OGMs LIBERADOS AL MEDIO AMBIENTE EN EL TERRITORIO NACIONAL .....	19
2.2 PARIENTES SILVESTRES DE LOS CULTIVOS DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADOS .....	21
2.3 VARIETADES O HÍBRIDOS COMERCIALES ASOCIADOS A LOS CULTIVOS A GENÉTICAMENTE MODIFICADOS .....	21
2.4 PRUEBA PILOTO DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES. DEPARTAMENTO DEL TOLIMA .....	22
Esquema general .....	22
Identificación de las tecnologías de algodón GM liberadas en el territorio nacional .....	22
Identificación de las variedades convencionales y silvestres relacionadas al algodón GM .....	23
Recolección de las muestras en campo .....	23
Análisis de las muestras en laboratorio .....	24
Análisis de parentales .....	25
Análisis de progenie .....	27
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
Análisis de las muestras en laboratorio .....	31
Análisis de Parentales .....	33
Análisis de la progenie .....	38
2.6 PROPUESTA DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES APLICABLE A LAS TECNOLOGÍAS TRANSGÉNICAS LIBERADAS COMERCIALMENTE EN LA AGRICULTURA COLOMBIANA .....	43
Esquema general .....	43
Metodología de muestreo .....	43
Análisis de parentales .....	44
Análisis de progenie .....	44
Análisis de costos .....	45
3. MAÍZ .....	46
3.1 EVALUACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS EN OGMs LIBERADOS AL MEDIO AMBIENTE EN EL TERRITORIO NACIONAL .....	46
3.2 PARIENTES SILVESTRES DE LOS CULTIVOS DE MAÍZ GENÉTICAMENTE MODIFICADOS .....	48
3.3 RAZAS LOCALES ASOCIADAS A LOS CULTIVOS A GENÉTICAMENTE MODIFICADOS .....	48
3.4 VARIETADES O HÍBRIDOS COMERCIALES ASOCIADOS A LOS CULTIVOS A GENÉTICAMENTE MODIFICADOS .....	49
3.5 PRUEBA PILOTO DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES. DEPARTAMENTO DEL TOLIMA .....	51
Esquema general .....	51
Identificación de las tecnologías de maíz GM liberadas en el territorio nacional .....	52

Identificación de las variedades convencionales y silvestres relacionadas al algodón GM.....	52
Recolección de las muestras en campo.....	52
Análisis de las muestras en laboratorio.....	54
Análisis de parentales.....	56
Análisis de progenie.....	58
3.6 Resultados y Discusión.....	59
Análisis de parentales.....	61
Análisis de progenie.....	65
3.7 PROPUESTA DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES APLICABLE A LAS TECNOLOGÍAS TRANSGÉNICAS LIBERADAS COMERCIALMENTE EN LA AGRICULTURA COLOMBIANA .....	71
Esquema general.....	71
Metodología de muestreo .....	72
Análisis de parentales.....	73
Análisis de progenie.....	74
Desventajas de realizar el análisis a nivel de proteína .....	75
Ventajas de realizar el análisis a nivel de proteína.....	75
Análisis de costos .....	75
4. BIBLIOGRAFÍA.....	76
5. ANEXOS.....	80

## LISTA DE TABLAS

- Tabla.1. Bases de datos seleccionadas para la búsqueda de información y sus principales características.
- Tabla 2. Definición de los elementos de datos para artículos científicos y documentos de tipo legal.
- Tabla 3. Temperaturas de anillamiento ensayadas en el gradiente para PCR con diferentes primers.
- Tabla 4. Variedades de algodón GM cultivadas en el municipio de Espinal-Tolima, años 2007 - 2010 (Datos de inscripción de Agricultores, ICA, 2010 y Agronomía Remolino S.A., 2010).
- Tabla 5. Lotes convencionales y zonas refugio inscritas, muestreadas y analizadas.
- Tabla 6. Resultados pruebas Inmunostrip.
- Tabla 7. Resultados PCR a partir de ADN extraído de hojas.
- Tabla 8. Resultados PCR con ADN extraído de semillas y prueba ELISA
- Tabla 9. Parientes silvestres del maíz en Colombia y número de registros biológicos encontrados.
- Tabla 10. Creadores de variedades e híbridos de maíz introducidos en Colombia entre 1967 y 2006
- Tabla 11. Semillas de maíz disponibles en el mercado para 2011
- Tabla 12. Veredas del Valle de San Juan. Con un asterisco se señalan aquellas en las que se siembra maíz
- Tabla 13. Tecnologías de maíz GM liberados en Colombia y la estructura de sus transgenes
- Tabla 14. Secuencias y tamaño de los amplicones de los primers utilizados.
- Tabla 15. Temperaturas de anillamiento de los primers utilizados.
- Tabla 16. Tipo y número de lotes muestreados y área equivalente en hectáreas.
- Tabla 17. Resultados pruebas Inmunostrip™ para la proteína Cry1F
- Tabla 18. Número de lotes encontrados de acuerdo al número de muestras positivas para amplificación del primer 35S CaMV y/o Nos para cada una de las categorías
- Tabla 19. Resultados de la PCR para las extracciones de ADN de semillas.
- Tabla 20. Resultados de la prueba ELISA en semillas.
- Tabla 21. Comparación de los resultados obtenidos por PCR y por ELISA en semillas

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Identificación y Selección de los Elementos de datos para la Base de Datos en Access 2007.
- Figura. 2. Elección de claves principales
- Figura 3. Visualización de la ficha bibliográfica de documentos tipo artículo científico.
- Figura 4. Visualización de la ficha bibliográfica de documentos tipo legislativo.
- Figura 5. Número de hectáreas sembradas de algodón GM en Colombia. Fuente: Agrobio (29).
- Figura 6. Esquema zona de muestreo en lotes sembrados con algodón GM que expresan genes *Cry*.
- Figura 7. Distribución puntos de muestreo.
- Figura 8. Procedimiento para aplicar las pruebas Inmunostrip.
- Figura 9. Especie asilvestrada. Árboles de algodón muestreados.
- Figura 10. Ubicación de los puntos de muestreo.
- Figura 11. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de semillas de variedades convencionales.
- Figura 12. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de semillas.
- Figura 13. Resultados prueba inmunostrip.
- Figura 14. Hojas de algodón inadecuadas para realizar extracción de ADN.
- Figura 15. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de hojas.
- Figura 16. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de semillas utilizando primers para Figwort
- Figura 17. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de semillas utilizando primers para *Cry1Ac*.
- Figura 18. Resultados prueba ELISA
- Figura 19. Número de hectáreas sembradas de maíz GM em Colombia. Fuente: Agrobio (2011)
- Figura 20. Ubicación del Valle de San Juan en el departamento del Tolima.
- Figura 21. Esquema de un lote de maíz transgénico indicando la ubicación de la zona buffer y la zona refugio
- Figura 22. Esquema de colecta de muestras en cada lote.

Figura 23. Procedimiento seguido para utilizar las pruebas Inmunostrip™ para la detección de la proteína Cry1F en hojas de plantas madre.

Figura 24. Ubicación de los puntos de muestreo.

Figura 25. Resultados pruebas Inmunostrip™ para la proteína Cry1F.

Figura 26. Extracciones de DNA para los 9 individuos de los lotes 12 (superior) y 15 (inferior).

Figura 27. Amplicones obtenidos con las PCR a partir de ADN extraído de hojas.

Figura 28. Izquierda. Imagen de una mazorca de la raza local clavo con efecto Xenia. Centro. Mezcla de granos con la presencia de un grano amarillo. Derecha. Colores de grano encontrados en las mazorcas de la raza local clavo.

Figura 29. Amplicones obtenidos con las PCR a partir de ADN extraído de hojas.

Figura 30. Prueba de ELISA realizada en semillas.

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Listado de resoluciones sobre tecnologías en algodón GM liberadas al medio ambiente en el territorio nacional ([www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).
- Anexo 2. Resumen de la situación actual en cultivos de algodón genéticamente modificados liberados en Colombia.
- Anexo 3. Variedades de algodón cultivadas en Colombia, años 1918- 2010 (Norato, 2005, Brochero, 1995, Álvarez, 1990, Garrido, 2007).
- Anexo 4. Registros biológicos de parientes silvestres que se encuentran en Colombia (Garrido, 2007, 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)
- Anexo 5. Protocolo de extracción de ADN de hojas (Phillips *et al.*, 2003; Falcón y Valera, 2007.)
- Anexo 6. Protocolo kit PathoScreen (DAS) ELISA para detectar Cry1Ab-1Ac en plantas.
- Anexo 7. Formato colecta de muestras en campo.
- Anexo 8. Resultados pruebas inmunostrip para identificar la proteína *Cry1Ac*.
- Anexo 9. Cuantificación ADN extraído de hoja.
- Anexo 7. Listado de resoluciones sobre tecnologías en maíz GM liberadas al medio ambiente en el territorio nacional ([www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).
- Anexo 8. Resumen de la situación actual en cultivos de maíz genéticamente modificados liberados en Colombia.
- Anexo 9. Razas locales de maíz en Colombia y su distribución.
- Anexo 10. Formato de colecta de muestras en campo
- Anexo 11. Protocolo de extracción de ADN en hojas de maíz. Tomado y modificado a partir de Phillips *et al.* (2003)
- Anexo 12. Protocolo de extracción de ADN en semilla de maíz. Kit DNeasy Plant Maxi de Qiagen
- Anexo 13. Resultados de la PCR realizada sobre las extracciones de hoja de los 9 individuos de los 38 lotes negativos para Inmunostrip.

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el CONVENIO INTERADMINISTRATIVO DE ASOCIACIÓN SUSCRITO ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, la entidad ejecutora debe presentar un informe final, con los siguientes elementos:

1. Informe contable y financiero final consolidado que incluye la ejecución de los recursos aportados por el MAVDT con los respectivos soportes.
2. Diseño y construcción de una base de datos para el monitoreo del flujo de genes de cultivos transgénicos en Colombia.
3. Documentación de evaluación de las tecnologías en OGMs liberados al medio ambiente en el territorio nacional.
4. La revisión bibliográfica de las variedades locales, silvestres o mejoradas no transgénicas asociadas a los cultivos genéticamente modificados –GM, en las regiones del país en donde se han realizado liberaciones al medio ambiente de OGMs (Departamentos de Córdoba, Tolima, Huila, Valle y Meta).
5. El desarrollo de una prueba piloto de monitoreo del flujo vertical de genes para las tecnologías transgénicas liberadas comercialmente en el Departamento del Tolima.
6. Paralelamente con la relación de esta prueba piloto, se esperan estandarizar actividades de recolección, manipulación y manejo de muestras en campo y análisis de laboratorio.
7. Propuesta de monitoreo del flujo de genes aplicable a las tecnologías transgénicas liberadas comercialmente en la agricultura colombiana, el diseño mínimo para el monitoreo y seguimiento de las liberaciones efectuadas en las condiciones del país, de acuerdo con las experiencia previa (prueba piloto) y la revisión de literatura universal.

Estos asuntos, son los que se presentan a continuación. Este informe está acompañado de un CD que contiene el informe en formato electrónico.

# 1. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA BASE DE DATOS PARA EL MONITOREO DEL FLUJO DE GENES DE CULTIVOS TRANSGÉNICOS EN COLOMBIA

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Debido a la necesidad que tenían los investigadores de realizar consultas bibliográficas de forma ordenada, efectiva y que les permitiera optimizar su tiempo, se planteó dentro del marco del proyecto de investigación "Desarrollo de un modelo de flujo de genes para el seguimiento y monitoreo de organismos genéticamente modificados liberados en el departamento del Tolima", la construcción de una base de datos especializada en temas de introgresión, hibridación y flujo de genes en cultivos de maíz y algodón. En esta base reposará información de carácter científico, cuya consulta sea fácil, clara y detallada.

Un sin número de software y paquetes tecnológicos han sido implementados para solucionar las dificultades generadas en el manejo de información. Estas soluciones técnicas para el manejo de datos varían significativamente en términos de costos, implementación de requerimientos, flexibilidad y un nivel de soporte al usuario (Donnelly et al., 2010). Por tal motivo, el grupo de investigación de Ingeniería Genética de Plantas – IGP, seleccionó Access 2007, del sistema operativo de Windows, como una herramienta para generar la Base de datos.

Se llevó a cabo la selección de esta herramienta debido a que es un sistema gestor de bases de datos relacionales. Dentro de las características funcionales al implementar la base de datos con este programa se incluyen un soporte controlado del vocabulario contenido dentro de la base, igualmente del vocabulario que ingresa, reducción de la redundancia de la información, consulta y reporte de datos rápida y precisa (Donnelly et al., 2010). La arquitectura de esta herramienta permite adicionalmente una nueva aplicación que versiones anteriores de Access no tenían, la cual consiste en adjuntar archivos a las tablas diseñadas.

## 1.2 METODOLOGÍA

La metodología empleada para el diseño y construcción de la base de datos puede ser organizada en dos etapas. La primera consta de la búsqueda del material bibliográfico. En esta etapa del desarrollo metodológico se emplearon herramientas electrónicas y medios físicos como internet, CDs, libros (electrónicos y en medio físico), los cuales reposaban en bibliotecas públicas o privadas, permitiendo de este modo acceder a la información. La metodología de búsqueda propuesta consta de:

- Selección de bases de datos que contengan información de carácter científico relacionada con cultivos transgénicos y en particular cultivos de maíz y algodón transgénico.
- Búsqueda de información en las bases de datos seleccionadas por medio de palabras clave que permitan hacer la exploración en un área de información focalizada.
- Clasificación de la información obtenida y caracterización del tipo de documentos.
- Verificación del tipo de literatura obtenida y selección exclusiva de revistas y documentos indexados.
- Almacenamiento de la información.

La segunda etapa metodológica consta de los procesos de diseño y construcción de los contenidos y estructura general de la base de datos. La metodología a seguir es tomada de Blanco (2009) y consta de:

- Obtener una visión general del sistema
- Realizar un análisis del sistema actual
- Definir cuáles son los elementos de datos
- Establecer relaciones de las tablas generadas
- Realizar las validaciones y salidas de los datos
- Construir los tipos de vistas o visualizaciones de los datos
- Ejecutar protocolos de prueba y revisión de la información y su respectiva visualización

### 1.3 RESULTADOS

#### Búsqueda de Material Bibliográfico

**Selección de Bases de datos.** Las bases de datos identificadas para realizar la búsqueda de documentos científicos fueron seleccionadas por medio de una exhaustiva exploración en la red y por conocimientos previos sobre este tema con el que contaba el grupo de investigación, ya que previamente habían realizado búsquedas sobre cultivos transgénicos. En el grupo de bases de datos seleccionadas para la consulta se identificaron bases de carácter público y privado, a continuación serán mencionadas sus principales características y ubicación en la red (tabla 1).

La Base de Datos de Cultivos Genéticamente Modificados (GM Crop Database), antiguamente conocida como AGBIOS, es una iniciativa liderada por el Centro de Evaluación de Riesgos Medioambientales (CERA). Brinda información de plantas producidas mediante técnicas de ADN recombinante, así como de plantas con rasgos nuevos obtenidos por técnicas de mejoramiento convencional. Parte de la información referenciada en esta base de datos puede ser descargada, ya sea artículos científicos o documentos legislativos. La gran mayoría de documentos son referenciados únicamente pero lo útil de esta herramienta es que los artículos pueden ser encontrados y descargados en otro tipo de buscadores, sirviendo de referencia para las búsquedas en la red.

La Biblioteca Electrónica Científica en línea (Scientific electronic library online) - (SCIELO), cuenta con una colección de revistas científicas que abarcan todas las áreas del conocimiento. Este proyecto fue desarrollado por la Fundación de Apoyo a la Investigación del Estado de Sao Pablo (FAPESP) y del Centro Latinoamericano y del Caribe de Información de Ciencias de la Salud. En esta iniciativa participan ocho países, entre los que se encuentran Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Cuba, España, Portugal y Venezuela. La información contenida en esta página puede ser descargada en su totalidad.

La Base de datos de Sumarios ICYT, la cual hace parte del Consejo Superior de las Investigaciones Científicas de España. Contiene información referencial y bibliográfica científica relacionada con ciencia y tecnología, estas publicaciones datan desde los años setenta en España y cuenta con aproximadamente 200727 registros.

BioOne - Evolución de la investigación. Es un proyecto de colaboración a nivel mundial que está integrado por Sociedades científicas, casas editoriales y librerías relacionadas con investigación biológica, ecología y ciencias medioambientales. Contiene información referencial y bibliográfica y cuenta con más de 138 revistas asociadas a ella.

Ingentaconnect cuenta con dos tipos de documentos, unos de acceso libre y otros de acceso por suscripción. Trabaja de la mano con ocho de las 10 casas editoras más importantes a nivel mundial. Distribuye su información a más de veinticinco mil usuarios al mes y cuenta con más de treinta mil publicaciones.

UK Pubmed Central, es una iniciativa liderada por el UKPMC en compañía de la Librería Británica, la universidad de Manchester y el Instituto Bioinformático Europeo. Esta base de datos recopila la información e investigación de carácter científico del Reino Unido y cuenta con más de 28 millones de abstracts. Gran parte de la información contenida en esta página es referencial y bibliográfica, solo un pequeño porcentaje de los documentos pueden ser descargados totalmente.

**Tabla.1.** Bases de datos seleccionadas para la búsqueda de información y sus principales características.

<b>Base de datos</b>	<b>Url</b>	<b>Tipo de acceso</b>	<b>Comentarios</b>
GM Crop Database (Agbio)	<a href="http://www.ceragmc.org/?action=gm_crop_database">http://www.ceragmc.org/?action=gm_crop_database</a>	Acceso libre	Es una de las mejores bases de datos especializadas en OGM consultadas.  Únicamente permite descargar algunos artículos citados.
Scientific electronic library online (SCIELO)	<a href="http://www.scielo.cl/">http://www.scielo.cl/</a>	Acceso libre	Permite descargar información relacionada con todas las áreas del conocimiento. Compila la información de ocho países de habla hispana y portuguesa.
Bases de datos de Sumarios ICYT	<a href="http://bddoc.csic.es:8080/index.jsp">http://bddoc.csic.es:8080/index.jsp</a>	Acceso libre	Permite la consulta referencial y bibliográfica exclusivamente
BioOne	<a href="http://www.bioone.org/">http://www.bioone.org/</a>	Acceso libre	Permite la consulta referencial y bibliográfica exclusivamente
Ingentaconnect	<a href="http://www.ingentaconnect.com/">http://www.ingentaconnect.com/</a>	Acceso libre	Permite descargar el texto completo de los artículos electrónicos disponibles sin suscripción.
UK Pubmed Central	<a href="http://ukpmc.ac.uk/">http://ukpmc.ac.uk/</a>	Acceso libre	Permite la consulta referencial y descargar el texto completo de algunos artículos electrónicos
PlosOne	<a href="http://www.plosone.org/home.action">http://www.plosone.org/home.action</a>	Acceso libre	Permite descargar el texto completo de los artículos electrónicos
ARS/Publication Request	<a href="http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=210831">http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=210831</a>	Acceso libre	Permite descargar el texto completo de los artículos electrónicos y la consulta referencial y bibliográfica de libros.
The Consultative Group on International Agricultural	<a href="http://www.cgiar.org/publications/library/index.html">http://www.cgiar.org/publications/library/index.html</a>	Acceso libre	Permite descargar el texto completo de los artículos electrónicos y la consulta referencial y bibliográfica de libros.

Research- CGIAR			
Sistema Nacional de Bibliotecas de la Universidad Nacional de Colombia - SINAB	<a href="http://www.sinab.unal.edu.co/">http://www.sinab.unal.edu.co/</a>	Acceso privado	Cuenta con 82 bases de datos para ser consultadas.

Librería Publica de Ciencia – PlosOne, es una organización sin ánimo de lucro. Trabaja en conjunto con sociedades científicas y estudiantiles, así como organizaciones educativas y grupos de defensa de pacientes. Contiene ocho revistas electrónicas, las cuales abarcan todas las áreas de la ciencia y la medicina. Esta iniciativa cuenta con una licencia de libre acceso a la totalidad de su contenido, siendo una de las pioneras en este aspecto.

ARS/Publication Request, hace parte del Servicio de Investigación Agrícola, el cual está integrado al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). En este portal se reportan en gran medida las investigaciones realizadas particularmente por los investigadores de la USDA, cuentan con Magazines, publicaciones en línea, con un repositorio digital y el catalogo en línea de la biblioteca de esta institución.

Grupo Consultivo Internacional sobre Investigación Agrícola (de sus siglas en ingles –CGIAR). Esta iniciativa agrupa 15 organizaciones a nivel mundial dedicadas a la investigación para el desarrollo sostenible. Un sector de la información contenida en esta página es referencial y bibliográfica y para acceder a esta información es necesario estar afiliado a alguna de estas organizaciones o pagar por los documentos. Aunque es importante mencionar que otra parte significativa de los documentos pueden ser descargados en su totalidad.

Sistema Nacional de Bibliotecas de la Universidad Nacional de Colombia – sinab. Es una base de datos privada y cuenta dentro de sus archivos con 82 bases de datos. De las bases más consultadas para realizar este trabajo se encuentran AGORA, la cual cuenta con más de 1300 revistas relacionadas con el tema agropecuario. Permite un acceso parcial a sus publicaciones para Colombia, ya que se encuentra en una fase de periodo de prueba. Annual Reviews online, una base que ofrece acceso a 31 de los títulos que componen las tres series que son Ciencias Biomédicas, físicas y sociales. Nature.com, ofrece una colección de revistas en línea enfocadas en diferentes áreas del conocimiento.

En cuanto a la información legislativa en Colombia se realizo la búsqueda de información en el Instituto Colombiano Agropecuario – ICA (URL: <http://www.ica.gov.co/>). En este portal se encuentra un link de Normatividad, en el cual se encuentran contenidos los decretos y resoluciones relacionados con los cultivos transgénicos de maíz y algodón en Colombia.

### **Búsqueda de información empleando palabras clave**

Para realizar la búsqueda de información en cada una de las bases de datos seleccionadas, se emplearon palabras clave que permitieran facilitar y optimizar la búsqueda y el tiempo. Esta búsqueda fue organizada en primer lugar por el tipo de cultivo de interés, que en este caso era maíz y algodón. Estas palabras permitieron realizar una revisión general sobre estos cultivos y las palabras fueron utilizadas en inglés y español para ampliar el rango de búsqueda.

En segundo lugar se emplearon las siguientes palabras: Flujo de genes/ Gene flow, Introgresión/ Introgression y Hibridización/ Hybridization. Estas palabras fueron ubicadas solas y posteriormente

combinadas con el primer set de palabras para realizar la búsqueda. Esto permitió obtener una introducción y una visión general del tema, además de encontrar artículos que luego serían consignados en la base de datos, ya que la información con las palabras combinadas permitió hacer un tipo de búsqueda más restringida y específica.

En tercer lugar, al tener ya una cierta experiencia en la búsqueda de documentos y al agotar la información obtenida con el segundo set de palabras, se optó por realizar una revisión de los documentos y artículos obtenidos hasta ese momento. El objeto de este paso era recolectar palabras asociadas al tema, las cuales permitieran ampliar la búsqueda. Las palabras empleadas fueron transgenic Corn, transgenic cotton, Diversity, Bt corn, Bt cotton, Cry1Ac, Bollgard, Biosafety, Germ plasm, *Bacillus thuringiensis*, Genetic modified crop, Transgenic maize, Herbicide tolerant cotton, Herbicide tolerant Corn, Bt resistant insects, Glyphosate, CP4 EPSPS, Cry proteins, entre otras palabras utilizadas.

Es importante mencionar que las palabras sugeridas para realizar la búsqueda de información variaron de acuerdo a la base de datos consultada. Esto es debido a que con algunas palabras no se obtenía ningún tipo de información de interés. Pero en la mayoría de las bases de datos las palabras mencionadas en la parte superior funcionaron adecuadamente.

### **Clasificación y verificación de la información**

La información obtenida fue filtrada y organizada dentro de tres grandes temas: Legislación, Introgresión o Hibridación y Monitoreo. Los tipos de documentos obtenidos a través de las bases de datos eran artículos científicos, libros, capítulos de libros, decretos y resoluciones.

Un segundo filtro para la selección de la información fue la clasificación del material reportado exclusivamente por revistas indexadas. Este es un criterio importante, debido a que una publicación de carácter científico debe ser original y relevante, debe cumplir con normas metodológicas, científicas y éticas, establecidas a nivel internacional (Rojas-Revoredo, 2007).

Igualmente la revista que lo contiene debe ser avalada por un certificador de calidad a nivel local o internacional. Para tener este aval la revista debe ser calificada con indicadores establecidos por cada ente evaluador. En el caso colombiano, el ente que categoriza a las revistas es Colciencias, el cual tiene establecidos unos escalafones en los cuales las clasifica. En estos escalafones se valoran la calidad editorial, la calidad científica, la internacionalización, accesibilidad, visibilidad y el impacto de las revistas (Hirsch, J., 2005; Tejada, 2009).

A nivel internacional existen otras organizaciones encargadas de indexar los artículos científicos y documentos de interés. Dentro de las más reconocidas se encuentran Latindex, que es un sistema regional de información en línea para revistas científicas de América latina, el Caribe, España y Portugal (URL: <http://www.latindex.unam.mx/>). Science Biological Abstracts, hace parte de la empresa Thomson Reuters, la cual abarca dentro de sus productos y servicios asesorías en materia financiera, legal, salud y científica (<http://thomsonreuters.com>). AGRICOLA es un catalogo nacional que provee citas de literatura agrícola. Hace parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos – USDA, y es una de las entidades más reconocidas en el tema en ese país (<http://agricola.nal.usda.gov/>).

Algunas de las de las revistas indexadas más consultadas para la búsqueda de información fueron Environmental Biosafety Research American Society for Microbiology, Entomological Society of America, The Cotton Foundation. En esta etapa fueron descartados más de cien documentos que no cumplían con estas características, denominados literatura gris.

## **Almacenamiento de la información**

Para almacenar los archivos se realizaron dos pasos. El primero de ellos fue recopilar la información de cada documento (artículo científico, documento legislativo, capítulo de libro, etc.) en formato PDF y un archivo de texto donde quedara consignada toda la información pertinente al documento como la dirección electrónica, la base de datos en donde fue consultada, la revista, etc.

El segundo paso se ejecutó al terminar el diseño de la base de datos en Access 2007. Proceso que fue desarrollado teniendo en cuenta la información recopilada y almacenada previamente, la cual permitió alimentar esta nueva fuente.

## **Diseño y construcción de la Base de Datos**

En esta etapa del proceso, el grupo de investigación seleccionó la herramienta Access 2007. Para generar la base de datos fue necesario en primer lugar planear su estructura, teniendo en cuenta los requerimientos del grupo de investigación. Esta fase se realizó dando respuestas a las siguientes preguntas ¿Que quiere la gente?, ¿Que información le parece más útil?, ¿Cuales patrones de búsqueda emplear?, tipo de letra y colores de los formatos entre otras características. Todas estas inquietudes fueron socializadas en reuniones llevadas a cabo por los integrantes del grupo, donde fueron debatidas y posteriormente se eligieron unos ítems por común acuerdo.

Luego de ser respondidas esas preguntas era necesario identificar que información y documentos relacionados con el tema tenía el grupo de investigación. Lo que se encontró después de consultar a los integrantes fue que cada integrante contaba con documentos (artículos, resoluciones, etc) almacenados como archivos personales, dentro de sus computadoras o en CD. Igualmente existía un repositorio virtual, generado por ellos en donde se tenía almacenada información de tipo legal y documentos de tipo científico, los cuales posteriormente serían anexados a la base de datos.

Así mismo, se realizó una revisión en línea de bases de datos generales y relacionadas con este tema en particular, que sirvieran de guía en cuanto a organización del interfaz y también en la obtención de documentos o referencias que permitieran continuar la búsqueda (Wang. et al, 2007; Maier. et al, 2008; Pathak. et al, 2009; Milisavljevic. et al, 2010). Lo que se encontró fue una base de datos relacional para el monitoreo de plantas transgénicas, la cual fue diseñada para realizar almacenamiento, monitoreo y análisis de datos generados en experimentos de cultivo de tejidos y transformación de plantas (Scott, et al. 2003). Otra base de datos que se identificó, recopilaba información sobre los métodos de detección de Organismos Genéticamente Modificados. Esta base incluye información básica, información de transformación y métodos de detección claramente clasificados (Dong, et al. 2008). Adicionalmente, se identificó la Base de Datos de Cultivos Genéticamente Modificados, la cual brinda información de plantas producidas mediante técnicas de ADN recombinante.

Posteriormente, se desarrolló un modelo de lo que debería tener cada tabla de la base de datos, teniendo en cuenta los términos de consenso del grupo de investigación, así como lo observado en las otras bases de datos consultadas. Este proceso permitió definir las características de los contenedores de los datos. Los nombres de los campos empleados para los libros y los artículos científicos son diferentes a los documentos de tipo legal (tabla 2 y figura 1).

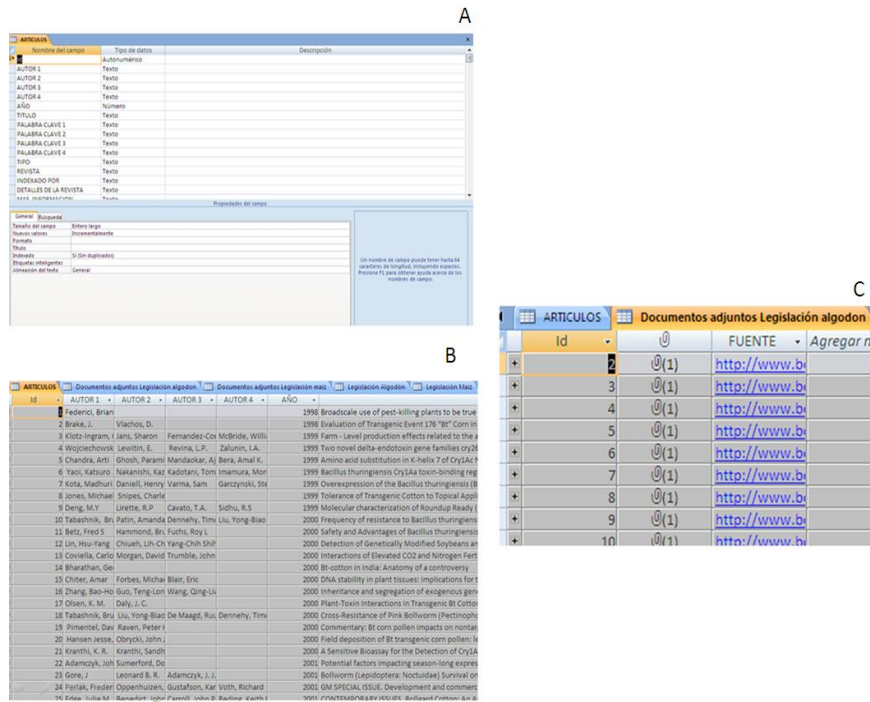
El campo de identificación tanto en los artículos como en los documentos legislativos está caracterizado por ser autonumérico, consecutivo y único para cada uno de los documentos contenidos en la base de datos. Este campo es muy importante debido a que va a ser designado como clave principal de cada una de las tablas diseñadas. Posteriormente, cada una de las claves principales de las tablas permitirá establecer las relaciones, entre las mismas (Figura 2). Este tipo de

relaciones permite que la búsqueda en esta base de datos sea mucho más ágil y la interfaz de los datos se visualizará de forma ordenada, similar a una tabla dinámica de datos.

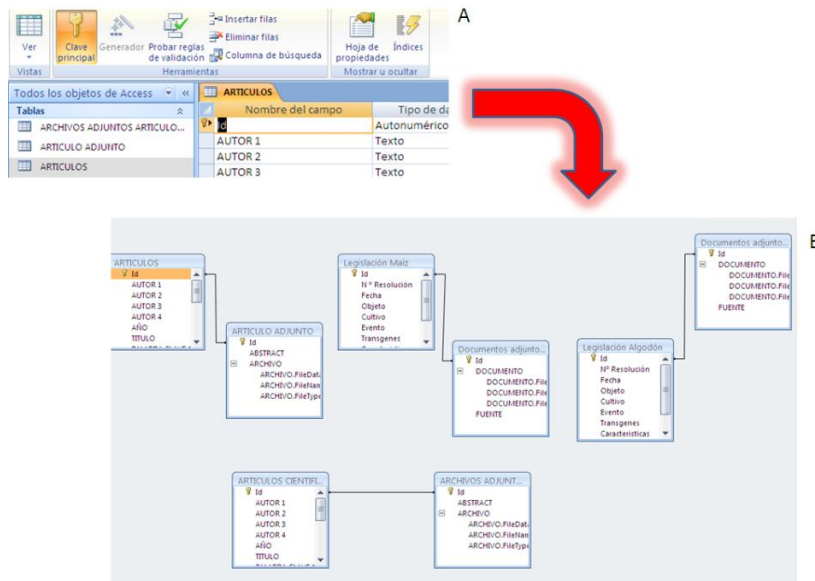
**Tabla 2.** Definición de los elementos de datos para artículos científicos y documentos de tipo legal.

<b>Artículos</b>	<b>Documentos legales</b>
Id	Id
Tipo	Nº Resolución
Titulo	Fecha
Autor 1	Cultivo
Autor 2	Evento
Autor 3	Transgene
Autor 4	Región
Abstract	Compañía
Palabra clave 1	Objeto
Palabra clave 2	Características
Palabra clave 3	Documento
Palabra clave 4	Fuente
Archivo	
Fuente	

**Figura 1.** Identificación y Selección de los Elementos de datos para la Base de Datos en Access 2007. A. Definición de características de los contenedores. B. Elementos de datos para Artículos científicos. C. Elementos de datos caracterizados por presentar contenedores que permiten adjuntar información.



**Figura. 2.** Elección de claves principales. (A) y establecimiento de relaciones entre tablas (B).



Una de las múltiples ventajas de utilizar Access, es que le permite al usuario crear una tarjeta parecida a una ficha bibliográfica, derivada de la base de datos. La información depositada en cada ficha fue caracterizada de acuerdo al tipo de documento que se estuviera consignando en ella, ya que este material podría ser un libro, un artículo científico o documento legislativo (Figura 3 y 4).

**Figura 3.** Visualización de la ficha bibliográfica de documentos tipo artículo científico.

**ARTICULOS**

Id

TIPO: Artículo Científico

TÍTULO  
Broadscale use of pest-killing plants to be true test

AUTOR<sub>1</sub> AUTOR<sub>2</sub> AUTOR<sub>3</sub> AUTOR<sub>4</sub>  
Federici, Brian A.

ABSTRACT  
More than 10 million acres of transgenic insect-resistant crops, including cotton, corn and potatoes, were planted in the United States in 1998 - and growers are on the verge of much more extensive plantings. Genetically engineered to produce insecticidal proteins of the bacterium *Bacillus thuringiensis*, these plants provide effective, environmentally safe pest control. However, current transgenic crops may lead to insect resistance, partly because they have been engineered to produce only single Bt insecticidal proteins, and partly because plant senescence can result in lower production of Bt proteins as crop plants age. Australia cotton growers, for instance, found they had good control for the first half of the season in 1997, but required insecticide treatments in the latter half. Resistance avoidance strategies and crop varieties in the pipeline that produce two or more insecticidal proteins are planned to provide long-term resistance management. This is crucial not only to growers using the transformed crops, but to organic growers who rely on traditional Bt insecticides. If successful, this new technology promises high crop yields as well as benefits to most nontarget arthropods and biological control insects by reducing the use

PALABRA CLAVE<sub>1</sub> PALABRA CLAVE<sub>2</sub> PALABRA CLAVE<sub>3</sub> PALABRA CLAVE<sub>4</sub>  
Bt corn CryIAC Bollgard Pest

REVISTA: California Agriculture    MAS INFORMACION: Volume 52, Number 6, pp. 14-20 November-December,    AÑO: 1998  
University of California

ABORTIVO

DIRECCION:  
<http://www.ucdavis.edu/files/repository/files/Cal206p14-4798.pdf>

**Figura 4.** Visualización de la ficha bibliográfica de documentos tipo legislativo.

**Legislacion Algodon**

Id

Nº Resolución: 000358

Fecha: Febrero 13 de 2007

Cultivo: Bollgard y Roundup Ready®

Evento: MON 531 x MON 1445

Transgenes: CryIAC / CP4EPSPS

Región: Alto Magdalena y Valle del Cauca

Compañía: Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cia. S.C.A.

Objeto: Se autorizan siembras comerciales de algodón con la tecnología Roundup Ready® y Bollgard.

Características: Tolerancia al glifosato, Resistencia a insectos lepidópteros

DOCUMENTO

FUENTE: [http://www.bch.org.co/bioseguridad/admon/archivos/leyes/Final\\_0311.p](http://www.bch.org.co/bioseguridad/admon/archivos/leyes/Final_0311.p)

Posterior a este diseño se empezaron a validar y evaluar las salidas generadas por la base de datos, de los archivos almacenados en el sistema. Actualmente la base de datos se encuentra alimentada con un total de 315 documentos. Este número total está dividido en 212 artículos científicos, de los

cuales 123 son de Maíz y 89 son de Algodón. Hay depositados también 96 documentos de tipo legislativo y referenciados 7 libros.

En este momento se está diseñando la interfaz de visualización de los datos, ya que Access 2007 permite obtener un tipo de visualización similar al de una tabla dinámica. Por lo tanto se está tratando de implementar a la base diseñada otras plataformas como Panorama TM, FileMarker Pro TM, SQL, para facilitar la consulta y poder establecer unos campos específicos de búsqueda (Mckie & Webb, 1999; Boulukos & Pognonec, 2001; Masuya. et al, 2004; Leakha. et al, 2008).

Después de realizar consultas en centros de investigación científica como el Centro de Agricultura Tropical –CIAT y en páginas especializadas de libre acceso como SHERPA/RoMEO (URL: <http://www.sherpa.ac.uk/romeo/>), la cual permite consultar los permisos y acuerdos de las casas editoriales y los autores de literatura científica. Así mismo, en la mayoría de bases de datos y revistas consultadas, citan términos y acuerdos de Copyright, en los cuales penalizan el almacenamiento de documentos a bases de datos electrónicas. Por lo tanto se plantea diseñar la base de datos en Access 2007 con la referencia bibliográfica únicamente y desmontar los archivos adjuntos.

Esta Base de datos va a estar a la disposición de los interesados, pero para mayor difusión se plantea diseñar y programar una página electrónica empleando herramientas como Frontpage, Javascript entre otros, en la cual se encuentren depositados las referencias bibliográficas y los vínculos para acceder a esta información. Igualmente serán identificados cuales documentos son de acceso público y cuales privado, para facilitar la búsqueda.

La información completa de la base de datos realizada se encuentra en el siguiente link:  
<http://www.palimpalem.com/6/bdflijodegenesogm/index.html>

## 2. ALGODÓN

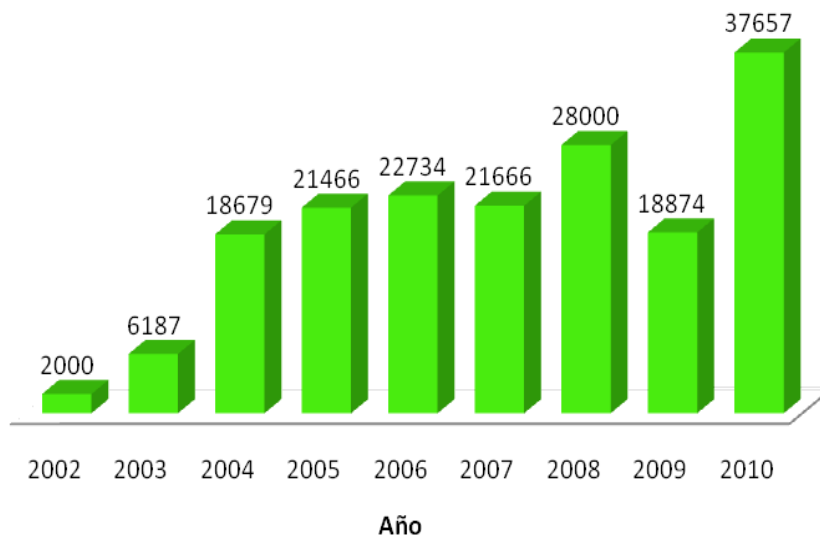
### 2.1 EVALUACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS EN OGMS LIBERADOS AL MEDIO AMBIENTE EN EL TERRITORIO NACIONAL

En Colombia se autorizó la siembra comercial de algodón genéticamente modificado desde el año 2003 y hasta el 2010 se han liberado 6 tecnologías de algodón para siembra comercial que corresponden a las tecnologías: Bollgard que fue 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, autorizada para siembras comerciales desde el año 2004 en el Caribe húmedo y seco colombiano y en el 2007 en el Alto Magdalena y Valle del Cauca. Bollgard II/ Roundup Ready Flex, 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, autorizada para siembras comerciales desde el año 2007 en el Alto Magdalena, Valle del Cauca, Caribe húmedo y seco y Orinoquía colombiana. LI cotton, autorizada para siembras comerciales desde el año 2010 en el Caribe húmedo. Roundup Ready Flex, 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. Se ha liberado algodón resistente a insectos lepidópteros, que contiene el gen *Cry1Ac*, y algodón que contiene los genes *Cry1Ac* y *Cry2Ab*, algodón tolerante al herbicida Roundup Ready que contiene el gen CP4 EPSPS, algodón tolerante al herbicida glufosinato de amonio que contiene el gen PAT y eventos combinados que expresan los genes *Cry1Ac*, *Cry2Ab* y CP4 EPSPS (anexo 1 y 2).

Respecto a adopción de las tecnologías transgénicas de algodón que se han liberado, Colombia ha seguido las tendencias mundiales, inicialmente adoptó la tecnología que contiene un solo gen, y luego adoptó la tecnología con eventos apilados obtenidos por hibridación convencional a partir de líneas transformadas. Además ha aumentado el área de cultivo, para el año 2002 se cultivaron 2000 ha con semillas de algodón genéticamente modificado, hasta el 2008 aumentó el área de cultivo hasta 28000 ha, mientras que para el 2009 disminuyó a 18874 ha; sin embargo en el 2010 aumentó casi al doble el número de hectáreas cultivadas llegando a 37.657 ha (Agrobio. 2011, figura 5). Se cultiva algodón GM en Córdoba (10186 ha), Tolima con 4088 ha, Huila con 801 ha y Cesar con 3799 ha (Agrobio 2010).

La disminución en el área de cultivo que se presentó en el año 2009, se debió a la crisis algodонера que se presentó en el 2008. En este año los cultivadores tuvieron problemas con el cultivo de algodón transgénico que presentaba la característica doble gen (Bt/RR, resistencia a insectos y tolerancia al herbicida glifosato). La agremiación Remolino demanda a la empresa COACOL (Monsanto en Colombia) manifestando falta de seguimiento y acompañamiento durante el cultivo y cosecha de algodón con la tecnología doble gen (Bt/RR). La demanda falla a favor de los agricultores, Coacol es multado y solo hasta el año 2009 el ICA expide la resolución 682 del 24 de febrero de 2009, por medio de la cual se implementa el Plan de Manejo, Bioseguridad y Seguimiento para siembras comerciales en el país de algodones genéticamente modificados con resistencia a ciertos insectos lepidópteros y/o tolerancia a la aplicación de herbicidas. Esta resolución se expide con el objeto de extremar las medidas que permitan obtener un mejor desempeño de las semillas y reducir los riesgos de pérdidas ocasionados por mal manejo de la tecnología.

**Figura 5.** Número de hectáreas sembradas de algodón GM en Colombia. Fuente: Agrobio (2011).



En relación con la vía regulatoria, a nivel internacional inició con la adopción del Convenio sobre la Diversidad Biológica firmado por 185 países cuyo objetivo es la conservación y uso sostenible de la biodiversidad, vigente desde 1993. Este convenio tiene tres disposiciones relacionadas con “Organismos Vivos Modificados”, una de ellas generó el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad en Biotecnología adoptado por más de 130 países y entró en vigor desde el 11 de septiembre de 2003. Tal instrumento marca el compromiso de la comunidad internacional para asegurar la transferencia, manipulación y uso seguro de los OVM (Silva, 2003).

A su vez el Convenio de Diversidad Biológica facultó a los países para establecer sus propios marcos regulatorios sobre bioseguridad (UICN, 2004). En Colombia, el gobierno nacional en desarrollo de la Ley 740 de 2002, expidió el decreto 4525, y designó al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a través del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA la competencia para la autorización de movimientos transfronterizos, tránsito, manipulación y utilización de los Organismos Vivos Modificados, OVM, con fines agrícolas, pecuarios, pesqueros, plantaciones forestales comerciales y agroindustriales que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica. El artículo 19 del decreto 4525 de 2005 creó el comité Técnico Nacional de Bioseguridad, CTNBio, cuya función es, entre otras, recomendar al Gerente General del ICA la expedición de actos administrativos para la autorización de actividades solicitadas con organismos vivos modificados (Resolución 682, [www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).

El ICA como autoridad competente recibe las solicitudes para autorizar la introducción, producción y comercialización para siembra en Colombia de semillas de algodón genéticamente modificado. Una vez se evalúan las tecnologías en ensayos de bioseguridad y se establecen los riesgos, el Gerente general del ICA por recomendación del CTNBIO, del cual hacen parte los Ministerios de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial; de la Protección Social, de Agricultura y Desarrollo Rural; Colciencias y el ICA, autoriza o no las siembras comerciales de variedades de algodón genéticamente modificado en las regiones donde se evaluaron las tecnologías y establece además que deben contar con un plan de manejo, bioseguridad y seguimiento, que contenga las medidas de bioseguridad que garanticen un uso seguro de estas tecnologías basados en las pruebas de evaluación agronómica, prácticas culturales, experiencia agronómica adquirida y las recomendaciones del CTNBio (Resolución 682, [www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).

Los titulares de los cultivos de algodón genéticamente modificados están obligados a realizar actividades de capacitación y seguimiento en pretemporada y durante el cultivo (Resolución 682, www.ica.gov.co).

## **2.2 PARIENTES SILVESTRES DE LOS CULTIVOS DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**

El documento de Garrido (2007) 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. Respecto a la producción, cerca del 90% del algodón producido con fines comerciales proviene de la especie *G. hirsutum*, el 8% proviene de la especie *G. barbadense* (Espinal *et al.*, 2005 en Norato, 2005) y el 2% restante proviene de las especies *G. arboreum* y *G. herbaceum* que se encuentran en estado silvestre.

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 (Fryxell *et al.*, 1992, Zhang *et al.*, 2005). Sin embargo, Garrido (2007) reporta que el algodón tiene 20 parientes silvestres que podrían llegar a tener un cruce genético con esta especie, debido a las características genómicas que presentan en común. No obstante, establecen que en Colombia se encuentran solo tres especies: *G. arboreum*, *G. barbadense* y *G. herbaceum*. En el anexo 3, 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).

## **2.3 VARIETADES O HIBRIDOS COMERCIALES ASOCIADOS A LOS CULTIVOS A GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**

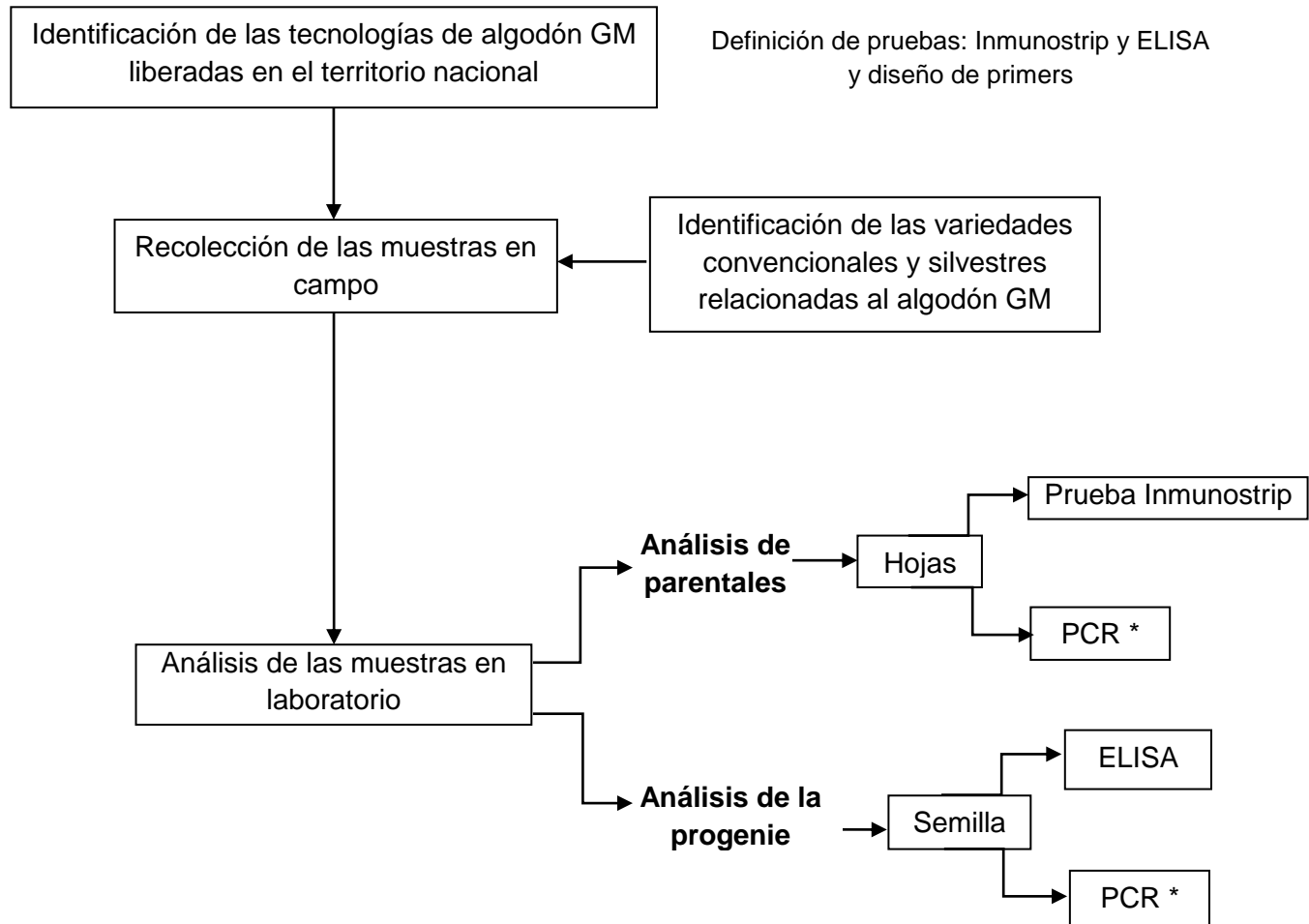
De variedades de algodón cultivadas en Colombia se encontraron reportes desde 1918 (anexo 4). Desde este año y hasta el 2010, se han cultivado aproximadamente 124 variedades de algodón (Norato, 2005, Brochero, 1995, Alvarez, 1990, Garrido, 2007), producidas por instituciones como: el ICA de la Universidad 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 (Garrido, 2007).

Desde 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 más o menos 22 variedades fueron producidas en Colombia y las demás se produjeron en otros países (anexo 4).

## 2.4 PRUEBA PILOTO DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES. DEPARTAMENTO DEL TOLIMA

### Esquema general

A continuación, se describe el esquema metodológico utilizado para hacer el monitoreo del flujo de genes de algodón transgénico a variedades convencionales y parientes silvestre de algodón en la Agronomía Remolinos en El Espinal, Departamento de Tolima.



\* Se utilizaron los primers *Cry1Ac*, *Figwort* y *FsACP*.

### Identificación de las tecnologías de algodón GM liberadas en el territorio nacional

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 (anexo 2). 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 agronomía Remolino S.A. del municipio del Espinal-Tolima; se tomaron los datos de: año de siembra y variedad/tecnología cultivada y se complementó la información consignando evento, promotor, gen y terminator. Esta información se utilizó para identificar los genes concluyentes y una vez identificados, se diseñaron los primers y se seleccionó la prueba Inmunostrip<sup>TM</sup> y ELISA a utilizar en los análisis de laboratorio.

## Identificación de las variedades convencionales y silvestres relacionadas al algodón GM

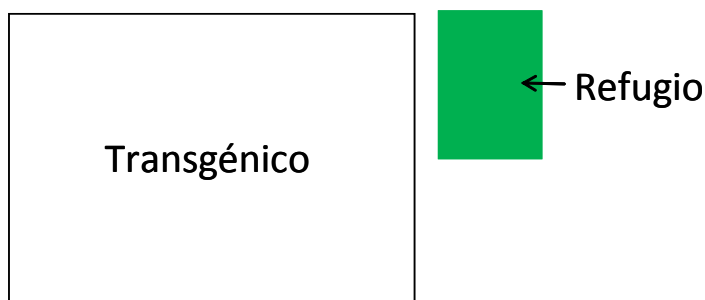
La identificación de variedades convencionales y/o especies silvestres relacionadas con algodón GM, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Benavides y colaboradores (2007); se hizo una búsqueda de variedades convencionales y de registros biológicos vía electrónica en bases de datos de herbarios nacionales, se revisaron artículos científicos, libros, informes y memorias relacionados con el cultivo de algodón en Colombia.

## Recolección de las muestras 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 6).

**Figura 6.** Esquema zona de muestreo en lotes sembrados con algodón GM que expresan genes Cry.

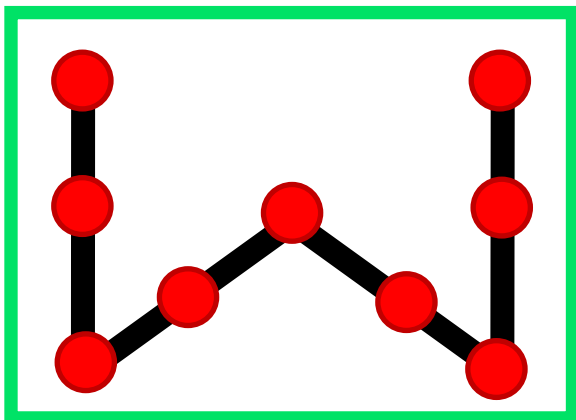


- Lotes sembrados con variedades convencionales de algodón. Se tomaron muestras en lotes cultivados con variedades convencionales.
- Zona con presencia de una especie asilvestrada de algodón. Se tomaron muestras de los árboles que se ubicaron en la zona.

Las muestras fueron manejadas siguiendo una cadena de custodia, es decir se guardaron en bolsas individuales, previamente rotuladas y con su respectiva documentación. 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 empresa.

Se tomó como modelo para el muestreo la metodología propuesta en el estudio de Ortiz y colaboradores (2005). 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 7), en cada punto se seleccionó una planta y se colectaron 4 hojas y 5 cápsulas abiertas o en proceso de apertura.

**Figura 7.** 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 (2007).

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.

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.

### **Análisis de las muestras en laboratorio**

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 ADN y PCR. Para esto se ensayaron 8 protocolos de extracción de ADN de hoja: el de Bushra *et al.*, 1999; Permingeat *et al.*, 1998, Zhang y Stewart, 2000; Katterman y Shattuck, 1983; Gómez, 2008, Guillermant y Laurence, 1992, CIP, 1997, modificado ([www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe)); Phillips *et al.*, 2003 y Murray y Thompson, 1980. Finalmente se trabajó con un protocolo combinado: Se utilizó parte del protocolo de Phillips *et al.*, 2003 y se complementó con el protocolo de limpieza propuesto por Falcón y Valera, 2007 (anexo 5). La cuantificación de ADN 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 3) y con base en los resultados se realizó PCR con cada una de las muestras, utilizando los primers reportados por Randhawa *et al.*, (2010) para amplificar el transgen *Cry1Ac* (S: GACCGCTTACAAGGAGGGATACG, y A: ACGGAGGCATAGTCAGCAGGACC, primers diseñados usando el software Primer 3 en línea, para

amplificar la secuencia promotora del virus del mosaico de Figwort (S: GTCCAAAGCCTCAACAAGGT, A:TCTTTTGTGGTCTGCTACTGC) y primers reportados por Seong *et al.*, (2007) para amplificar el gen endógeno FsACP de algodón (S: CAAACAAGAGACCGTGGATAAGGTA y A: CAAGAGAATCAGCTCCAAGATCAAG. Los primers utilizados fueron sintetizados por Invitrogen.

**Tabla 3.** Temperaturas de anillamiento ensayadas en el gradiente para PCR con diferentes primers.

	Primers		
	Cry1Ac	Figwort	FsACP
Temperaturas (°C)	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		

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador My Cycloer® 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 cebador (0,8 µM), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (2mM) y 0,125 µL de Taq DNA polimerasa (kit Fermentas de QIAGEN). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo denaturación inicial a 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos que comprendieron: denaturación a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a las temperaturas indicadas en la tabla 3, durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

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

Se realizó extracción de ADN de semillas de las variedades convencionales DP 90 Nal, Corpoica M123, M129 y M137 y con el fin de estandarizar el nivel de detección de la taq polimerasa y el tamaño de muestra a utilizar en esta fase, 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 ADN utilizando el kit DNeasy Plant maxi de Qiagen y se realizó PCR.

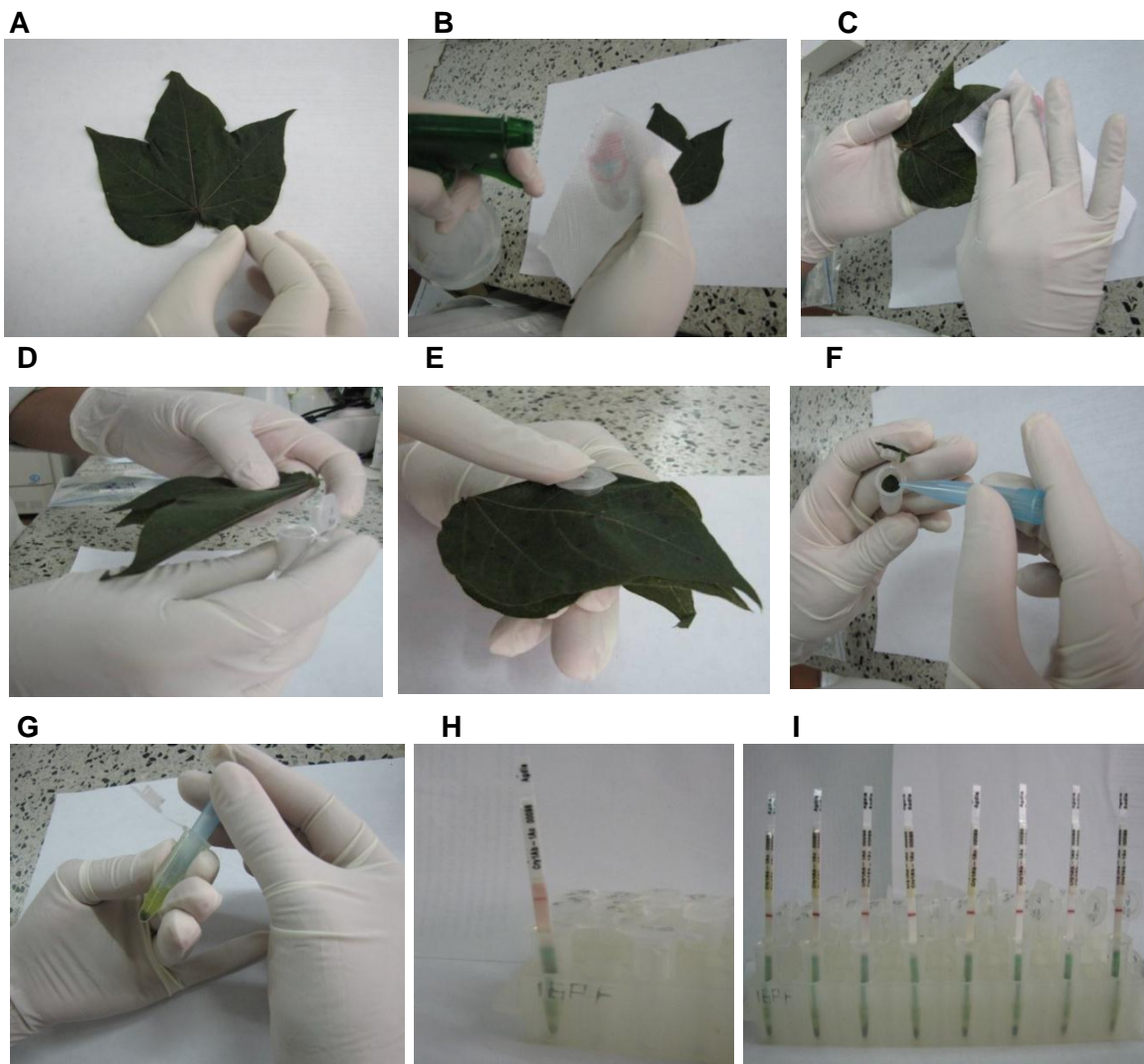
### **Análisis de parentales**

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. Se trabajó con las hojas colectadas, se realizó Inmunostrip™, extracción de ADN y PCR.

Los lotes que tuvieron parentales maternos positivos se eliminaron 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.

Sobre las hojas colectadas de cada una de las plantas, se aplicó una prueba Inmunostrip™ (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 del kit, 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 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 8). El mismo procedimiento se realizó con todas las muestras de hoja.

**Figura 8. 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. Tomar 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 ADN de hoja y PCR, se realizó utilizando las hojas de los lotes cuyas 9 muestras fueron negativas con la prueba Inmunostrip™, 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 ADN se realizó utilizando el protocolo de Phillips *et al.*, (2003) combinado con el protocolo de limpieza propuesto por Falcón y Valera, (2007) 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™ y PCR.

### **Análisis de progenie**

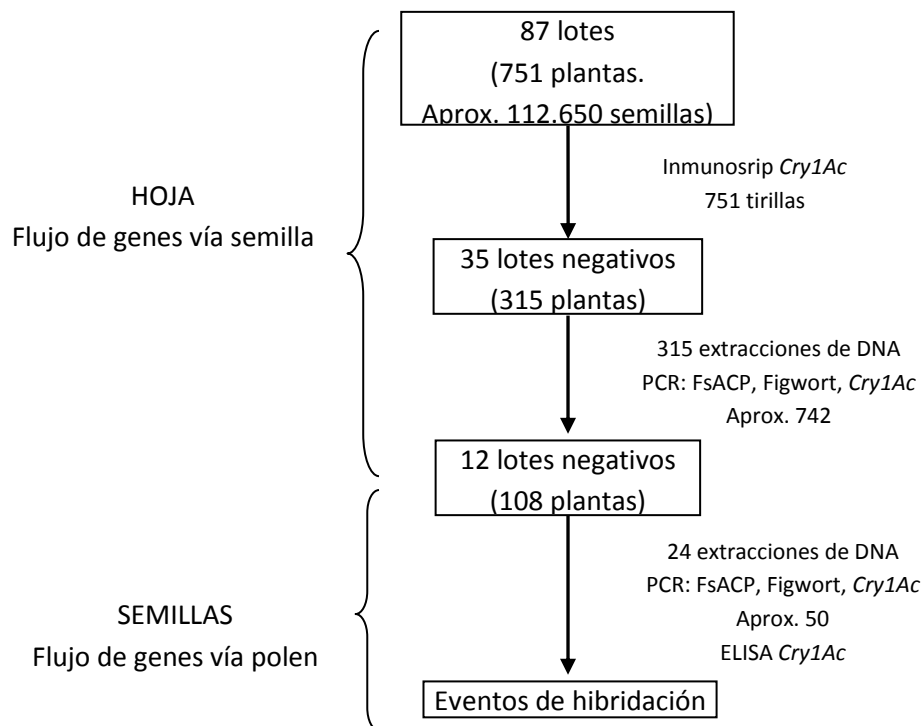
Esta fase se realizó con el fin de detectar flujo de transgenes vía polen e identificar procesos de hibridación. Se reunieron las cápsulas de cada lote correspondientes a las plantas que fueron negativas en los análisis anteriores, se extrajeron las semillas eliminando la mota manualmente y se mezclaron 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 6) 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 121°C 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.

Finalmente, a continuación se presenta un esquema en el que se resume la metodología utilizada.



## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el municipio de 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 4).

**Tabla 4.** Variedades de algodón GM cultivadas en el municipio de Espinal-Tolima, años 2007 - 2010 (Datos de inscripción de Agricultores, ICA, 2010 y Agronomía Remolino S.A., 2010).

AÑO SIEMBRA	VARIEDAD/ TECNOLOGÍA	EVENTO	PROMOTOR	GEN	TERMINADOR
2007	Nuopal/ Bollgard	MON 531	CaMV35S	<i>Cry1Ac</i>	3' poly (A)
2008	Nuopal/ Bollgard	MON 531	CaMV35S	<i>Cry1Ac</i>	3' poly (A)
	Delta Opal RR/ Roundup Ready®	MON 1445	Figwort35S	<i>CP4EPSPS</i>	T - E9
	DP 455 BG/RR/ Bollgard/ Roundup Ready®	MON 531 x MON1445	CaMV35S / Figwort35S	<i>Cry1Ac</i> / <i>CP4EPSPS</i>	3' poly (A) / T - E9
2009	Nuopal/ Bollgard	MON 531	CaMV35S	<i>Cry1Ac</i> / <i>Cry2Ab</i>	3' poly (A) / Nos
	DP 455 BG/RR/ Bollgard/ Roundup Ready®	MON 531 x MON 1445	CaMV35S / Figwort35S	<i>Cry1Ac</i> / <i>CP4EPSPS</i>	3' poly (A) / T - E9

	FM9063 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	CaMV35S / CaMV35S / Figwort35S / CaMV35S	<i>Cry1Ac / Cry2Ab</i> / <i>CP4EPSPS /</i> <i>CP4EPSPS</i>	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	<i>CP4EPSPS</i>	T - E9
2010	Nuopal/RR/ Bollgard/ Roundup Ready	MON 531 x MON 1445	CaMV35S / Figwort35S	<i>Cry1Ac /</i> <i>CP4EPSPS</i>	3` poly (A) / T - E9
	FM9162 B2F/ Bollgard II x Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	CaMV35S / CaMV35S / Figwort35S / CaMV35S	<i>Cry1Ac / Cry2Ab</i> / <i>CP4EPSPS /</i> <i>CP4EPSPS</i>	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	MON 531 x MON 1445	CaMV35S / Figwort35S	<i>Cry1Ac /</i> <i>CP4EPSPS</i>	3` poly (A) / T - E9
	DP 455 BG/RR/ Bollgard/ Roundup Ready®				

Al analizar la tabla 4, 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.

El muestreo se realizó en el municipio de El Espinal, departamento del Tolima, ubicado a 04°09'N y 74°53'O, a 323 msnm y con una temperatura que oscila entre los 27 y 40°C (Tolima, 2011). En el listado de inscripción de agricultores de la Agronomía 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 5). 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 solamente un refugio estaba cultivado con la variedad DP 90 NAL.

De 43 lotes cultivados con algodón convencional inscritos en la Agronomía Remolino, se muestrearon 31 lotes, que corresponden al 72.1% (tabla 5). Las variedades de algodón convencional cultivadas eran: DP90 NAL, Corpoica M123, Corpoica M129 y Corpoica M137.

Se ubicó una zona con presencia de una especie asilvestrada de algodón, se tomaron muestras de 4 árboles de algodón (figura 9).

En total se muestrearon 89 lotes y refugios (tabla 5) y 4 árboles de algodón. Sin embargo, para los análisis en laboratorio, se eliminaron 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 5.** Lotes convencionales y zonas refugio inscritas, muestreadas y analizadas.

ALGODÓN	Lotes inscritos en la Agronomía		Muestreados			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	

Finalmente, en laboratorio se trabajó con muestras de 56 zonas refugio (14,3%), muestras de 27 lotes cultivados con algodón convencional (62,8%) y las muestras de la especie asilvestrada (4 árboles de algodón). En total 83 lotes y refugios (tabla 5) y 4 árboles de algodón.

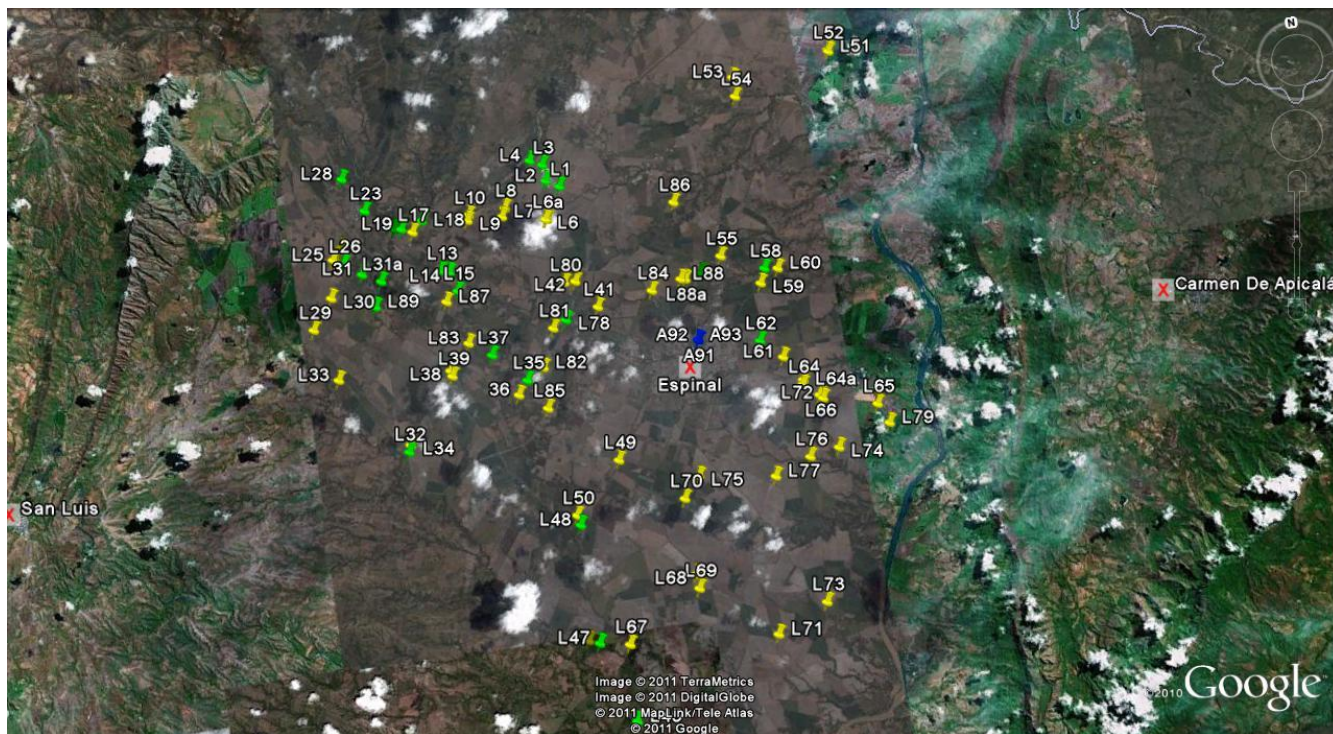
Los puntos de muestreo fueron ubicados en un mapa del municipio del Espinal utilizando google earth en línea y se utilizaron tres colores para identificar los puntos de muestreo, en color amarillo se colocaron los puntos correspondientes a zonas refugio, en color verde se ubicaron los puntos correspondientes a los lotes cultivados con variedades de algodón convencional y con color azul se identificaron los puntos correspondientes a la especie asilvestrada (figura 10).

**Figura 9.** Especie asilvestrada. Árboles de algodón muestreados.



*Colecta de las muestras en campo.* Los datos de cada lote se consignaron en el formato diseñado previamente (anexo 10). Este formato contiene la información colectada durante el muestreo. La información sobre fecha e historia de siembra del lote se registró en una libreta de campo.

**Figura 10. Ubicación de los puntos de muestreo.** A y B. Puntos de muestreo sin y con identificación del lote al que corresponden. Amarillo: representa los refugios, verde: lotes sembrados con algodón convencional y azul: especie asilvestrada.



## Análisis de las muestras en laboratorio

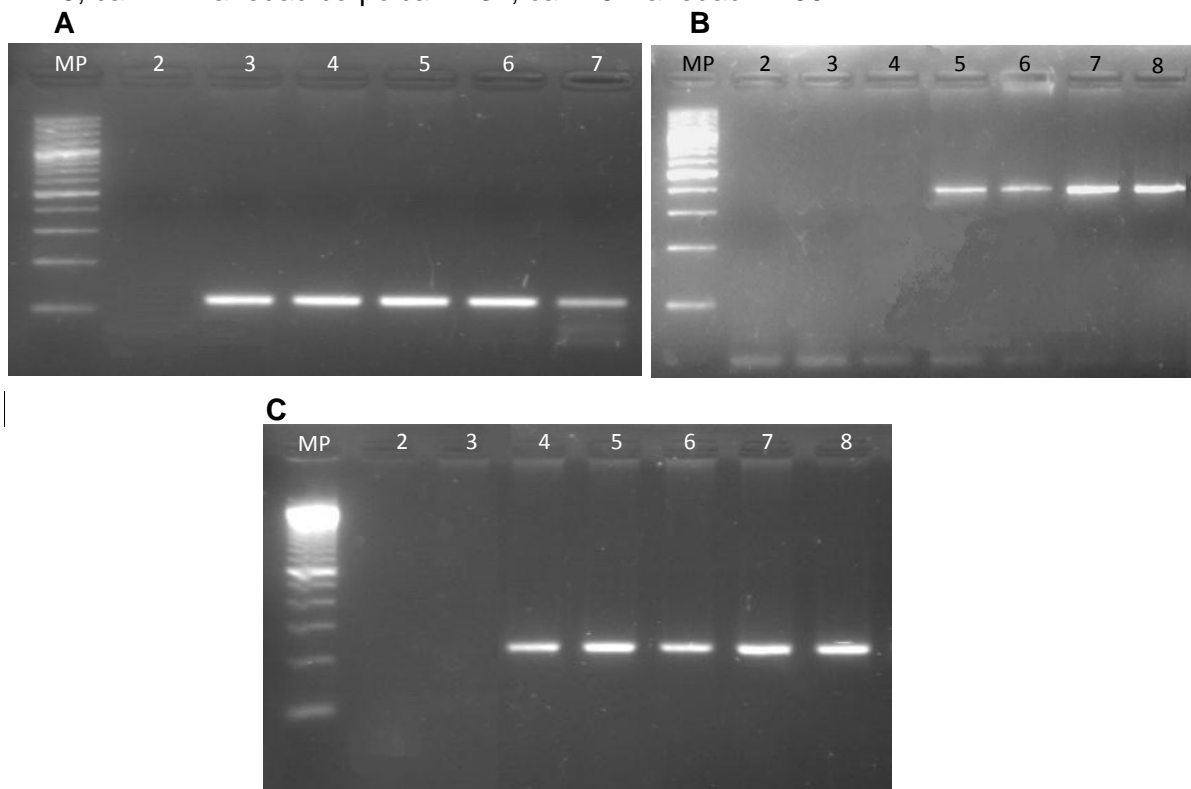
En los ensayos para validar las técnicas de extracción de ADN y PCR se encontró que al utilizar el protocolo de extracción de ADN combinado de Phillips *et al.*, (2003) y Falcón y Valera, (2007) se obtuvo ADN de buena calidad y libre de inhibidores de PCR.

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

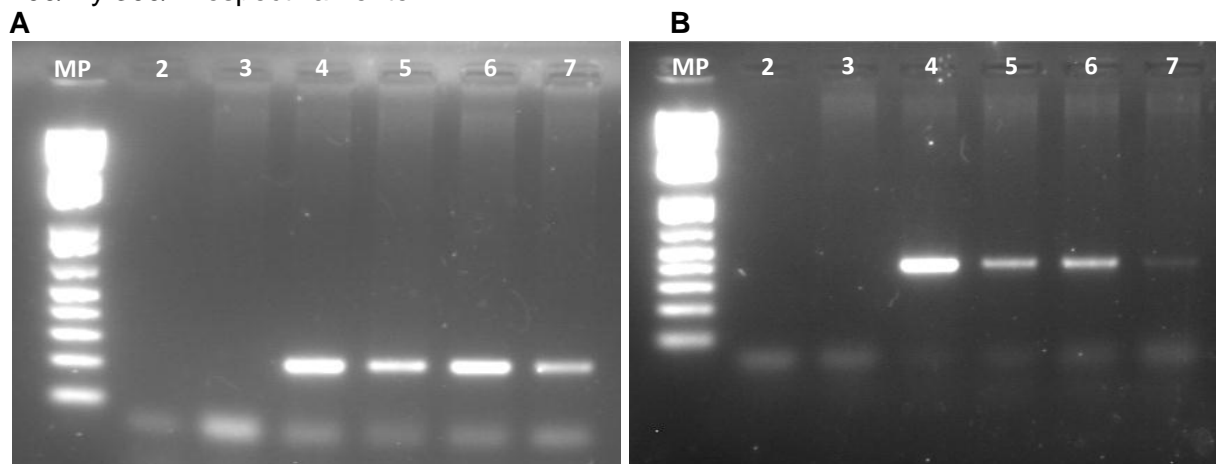
Todas las muestras de ADN de semillas de algodón convencional DP 90 NAL, Corpoica M123, M129 y M137, amplificaron con los primers FsACP, Figwort y *Cry1Ac* (figura 11). Este resultado nos muestra que las semillas de algodón convencional están contaminadas por mezcla, o son producto de procesos de hibridación entre plantas de algodón GM y no GM.

El ensayo sobre nivel de detección de la taq polimerasa mostró que es posible detectar 1 semilla transgénica en 100, 200 o 300 semillas no transgénicas como se muestra en la figura 12. Ortíz y colaboradores (2005), 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 ADN por duplicado.

**Figura 11.** Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de semillas de variedades convencionales. MP: Marcador de peso molecular 100 pb; carril 2: agua **A. Primers FsACP**, carril 3: variedad Nuopal/RR; carril 4: variedad corpoica M123; carril 5: variedad corpoica M129; carril 6: variedad corpoica M137; carril 7: variedad deltapine 90 nacional (DP90 NAL); **B. Primers figwort**; carril 3: control negativo (especie asilvestrada); carril 4: variedad corpoica M123; carril 5: variedad corpoica M129; carril 6: variedad corpoica M137; carril 7: variedad DP90 NAL; carril 8: control positivo (Nuopal/RR). **C. Primers Cry1Ac**; carril 3: control negativo (especie asilvestrada); carril 4: control positivo (Nuopal/RR); carril 5: variedad corpoica M123; carril 6: variedad corpoica M129; carril 7: variedad corpoica M137; carril 8: variedad DP90 NAL.



**Figura 12. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de semillas. A. *Cry1Ac*. B. Promotor Figwort. MP: Marcador de peso molecular 1Kb, carril 2: agua, carril 3: control negativo, carril 4: control positivo, carriles 5-7: 100 semillas convencionales con 1 transgénica (100/1); 200/1 y 300/1 respectivamente.**



### Análisis de Parentales

Se utilizaron 751 tirillas de la prueba Inmunostrip, 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.

Se analizaron las muestras de 27 lotes cultivados con algodón convencional, y se encontró que todas las muestras de 11 lotes fueron negativas para la proteína *Cry1Ac* (figura 13A), ningún lote presentó las 9 muestras positivas y 16 lotes tuvieron al menos 1 muestra positiva para la proteína *Cry1Ac* (figura 13B, tabla 6). De los 8 lotes que tuvieron 1 muestra positiva, 2 lotes (L15 y L62) tenían lotes cultivados con algodón transgénico alrededor, ubicados a  $\pm 4$  m, 1 lote (L78) se encontraba ubicado a  $\pm 5$  m de la carretera vía Ibagué y el lote con algodón transgénico más cercano se ubicó a  $\pm 560$  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  $\pm 4$  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 no tenía transgénicos ubicados alrededor, el lote transgénico más cercano se ubicó a  $\pm 480$  m y el lote 45 con 4 muestras positivas, se encontraba  $\pm 2570$  m alejado de fuentes de algodón GM.

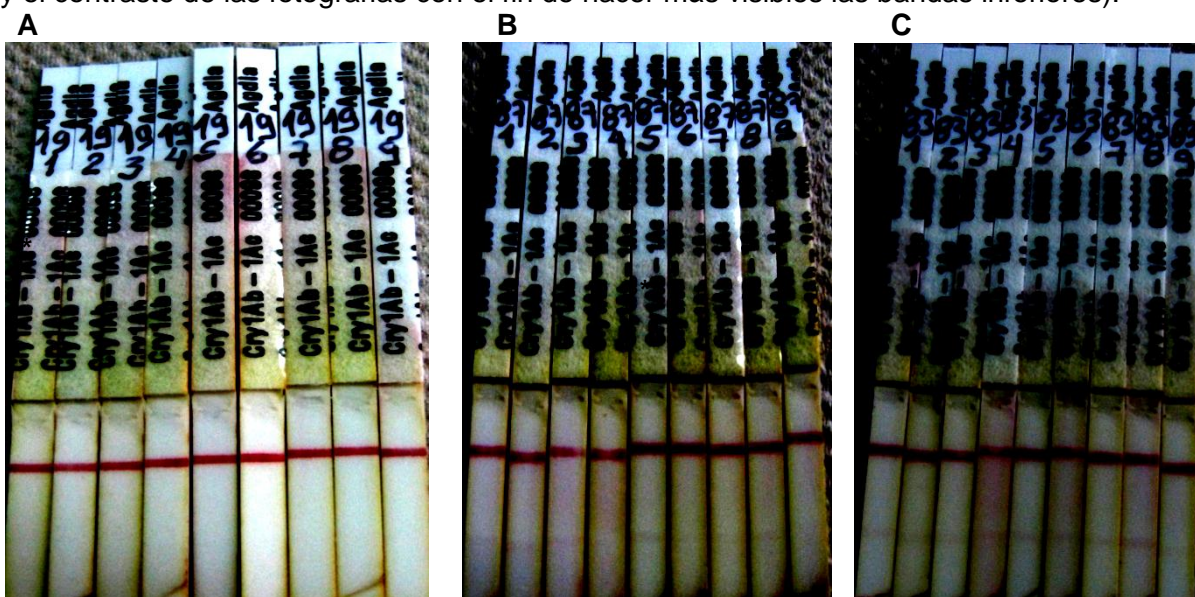
Respecto a refugios, de las 56 zonas analizadas, se encontró que todas las muestras de 20 refugios fueron negativas para la proteína *Cry1Ac*, 4 refugios tuvieron las nueve muestras positivas (figura 13B, C) y 32 refugios tuvieron al menos 1 muestra positiva para la proteína *Cry1Ac* (tabla 6). Las muestras de la especie asilvestrada 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 13). Shaukat *et al.*, (2010), 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.

**Tabla 6.** Resultados pruebas Inmunostrip.

NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS	No. LOTES CONVENCIONALES	No. REFUGIOS	INDIVIDUOS ESPECIE ASILVESTRADE	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

**Figura 13. Resultados prueba inmunostrip.** A. Todas las muestras negativas. B. Al menos una muestra positiva. C. Todas las muestras positivas. \* Línea control. \*\* línea 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).



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 -20°C), ya que Zenner *et al.*, (2008) y Olsen *et al.*, (2005), 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.

Saldarriaga (2008) analizó la concentración de la toxina en las hojas terminales en el ciclo del cultivo del algodón 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 ADN combinado (Phillips *et al.*, 2003 y Falcón y Valera, 2007), se obtuvo ADN en concentraciones de 61,2 – 1218,7 ng/μl, la relación 260/280 osciló entre 1,60 - 1,99, el ADN fue de buena calidad y cuando se utilizó para los ensayos de PCR se obtuvo amplicones.

Utilizando este protocolo se realizaron 283 extracciones de ADN de hoja; sin embargo, no se consiguió aislar ADN 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 14) y senescentes, esta última característica según Katterman y Shattuck (1983) impide obtener ADN en proporciones óptimas.

**Figura 14.** Hojas de algodón inadecuadas para realizar extracción de ADN.



La PCR utilizando ADN extraído de hoja, se realizó con el fin de identificar falsos negativos obtenidos con esta prueba, e identificar otros eventos que han sido liberados.

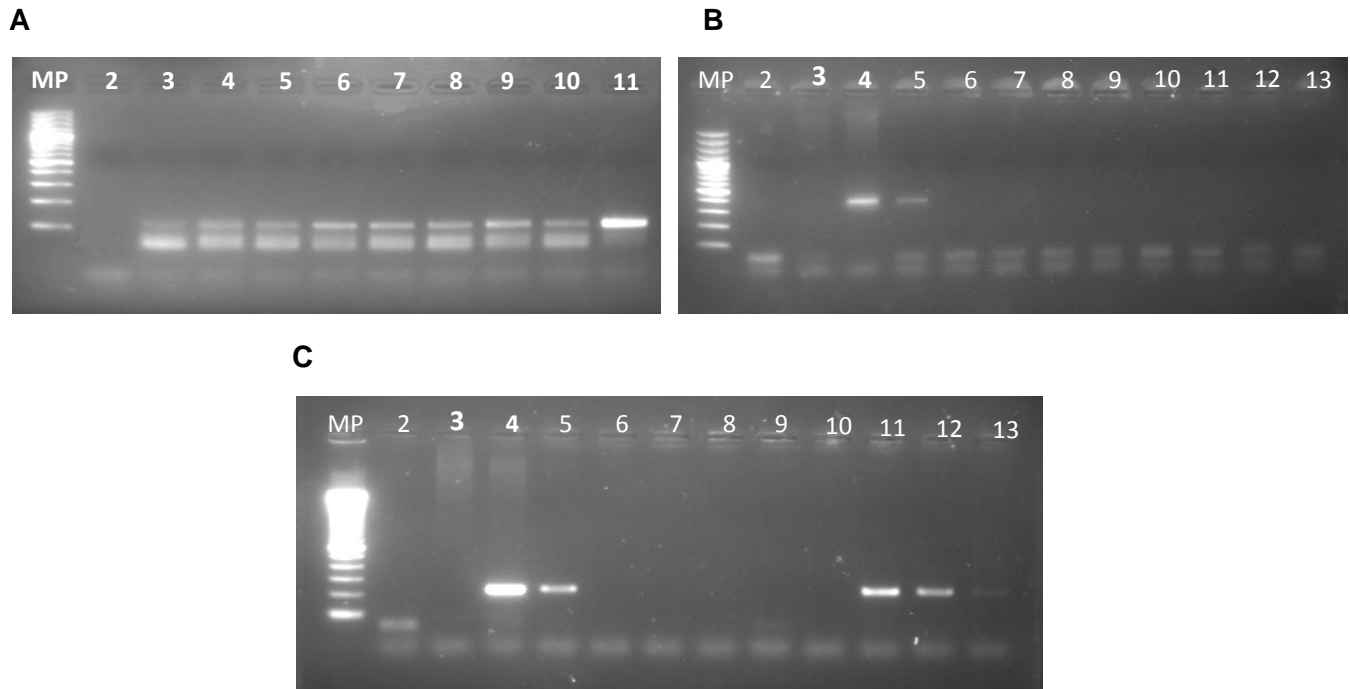
La PCR utilizando primers para amplificar el gen endógeno FsACP, se hizo para 237 extracciones y en todas las muestras se obtuvo un amplicón de 116 pb (figura 15A).

Con los primers para amplificar la región promotora del virus del mosaico figwort, se utilizó ADN de 112 extracciones y se obtuvo un amplicón de 396 pb en al menos una muestra de 4 lotes cultivados con algodón convencional; en al menos una muestra de 1 refugio analizado y ninguna muestra fue positiva en 7 lotes cultivados con algodón convencional. Las muestras de la especie asilvestrada fueron negativas (tabla 7, figura 15B).

**Tabla 7.** Resultados PCR a partir de ADN extraído de hojas.

NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS	No. LOTES CONVENCIONALES		No. REFUGIOS		INDIVIDUOS ESPECIE ASILVESTRAADA	
	Primers					
	Figwort	<i>Cry1Ac</i>	Figwort	<i>Cry1Ac</i>	Figwort	<i>Cry1Ac</i>
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

**Figura 15. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de hojas.** A. Primers FsACP, MP: Marcador de peso molecular 100 pb, carril 2: agua, carril 3-11: muestras 1 a 9. B. Primers Figwort y C. Primers *Cry1Ac*, carril 3: control negativo, carril 4: control positivo, carriles 5-13: muestras 1 a 9.



Utilizando primers para amplificar el gen *Cry1Ac*, se realizó PCR con 237 extracciones de ADN 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, 1 lote cultivado con algodón convencional y las muestras de la especie asilvestrada fueron negativas (tabla 7, figura 15C). El mismo tamaño de amplicón fue obtenido por Randhawa *et al.*, (2010) en sus ensayos de PCR para detectar los eventos de algodón MON531 y MON15985.

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

Teniendo en cuenta que el flujo de transgenes puede ocurrir vía polen o vía semillas (Mallory y Zapiola, 2008, Heuberger *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2008), 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 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 la especie asilvestrada no se detectó flujo de genes vía semilla.

El flujo de genes vía semilla que se presentó en lotes cultivados con variedades convencionales, ubicados cerca ( $\pm 4 - 10$  m 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 *et al.*, (2010) y Messeguer (2003) 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 (Van Deynze *et al.*, 2005) (mezcla de semillas que puede ser de origen), a semillas sembradas inadvertidamente durante la cosecha (Messeguer, 2003) o resultado de errores humanos cometidos durante la siembra, cosecha o procesamiento de la semilla (Heuberger *et al.*, (2010).

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 (SIOVM, 2010). Es posible que el flujo de genes vía semillas observado en los lotes cultivados con algodón convencional ubicados a unos  $\pm 6$  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 (Van Deynze *et al.*, 2005), 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 Agronomía 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 la especie asilvestrada, 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 Agronomía Remolino S.A.

Resultados similares respecto a flujo de genes mediado por semillas desde algodón genéticamente modificado hacia algodón convencional fueron reportados por Heuberger *et al.*, (2010) Kim *et al.*, (2008) y Heuberger *et al.*, (2008); 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 (Chapman y Burke, 2006; Kim *et al.*, 2008). 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 (Kim *et al.*, 2008). 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 (Van Deynze *et al.*, 2005).

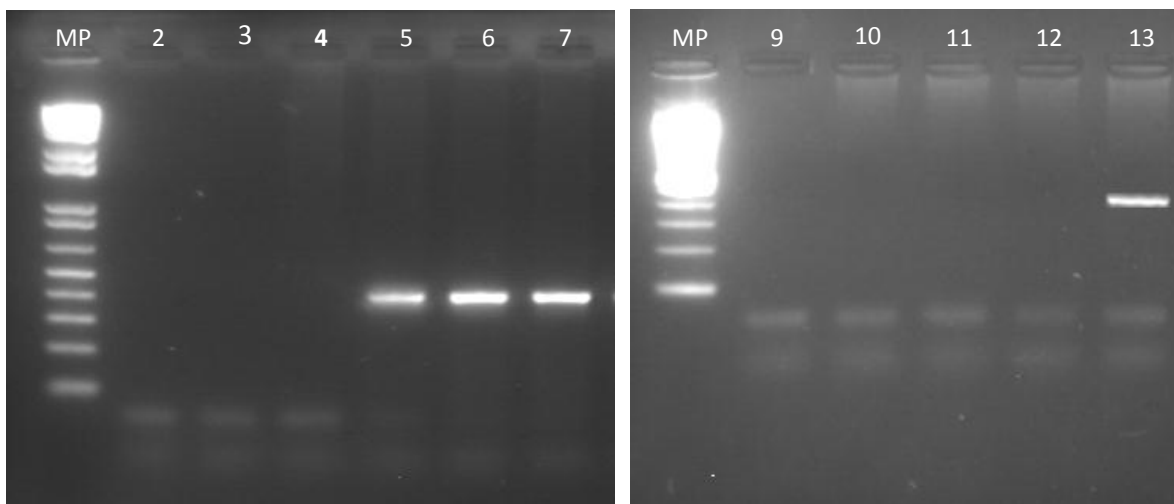
Además, el flujo de transgenes podría amenazar los derechos de propiedad intelectual de las compañías biotecnológicas, las ventas de productos no transgénicos, las estrategias de manejo de resistencia de insectos y malezas (Mellon y Rissler, 2004; Smyth *et al.*, 2002; Heuberger *et al.*, 2008; Mallory y Zapiola, 2008; Heuberger *et al.*, 2010) 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 (Beckie *et al.*, 2003; Heuberger *et al.*, 2008; Goggi *et al.*, 2006; Bannert y Stamp, 2007; Heuberger *et al.*, 2010).

### **Análisis de la progenie**

Extracción de ADN de semillas, PCR y Elisa. La extracción de ADN 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 ADN obtenido osciló entre 8,7 y 85,8 ng/μL y la relación 260/280 entre 1,6 - 1,9, indicando que se obtuvo ADN de buena calidad (Randhawa *et al.*, 2010; Seong *et al.*, 2007).

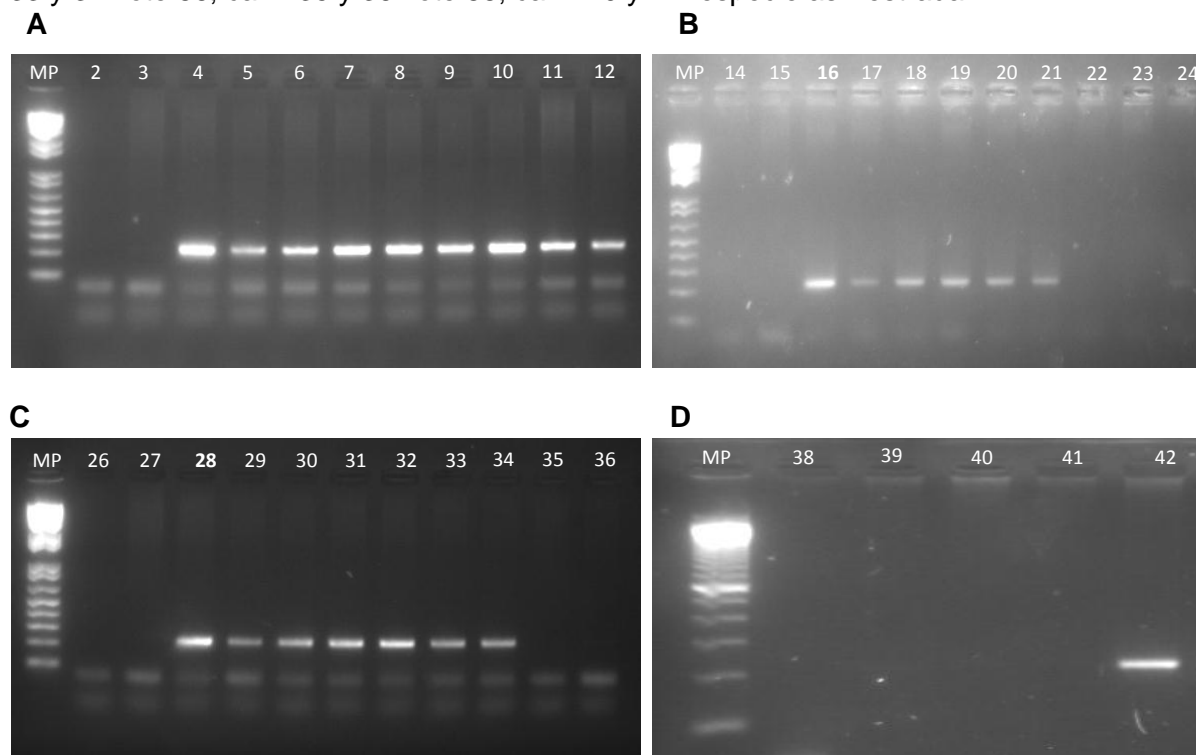
La PCR utilizando primers para amplificar el promotor Figwort se hizo con el ADN extraído del lote convencional y resultó positivo (tabla 8, figura 16). Las muestras de la especie asilvestrada fueron negativas para la presencia del promotor Figwort (tabla 8, figura 16).

**Figura 16. Amplicones obtenidos con ensayos de PCR a partir de ADN extraído de semillas utilizando primers para Figwort, MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, carriles 2, 3 y 9: agua, carriles 4 y 10: control negativo, carril 5 y 13: control positivo, carril 6: lote 31, carril 7: lote 31 duplicado; carril 11: especie asilvestrada; carril 12: especie asilvestrada duplicado.**



Utilizando primers para amplificar el gen *Cry1Ac* se hizo PCR para 11 refugios encontrándose 9 refugios positivos y 2 refugios negativos, correspondientes a los lotes 79 y 88 (tabla 8, figura 17); el lote convencional (lote 31) resultó positivo y la especie asilvestrada resultó negativa para la presencia del gen *Cry1Ac* (tabla 8, figura 17).

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



Con la prueba Elisa se encontró que 2 refugios fueron negativos para la expresión del gen *Cry1Ac* (refugios 79 y 88) y concuerdan con los refugios en los que no hubo amplificación del transgen *Cry1Ac* (tabla 8, figura 18). Los 9 refugios restantes y el lote convencional analizados con esta prueba y sus replicas, fueron positivas para la proteína *Cry1Ac* (tabla 8) y la cuantificación de la proteína osciló aproximadamente entre menos de 25 y menos de 200 µg/ml (figura 18). 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 18).

**Tabla 8.** Resultados PCR con ADN extraído de semillas y prueba ELISA

		PCR		ELISA <i>Cry1Ac</i>
		Primers		
		Figwort	<i>Cry1Ac</i>	
No. lotes positivos	Convencional	1	1	1
	Refugio	-	9	9
	Especie asilvestrada	0	0	0

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 Llewellyn *et al.*, (2007), Van Deynze *et al.*, (2005), Zhang *et al.*, (2005), Freire (2002) y Heuberger *et al.*, (2010), 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 (Van Deynze *et al.*, (2005)) .

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, 73% 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 probabilidad 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 12 refugios, se muestra evidencia de la presencia de híbridos de algodón.

**Figura 18.** Resultados prueba ELISA. Identificación de las muestras en la placa de la prueba ELISA y cálculo de la concentración de la proteína *Cry1Ac*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	Positivo 300 µg/ml	L10(2) <25	L63(1) 50	L66(3) <100	L81(2) <100	L88(1)	M123(3) >100	DO/RR(2) <25	FM(1) <100	Negativo -
<b>B</b>	Positivo 250 µg/ml	L10(3) <25	L63(2) <50	L77(1) >100	L81(3) >100	L88(2)	M129(1) <25	DO/RR(3) <25	FM(2) >100	Abs -
<b>C</b>	Positivo 200 µg/ml	L31(1) <150	L63(3) <50	L77(2) <150	L84(1) <100	L88(3)	M129(2) <25	NO/RR(1) >100	FM(3) >100	Abs -
<b>D</b>	Positivo 150 µg/ml	L31(2) <150	L64(1) >25	L77(3) <150	L84(2) <100	DP90(1) <150	M129(3) <25	NO/RR(2) <150	Negativo -	Abs -
<b>E</b>	Positivo 100 µg/ml	L31(3) >100	L64(2) <25	L79(1)	L84(3) <100	DP90(2) <100	M137(1) <150	NO/RR(3) >100	Negativo -	
<b>F</b>	Positivo 50 µg/ml	L33(1) <200	L64(3) <25	L79(2)	L86(1) <100	DP90(3) <150	M137(2) >100	DP455 BG/RR <100	Negativo -	
<b>G</b>	Positivo 25 µg/ml	L33(2) <200	L66(1) <100	L79(3)	L86(2) <100	M123(1) >100	M137(3) <150	DP455 BG/RR >100	Negativo -	
<b>H</b>	L10(1) <25	L33(3) <150	L66(2) <100	L81(1) >100	L86(3) <100	M123(2) <150	DO/RR(1) <25	DP455 BG/RR >100	Negativo -	

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 algodónero (Mendoza y Aramendiz, 1985; Van Deynze *et al.*, 2005), ya sea por la presencia de abejas (Llewellyn *et al.*, 2007; Van Deynze *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Llewellyn y Fitt, 1996) abejorros y melissodes (Van Deynze *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005); o abejorros (Llewellyn *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2005), u otros insectos como avispas, moscas, hibiscos y mariposas (Zhang *et al.*, 2005, Tian *et al.*, 2004).

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 (Zhang *et al.*, 2005; Carpenter y Gianessi, 2001; Betz *et al.*, 2000; Van Deynze *et al.*, 2005), la ubicación de los lotes, las condiciones ambientales, el clima donde se cultiva algodón (Hokanson *et al.*, 1997; Amand *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Van Deynze *et al.*, 2005; Llewellyn *et al.*, 2007), la presencia de cultivos frutales cercanos (Llewellyn *et al.*, 2007) y el viento (Van Deynze *et al.*, 2005).

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  $\pm 4$  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 (Llewellyn y Fitt, 1996; Messeguer, 2003; Zhang *et al.*, 2005), 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 (Van

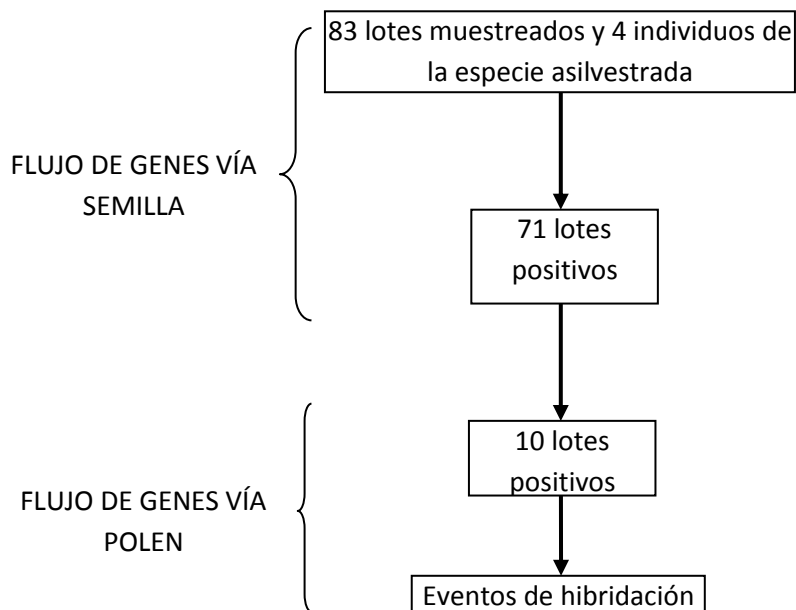
Deynze *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005) y más allá de 1600 m en USA y California (Van Deynze *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008).

Respecto al flujo de genes observado en zonas refugio, varios autores (Llewellyn y Fitt, 1996; Luna *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1994; Chilcutt y Tabashnik, 2004.) establecen que depende de diversos factores como el tamaño del refugio, forma y distancia desde el cultivo Bt; longevidad del polen, proporción de establecimiento, similitud en tiempos de maduración y tamaño de las flores machos y hembras de los híbridos Bt y no Bt. En esta investigación es probable 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 refugios tienen plantas Bt, 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. Estas estrategias ayudarían a prevenir el surgimiento de malezas nuevas y más resistentes (Ellstrand *et al.*, 1999; Messeguer, 2003), evitar la pérdida de biodiversidad (Amand *et al.*, 2000; Messeguer, 2003), riesgos en la seguridad alimentaria (Messeguer, 2003) y efectos potenciales sobre la resistencia de los insectos (Chilcutt y Tabashnik, 2004).

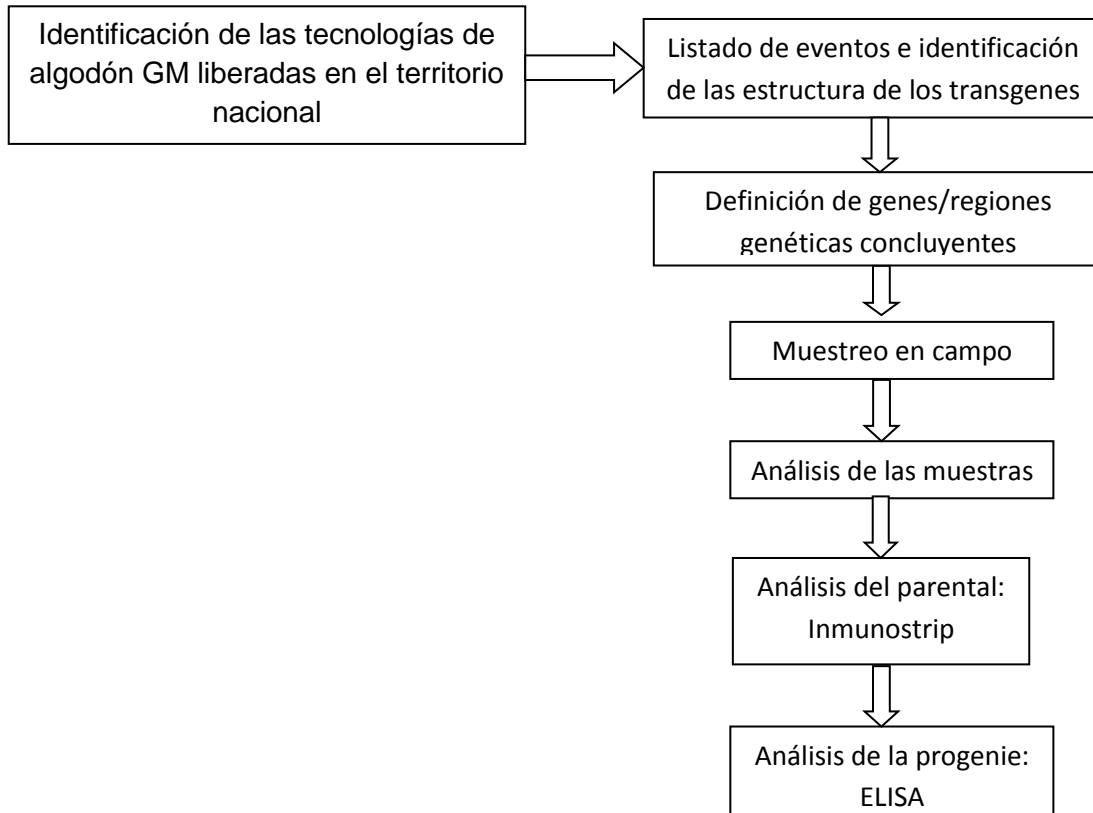
En este estudio, y al igual que en el estudio de Heuberger *et al.*, (2010), la fuente de flujo de genes de mayor importancia fue el flujo de genes mediado por semillas, a pesar que este tipo de flujo de genes ha recibido menor atención que el flujo de genes mediado por polen (Beckie y Hall, 2008; Heuberger *et al.*, 2010).

Finalmente, a continuación se presenta un esquema en el que se resumen los resultados obtenidos.



## 2.6 PROPUESTA DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES APLICABLE A LAS TECNOLOGÍAS TRANSGÉNICAS DE ALGODÓN LIBERADAS COMERCIALMENTE EN LA AGRICULTURA COLOMBIANA

### Esquema general



### Metodología de muestreo

Para realizar el monitoreo del flujo de genes se propone:

1. 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.
2. Diseñar el muestreo (Escoger al azar los lotes de muestreo). Recomendamos seleccionar 3 municipios por departamento, en total 12 localidades.
3. 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.
4. Confrontar en campo la información de georeferenciación y complementar el mapa.
5. Realizar el muestreo en:

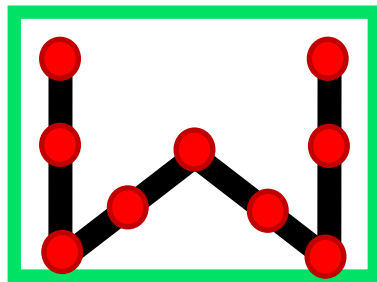
- Refugios de lotes sembrados con algodón Bt: muestrear alrededor del 10%



- Lotes sembrados con variedades convencionales de algodón: muestrear alrededor del 10%.
- Zonas con presencia de especies silvestres de algodón: muestrear cada una de las poblaciones que se localicen en cada localidad, tomar muestras de 3 plantas por población.

### **Análisis de parentales**

En los refugios y en los lotes sembrados con variedades convencionales de algodón tomar 9 puntos al azar, siguiendo una distribución en forma de W, en cada punto seleccionar una planta, coleccionar 1 hoja joven, no senescente y aplicar la prueba Inmunostrip (análisis del parental). Utilizar tubos eppendorf de 1,5 ml y puntas azules (100-1000 µL) despuntadas, previamente esterilizadas, limpiar el material vegetal con una toalla absorbente humedecida con alcohol al 70% y secarla con otra toalla. Si la prueba da negativo, coleccionar 5 cápsulas abiertas. Muestrear todos los individuos del lote y en el caso que se encuentre un transgénico en el lote (prueba inmunostrip positiva), se tomará como flujo de genes vía semilla y no se utilizará para el análisis de flujo de genes vía polen, en este caso no se coleccionarán cápsulas.



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 en la libreta de campo la siguiente información: Número del lote, fecha de colecta, vereda, finca, propietario, georeferenciación, número de hectáreas, tipo de cultivo, responsable de la colecta, fecha de siembra, fecha de floración, tener en cuenta el cálculo de la distancia con respecto al cultivo GM más cercano e información de la historia de siembra del lote.

### **Análisis de progenie**

Realizar la prueba ELISA por triplicado para cada muestra, utilizando un kit DAS ELISA y cuantificar la concentración de la proteína utilizando el kit Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific).

Se recomienda manejar las muestras siguiendo una cadena de custodia, por tal razón se propone que dos personas realicen el muestreo y el análisis de los parentales en campo y dos personas diferentes realicen el análisis de la progenie en laboratorio.

*Condiciones de esterilización.* Los tubos eppendorf y las puntas esterilizarlas durante 20 minutos a 121°C y 15 PSI de presión.

## Análisis de costos

	<b>ANÁLISIS DE PARENTALES</b>	<b>ANÁLISIS DE LA PROGENIE</b>	<b>TOTAL</b>
	Prueba inmunostrip	Prueba ELISA	
Costo para una muestra	\$8200	\$13800	\$22000

En el análisis de costos no se tuvo en cuenta transportes, ni mano de obra. El costo de las pruebas incluye los fungibles y los costos de la prueba Elisa se realizaron por triplicado.

El MAVDT debe encargarse de resolver el tema de acceso a recursos genéticos para el caso de parientes silvestres, de acuerdo a la Decisión 391.

### 3. MAIZ

#### 3.1 EVALUACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS EN OGMS LIBERADOS AL MEDIO AMBIENTE EN EL TERRITORIO NACIONAL

El maíz transgénico se liberó por primera vez al medio ambiente en el territorio nacional a partir del año 2007 mediante las resoluciones del ICA 00464 y 00465, a través de las cuales, se autorizan siembras controladas de maíz con la tecnología Bt Herculex I (TC-1507) y se autorizan siembras controladas de maíz con la tecnología Yieldgard® (MON 810), respectivamente.

Sin embargo, antes de la primera autorización de siembra controlada de maíz transgénico, el ICA autorizó la realización de estudios de bioseguridad con maíz de los eventos Bt11, Yieldgard, Roundup Ready y Herculex. Adicionalmente, no sólo se ha aprobado la utilización maíz GM para su uso en el campo agrícola, sino que también se han realizado autorizaciones para el empleo de maíz transgénico para consumo directo y/o como materia prima para la producción de alimentos para animales domésticos.

En el anexo 7 se presenta una tabla en la que se especifican las diferentes resoluciones del ICA desde Diciembre 16 de 2005 hasta el 27 de Diciembre de 2010 relacionadas con maíz transgénico, en la cual se pueden observar las autorizaciones que ha realizado la entidad con respecto a este OGM.

De acuerdo a todo el proceso de autorización de diferentes eventos de maíz transgénico en el país y con base en la revisión de las resoluciones del ICA se identificaron las tecnologías de maíz GM que han sido liberadas en Colombia desde el 2007 y hasta el 2011 junto con sus características, las regiones en las que se encuentran y su situación actual (anexo 8)

En la actualidad son 13 las diferentes tecnologías de maíz GM que han sido autorizadas en el país, 8 de ellas han sido aprobadas para ser sembradas de forma controlada y las 5 restantes están siendo utilizadas en ensayos de bioseguridad y/o en evaluaciones agronómicas.

Son 6 las regiones dentro del país en las cuales se siembran algunos o todas las tecnologías de maíz transgénico, entre ellas se destacan: Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera

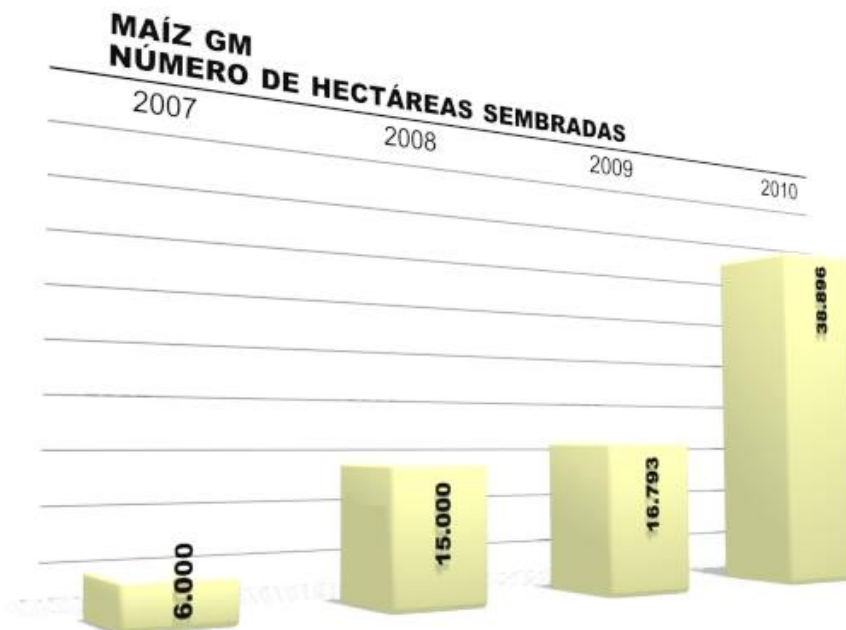
Son 3 las compañías que han realizado las solicitudes ante el ICA y que manejan el mercado del maíz GM en Colombia: DuPont de Colombia S.A., Syngenta S.A. y Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

Las características de los maíces transgénicos que se utilizan en el país son: Resistencia a insectos lepidópteros y/o coleópteros y tolerancia a glifosato y/o glufosinato de amonio.

Los transgenes que han sido introducidos en las diferentes tecnologías son: Cry1F, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, Cry34Ab1 y Cry35Ab1 para resistencia a lepidópteros, vip3Aa20 para resistencia a coleópteros, CP4EPSPS y mEPSPS para tolerancia a glifosato y PAT para tolerancia a glufosinato de amonio.

Respecto a la adopción de las tecnologías transgénicas de maíz que se han liberado, Colombia ha seguido las tendencias mundiales, inicialmente adoptó la tecnología que contiene un solo gen y luego se adoptó la tecnología con eventos apilados obtenidos por hibridación convencional a partir de líneas transformadas. El área de cultivo de maíz GM ha tenido un importante aumento desde el año 2007, en el cual se cultivaron 6.000 ha, mientras que para el 2010 se cultivaron 38.896 ha (Agrobio. 2011, figura 19).

**Figura 19.** Número de hectáreas sembradas de maíz GM en Colombia. Fuente: Agrobio (2011)



En relación con la vía regulatoria, a nivel internacional inició con la adopción del Convenio sobre la Diversidad Biológica firmado por 185 países cuyo objetivo es la conservación y uso sostenible de la biodiversidad. Dentro de este Convenio, se generó el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad en Biotecnología, el cual fue adoptado por más de 130 países y entró en vigor desde el 11 de septiembre de 2003. Tal instrumento marca el compromiso de la comunidad internacional para asegurar la transferencia, manipulación y uso seguro de los OVM (Silva, 2003).

A su vez el Convenio de Diversidad Biológica facultó a los países para establecer sus propios marcos regulatorios sobre bioseguridad (UICN, 2004). En Colombia, el gobierno nacional en desarrollo de la Ley 740 de 2002, expidió el decreto 4525, y designó al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a través del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA la competencia para la autorización de movimientos transfronterizos, tránsito, manipulación y utilización de los Organismos Vivos Modificados, OVM, con fines agrícolas, pecuarios, pesqueros, plantaciones forestales comerciales y agroindustriales que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica. El artículo 19 del decreto 4525 de 2005 creó el comité Técnico Nacional de Bioseguridad, CTNBio, cuya función es, entre otras, recomendar al Gerente General del ICA la expedición de actos administrativos para la autorización de actividades solicitadas con organismos vivos modificados ([www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).

El ICA como autoridad competente recibe las solicitudes para autorizar la introducción, producción y comercialización para siembra en Colombia de semillas de maíz genéticamente modificado. Una vez se evalúan las tecnologías en ensayos de bioseguridad y se establecen los riesgos, el Gerente general del ICA por recomendación del CTNBIO, del cual hacen parte los Ministerios de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial; de la Protección Social, de Agricultura y Desarrollo Rural; Colciencias y el ICA, autoriza o no las siembras controladas de maíz genéticamente modificado en las regiones donde se evaluaron las tecnologías.

Adicionalmente, en el año 2010 se emite la resolución 2894, por medio de la cual se implementa el Plan de manejo, bioseguridad y seguimiento para siembras controladas de maíz genéticamente modificado. Dentro de ella se estipula que los titulares de maíz genéticamente modificado están obligados a realizar actividades de capacitación y seguimiento en pretemporada y durante el cultivo.

Quienes siembren la tecnología transgénica deben establecer un esquema de refugio que debe estar a una distancia no mayor de 500 m de las áreas sembradas con las semillas de maíz GM, debe ser un bloque contiguo no entremezclado y debe estar claramente identificado y bajo un esquema de cultivo de refugio 90/10. La resolución también reglamenta el monitoreo del desarrollo de posible resistencia de especies plaga objetivo y un plan de manejo de malezas.

Además, exige que el cultivo sembrado con maíz GM debe manejarse con medidas de aislamiento, entre ellas se estipula que el cultivo no debe ser sembrado en resguardos indígenas, debe tener mínimo 300 m de distancia con respecto a cultivos de maíces de variedades criollas y debe existir una diferencia en el tiempo de floración (superior a 15 días) (Resolución 2894, [www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).

### 3.2 PARIENTES SILVESTRES DE LOS CULTIVOS DE MAÍZ GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

De acuerdo a la documentación del Instituto Alexander von Humboldt, el maíz no se encuentra de manera silvestre en los ecosistemas de Colombia, sólo se puede encontrar en condiciones de cultivo (Garrido y colaboradores, 2007). El maíz no cuenta con parientes silvestres en Colombia, ya que no hay reporte ni evidencia de teosinte en el país, ni del género *Tripsacum* (Roberts et al. 1957; Torregrosa 1957). Sin embargo, el reporte de Rodríguez (2009) indica la presencia de registros biológicos del género *Tripsacum* y una especie de *Zea* que no se encontraban en los reportes anteriores de parientes silvestres para el maíz presentes en Colombia. En la Tabla 9, se muestra un listado de los parientes silvestres del maíz en Colombia. El número de registros corresponde al publicado por Rodríguez (2009), sin embargo, se realizó una búsqueda 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) con el fin de actualizar la información y establecer la localización de los especímenes.

**Tabla 9.** Parientes silvestres del maíz en Colombia y número de registros biológicos encontrados.

Espece	No. Registros biológicos	Localización
<i>Tripsacum andersonii</i>	3	
<i>Tripsacum australe</i>	9	Meta (235-700 msnm)
<i>Tripsacum laxum</i>	2	Valle del Cauca (540 msnm) Boyacá (800-1100 msnm)
<i>Tripsacum sp.</i>	4	Huila (880 msnm) Meta Magdalena
<i>Zea diploperennis</i>	6	

### 3.3 RAZAS LOCALES ASOCIADAS A LOS CULTIVOS A GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Con respecto a las razas locales de maíz, uno de los trabajos más importantes sobre su distribución en Colombia es el de Roberts y colaboradores (1957), en el cual se reconocieron 23 razas distintas de maíz colombiano: 2 razas primitivas, 9 razas probablemente introducidas y 12 razas híbridas originadas en Colombia.

La subespecie relacionada con Colombia es *Zea mays subsp. everata*, que define al grupo de razas de los llamados maíces “reventones”, a partir de los cuales aparentemente se originan las razas primitivas de Colombia, Pollo y Pira, de acuerdo con la hipótesis de Roberts y colaboradores (1957).

La raza Pollo tiene una distribución limitada a las vertientes orientales de la Cordillera Oriental en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca y puede ser indígena antigua, de incidencia común en Colombia. Sin embargo, el hecho de que guarde semejanzas bastante estrechas con la raza peruana Confite Morocho permite conjeturar que se trata de la introducción temprana a Colombia de una raza que no se difundió extensamente y que no ha jugado un papel sustancial en la evolución de otras razas colombianas. En Venezuela y en Bolivia se encuentra el Pira o tipos semejantes a él. No existe una evidencia de que esta raza tenga su centro de origen en Colombia o de que haya jugado un papel importante en la formación de otras razas de este país.

Varias de las razas restantes, especialmente Sabanero, Cabuya, Andaqui, Clavo e Imbricado, o tipos semejantes a ellas, están ampliamente distribuidas y parece que no son originarias de Colombia sino de regiones situadas más a al sur. Sin embargo, en Colombia se han originado algunas razas, debido principalmente a la hibridación de las introducidas del sur, del occidente y del oriente. Además, parece que en Colombia ha tenido lugar la hibridación con maíz contaminado de Teosinte procedente de México y América Central. Finalmente, existen evidencias de que en Colombia hubo cruzamientos de maíz con su pariente silvestre *Tripsacum*. Estos tres tipos de hibridación han dado lugar, en este país, a nuevas razas, algunas de ellas se han difundido por otras regiones y se han convertido en progenitores de otras razas.

En Colombia se identifican algunos factores de evolución que han contribuido a la formación de razas: el aislamiento geográfico, la hibridación interracial, la hibridación con maíz contaminado de Teosinte, procedente de México, y la hibridación del maíz con su pariente silvestre el *Tripsacum* (Roberts y colaboradores, 1957), éste último no presente en Colombia.

Las razas de maíz presentes en el país son idénticas en muchos aspectos a razas centroamericanas. Estas incluyen un maíz dulce, uno cristalino de mazorca larga y por lo menos dos tipos de maíz harinoso.

Por su parte, el Grupo Semillas (2001) que trabaja en temas relacionados con los cultivos transgénicos en Colombia, ha publicado un listado de razas de maíz presentes en diversas comunidades indígenas, afrocolombianas y campesinas de Colombia. Sin embargo, este estudio carece del soporte científico y técnico riguroso y sus resultados no han sido completamente publicados.

Adicionalmente, siguiendo la ruta demarcada en 1957 por L. M. Roberts y colaboradores, investigadores de la Universidad Nacional de Colombia en Palmira están evaluando la diversidad y variación genética de razas criollas e indígenas de maíz en Colombia. Los objetivos generales del trabajo es conocer si estos materiales aún están presentes en el territorio nacional, y fortalecer el Banco de Germoplasma Nacional.

En el anexo 9 se recopila la información encontrada en diferentes fuentes acerca de las razas locales que se encuentran en el territorio nacional.

### **3.4 VARIEDADES O HIBRIDOS COMERCIALES ASOCIADOS A LAS VARIEDADES DE MAÍZ GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**

En el país, el maíz que se siembra a nivel comercial comprende variedades e híbridos desarrollados en su mayoría por instituciones como el ICA, la Universidad Nacional, la UPTC, Novartis Semillas, Semillas Andree, Semillas del Valle, Semillas Pioneer, Monsanto, Procampo, Semillas La Pradera, Aventis Semillas, entre otros productores (Garrido y colaboradores, 2007) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Creadores de variedades e híbridos de maíz introducidos en Colombia entre 1967 y 2006.

Entidad Responsable	Número de variedades	Entidad Responsable	Número de variedades
I.C.A.	62	Biotecma	2
Pioneer Hi-Bred International	20	Penta Genetics International	2
Semillas Valle S.A.	6	Dekalb Genetics Corporation	2
Syngenta Sementes, Brasil	5	Semillas Líder de Colombia	2
Semillas y Agroproductos Monsanto S.A.	5	Secol Ltda.	2
Procampo S.A.	4	Novartis Seed Ltda.	2
Corpoica – Cimmyt	4	Corpoica – ICA	1
Novartis Seeds Inc.	3	Cargill de Mexico S.A. De C.V.	1
Fenalce, Federecafe, Cimmyt	3	Cargill Seeds Ltd. Thailand	1
Proacol S.A.	3	Novartis Seed Ltda. Brasil	1
Seminins Vegetable Seeds	3	Asgrow Mexicana S.A.	1
Agrogenética Colombiana Ltda.	3	Proacol Ltda.	1
Agrocerec (Brasil)	3	Semillas Tropicales	1
Aventis Corpscience Colombia S.A.	3	Sementes Cargill Ltda.	1
Centro de Investigación de Semillas Cristian Burkard S.A.	3	Prosemillas	1
I.C.A. – FENALCO – Cenicafe	2	Funk's Seeds International	1
Monsanto de Brasil Ltda.	2	Universidad de Nariño	1
Monsanto Seeds	2	Agrocerec	1
Seminal S.A.	2	Maizena - Proacol Ltda.	1
Cargill de México S.A.	2	I.C.I. Semillas	1
Semillas Andrée & Cia	2	I.C.A. - Cimmyt –Corpoica	1
Semillas La Calidad Ltda.	2	Prosemillas – Guatemala	1

En la actualidad, existen cerca de 30 variedades de maíz blanco y amarillo disponibles en el mercado para su cultivo de productores como Novartis Semillas, Semillas Andree, Semillas Valle, Pioneer, Monsanto, Procampo, Semillas la Pradera, la Facultad de Agronomía de la UPTC, Novartis, Aventis y Corpoica. Dichas semillas tienen diferentes rangos de adaptabilidad que van desde los 0 msnm. hasta los 2.800 msnm. (Tabla 11).

**Tabla 11.** Semillas de maíz disponibles en el mercado para 2011

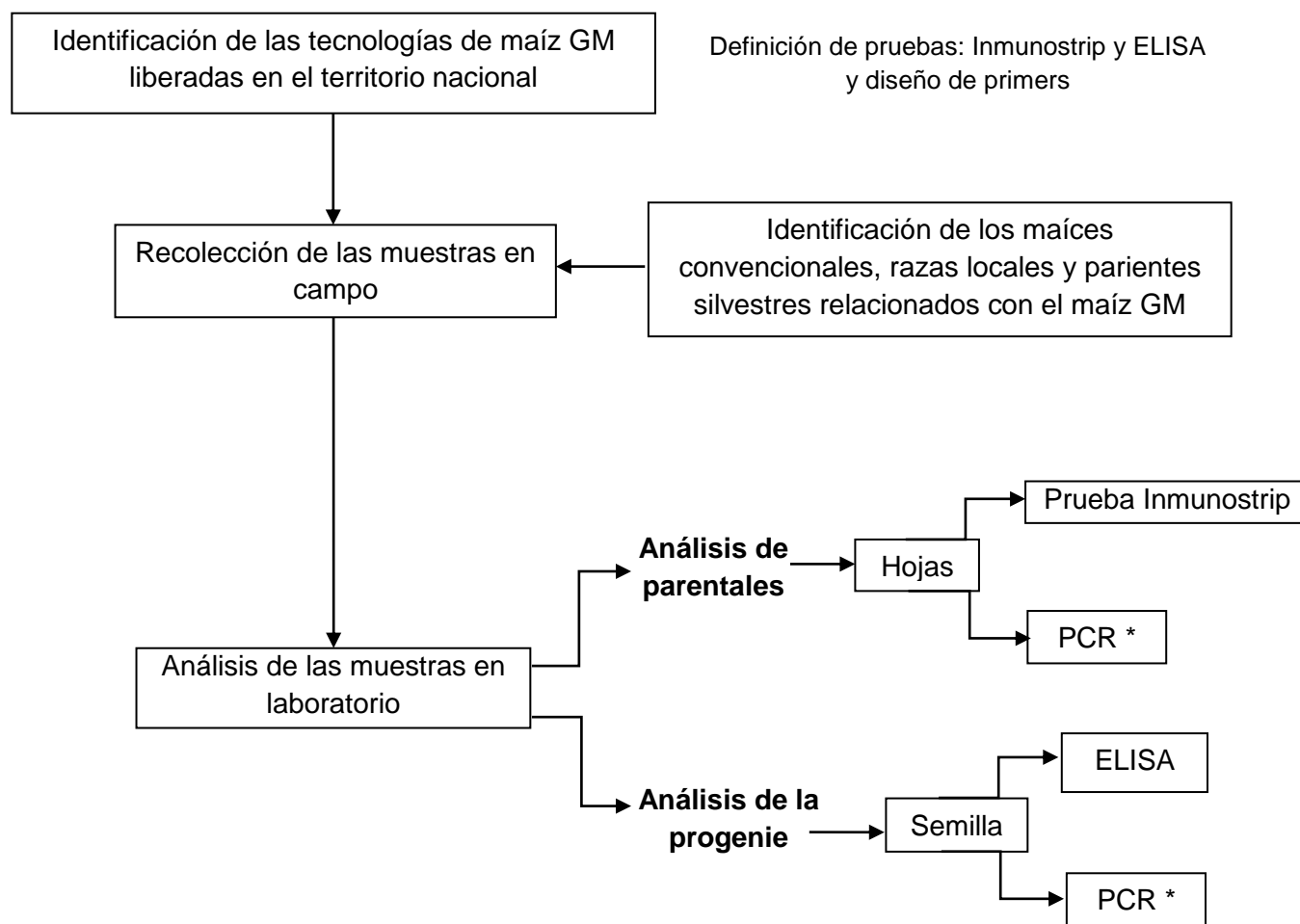
Semillas	Color del grano	Productor	Adaptabilidad (msnm)
Caribe 1008	Amarillo	Novartis Semillas	0 a 1.200
Ceres 61A	Amarillo	Semillas Andree	0 a 1.200
Ceres 123A	Amarillo	Semillas Andree	0 a 1.200
AG612	Amarillo	Semillas Valle	600 a 1.700
ICI550	Amarillo	Semillas Valle	0 a 1.500
P3018	Amarillo	Semillas Pioneer	0 a 1.200
XL221	Amarillo	Monsanto	1.000 a 1.600
Expro 8134	Amarillo	Procampo	0 a 1.250
ICA-V-508	Amarillo	Semillas la Pradera	1.400 a 2.800
Igua	Amarillo	UPTC Agronomía	2.000 a 2.400
Pionner 3041	Amarillo	Pioneer	0 a 1.400
FUNK´SG 5423 El Colorado	Amarillo	Novartis Semillas	0 a 1.800
AVC 1701	Blanco	Aventis Semillas	0 a 1.200

Caribe 1112	Blanco	Novartis Semillas	0 a 1.200
C343	Blanco	Semillas Andree	0 a 1.200
C106B	Blanco	Semillas Andree	0 a 1.200
HR661	Blanco	Semillas Valle	0 a 1.600
P3001	Blanco	Semillas Pioneer	0 a 1.200
D880	Blanco	Monsanto	0 a 1.600
SU670	Blanco	Semillas Valle	600 a 1.700
ICA H558	Blanco	Semillas la Pradera	2.400 a 2.800
Boyacá 555	Blanco	UPTC Agronomía	2.000 a 2.400
SV 670	Blanco	Semillas Valle	0 a 1.600
ICA-V-156	Blanco	CORPOICA	600 a 1.700

### 3.5 PRUEBA PILOTO DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES. DEPARTAMENTO DEL TOLIMA

#### Esquema general

A continuación, se describe el esquema metodológico utilizado para hacer el monitoreo del flujo de genes de maíz transgénico a variedades convencionales y razas locales de maíz en el Valle de San Juan, Departamento de Tolima.



\* Se utilizaron los primers *Cry1F*, 35S del CaMV, nos y zp1.

## Identificación de las tecnologías de maíz GM liberadas en el territorio nacional

Se revisaron las resoluciones del ICA relacionadas con liberación de maíz GM en Colombia y se registró la siguiente información: nombre de la tecnología, transgenes, característica, situación actual, región de liberación y compañía que desarrolló la tecnología (anexo 8). Teniendo en cuenta los transgenes de las diferentes tecnologías de maíz transgénico, se revisó su estructura con el fin de establecer la región promotora, la región codificante y la región terminadora. Esta información se utilizó para identificar los genes y las regiones génicas concluyentes, es decir, aquellas regiones o genes que son comunes a todos los eventos de maíz GM y que son claves para caracterizar una muestra como transgénica o no.

Una vez identificadas, se diseñaron los primers y se seleccionó la prueba Inmunostrip™ y ELISA a utilizar en los análisis de laboratorio.

## Identificación de las variedades convencionales y silvestres relacionadas al algodón GM

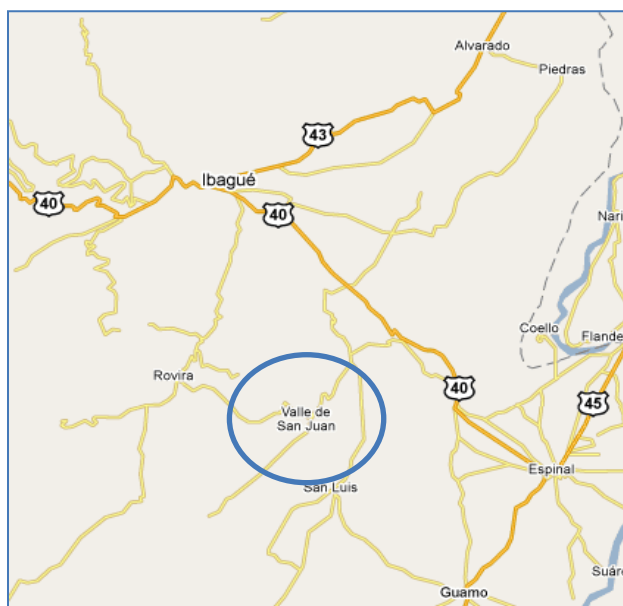
La identificación de maíces convencionales, razas locales y especies silvestres relacionadas con maíz GM, se realizó mediante la revisión de literatura y la búsqueda de registros biológicos vía electrónica en bases de datos de herbarios nacionales. Se revisaron artículos científicos, libros, informes y memorias relacionados con el cultivo de maíz en Colombia.

## Recolección de las muestras en campo

Las colectas se realizaron en el municipio del Valle de San Juan en el departamento del Tolima en los meses de Julio y Agosto durante la cosecha de maíz sembrado en el primer semestre de 2010.

El municipio se encuentra localizado sobre las coordenadas 4°12' N y 75°07' O entre los municipios de El Espinal e Ibagué (Figura 20)

**Figura 20:** Ubicación del Valle de San Juan en el departamento del Tolima.



El municipio tiene un área de 198 km<sup>2</sup> de los cuales 10,53% está dedicado a la agricultura. Tiene una temperatura promedio de 25°C y los principales cultivos que se siembran son maíz, arroz, plátano, café y hortalizas (Tolima en cifras, 2006).

De acuerdo a la Secretaría de Planeación Municipal de Valle de San Juan, el municipio contiene 17 veredas, 9 de las cuales siembran maíz (Tabla 12).

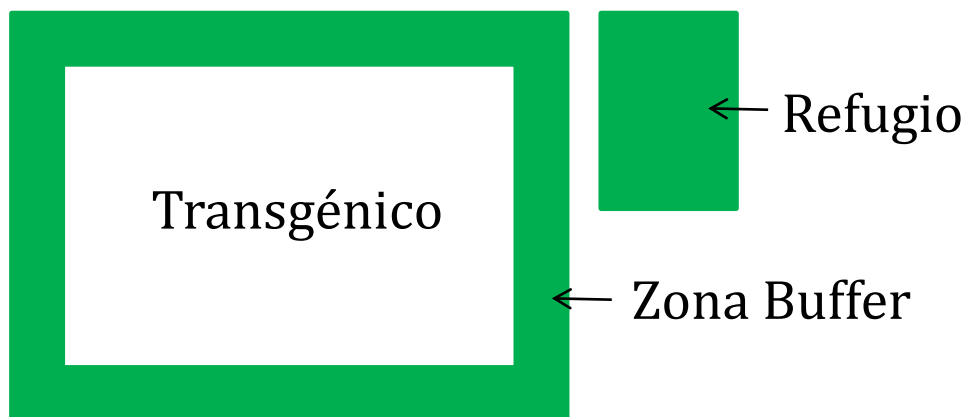
**Tabla 12.** Veredas del Valle de San Juan. Con un asterisco se señalan aquellas en las que se siembra maíz

No	VEREDA	No	VEREDA	No	VEREDA
1	Hijo del Valle*	7	Buena Vista Alta	13	Imán
2	Cabuyal*	8	Dinde*	14	Tasajeras*
3	Agua Clara	9	Capote*	15	Guasimito
4	Buena Vista Baja*	10	Tierras Blancas*	16	San Jacinto
5	Buena Vista Alegría	11	Neme*	17	Santa Rosa*
6	Sedalia	12	Vallecito		

Dentro del municipio, las zonas de muestreo incluyeron:

- Lotes sembrados con maíz transgénico. En este caso, el muestreo se realizó en la zona buffer y/o en el refugio (Figura 21).
- Lotes sembrados con razas locales de maíz.
- Lotes sembrados con maíz convencional.

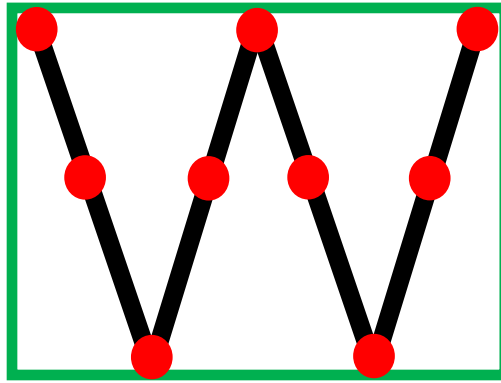
**Figura 21:** Esquema de un lote de maíz transgénico indicando la ubicación de la zona buffer y la zona refugio.



En cada sitio de muestreo se tomaron los datos de georreferenciación, fecha de colecta, nombre de la vereda, la finca y el propietario del lote, número de hectáreas, tipo de cultivo y observaciones como la distancia con respecto al lote de maíz transgénico más cercano, existencia de barreras geográficas importantes, tipo de semillas sembradas, fechas de siembra y/o floración, entre otras (Anexo 10).

Se tomó como modelo para el muestreo la metodología propuesta en el estudio de Ortiz-García y colaboradores (2005). Se muestrearon 60 lotes y para cada lote se hizo la colecta de dos hojas y una mazorca por planta. En el lote, se tomaron muestras de 9 plantas, haciendo un recorrido en forma de W (Figura 22). Esto se aplicó para la colecta en lotes de maíz convencional, lotes de razas locales y zonas refugio. De cada planta se colectaron 2 hojas y una mazorca.

**Figura 22.** Esquema de colecta de muestras en cada lote.



Para la toma de muestras en zonas buffer, se colectaron las mismas muestras para 9 plantas, pero en este caso, el recorrido se hizo de forma aleatoria tomando los 9 puntos en la zona circundante del lote.

Las dos hojas colectadas de cada planta madre fueron almacenadas en bolsas Ziploc debidamente marcadas y se pusieron en congelación a 0°C. Las mazorcas se almacenaron en bolsas Ziploc y luego fueron desgranadas. Los granos totales de cada mazorca se empacaron por separado en bolsas de papel previamente marcadas con el número de lote y de muestra para su transporte y almacenamiento. Los lotes se numeraron de 1 a 60 y la nomenclatura utilizada fue L para lote y números arábigos y M para muestra y números arábigos del 1 a 9. Las muestras se transportaron y almacenaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia siguiendo una cadena de custodia. Las hojas se almacenaron a -20°C y los granos a temperatura ambiente.

En algunos lotes de granos se encontraron gorgojos, por lo cual fue necesario hacer la aplicación del insecticida Lorsban® y del fungicida Vitavax®, para evitar también contaminación por hongos proveniente de la humedad generada por la aplicación del insecticida.

### **Análisis de las muestras en laboratorio**

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 ADN y PCR.

Para extracción de ADN de hoja, se ensayaron los protocolos propuestos por: Permingeat *et al.* (1998), Zhang y Stewart (2000), Phillips *et al.* (2003) y Murray y Thompson (1980). El protocolo con el cual se obtuvo la mejor eficiencia de extracción de ADN, buena cantidad y calidad de ADN recuperado, fue una modificación del propuesto por Phillips *et al.* (2003) y se utilizó para realizar 342 extracciones de ADN de hoja (Anexo 11).

Las extracciones se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y electroforesis en gel de agarosa al 1%. La cuantificación de ADN se realizó utilizando un Nanodrop 2000 de Thermo Scientific.

Se estandarizó y optimizó el protocolo para PCR con el fin de amplificar la región promotora 35S del Virus del Mosaico del Coliflor (35S CaMV) y el terminador de la nopalina sintasa (nos). Se seleccionaron primers para amplificar estas secuencias ya que alguna de las dos o ambas están presentes en los transgenes de todos los eventos de maíz genéticamente modificado que han sido liberados en el país (Tabla 13).

**Tabla 13.** Tecnologías de maíz GM liberados en Colombia y la estructura de sus transgenes

Tecnología	Evento	Promotor	Región Codicante	Terminador
Maíz Herculex I	TC-1507	Ubiquitina Zm 35S CaMV	Cry1F PAT	3' Poli (A) ORF25 3' Poli (A) 35S CaMV
Maíz Roundup Ready	NK 603	35S CaMV	CP4EPSPS	Nos At
Maíz Yieldgard	MON 810	35S CaMV	Cry1Ab	-
Maíz Herculex I x Roundup Ready	TC-1507 x NK 603	Ubiquitina Zm 35S CaMV 35S CaMV	Cry1F PAT CP4EPSPS	3' Poli (A) ORF25 3' Poli (A) 35S CaMV Nos At
Maíz Yieldgard x Roundup Ready	MON 810 x NK 603	35S CaMV 35S CaMV	Cry1Ab CP4EPSPS	- Nos At
Maíz Bt 11	BT11	35S CaMV 35S CaMV	Cry1Ab PAT	Nos At Nos At
Maíz Bt11 x GA21	BT11xGA21	35S CaMV 35S CaMV Actina I Os	Cry1Ab PAT mEPSPS	Nos At Nos At Nos At
Maíz GA21		Actina I Os	mEPSPS	Nos At

Adicionalmente, se diseñaron primers para amplificar el transgen Cry1F con el fin de verificar si existieron falsos negativos con la prueba Inmunostrip™. Finalmente, se diseñaron primers para amplificar la región del gen de la zeína (zp1) para tener un control interno para la PCR. Los primers utilizados fueron sintetizados por Invitrogen.

Las secuencias y el tamaño de los amplicones de los primers utilizados están en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Secuencias y tamaño de los amplicones de los primers utilizados.

Primer	Secuencia	Tamaño del amplicón
35S CaMV	FW 5' GCTCCTACAAATGCCATCA 3'	195 pb
	RV 5' GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3'	
Nos	FW 5' GAATCCTGTTGCCGGTCTTG 3'	180 pb
	RV 5' TTATCCTAGTTTGCGCGCTA 3'	
Cry1F	FW 5' TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC 3'	177 pb
	RV 5' CGGTTACCAGCCGATTTTCG 3'	
Zp1	FW 5' TGCTTGCATTGTTTCGCTCTCCTAG 3'	329 pb
	RV 5' GTCGCAGTGACATTGTGGCAT 3'	

Se establecieron las condiciones para PCR realizando un gradiente con diferentes temperaturas de anillamiento para cada uno de los primers y con base en los resultados se realizó PCR con cada una de las muestras. Las temperaturas de anillamiento definitivas fueron las siguientes (Tabla 15):

**Tabla 15.** Temperaturas de anillamiento de los primers utilizados.

Primer	Temperatura de Anillamiento
35S CaMV	60,7°C
Nos	59,6°C
Cry1F	62,3°C
Zp1	64,4°C

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<sub>2</sub> (2mM) y 0,125 µL de Taq DNA polimerasa (kit Fermentas de QIAGEN). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de denaturación inicial a 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos que comprendieron: denaturación a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a las temperaturas indicadas para cada set de primers durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Como control positivo de PCR se utilizó ADN extraído de semillas del evento Yieldarg x Roundup Ready (YGRR) y como control negativo DNA extraído de semillas de maíz convencional.

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

Adicionalmente, se realizó extracción de ADN de semillas de una variedad convencional de maíz con el fin de estandarizar el nivel de detección de la taq polimerasa y el tamaño de muestra a utilizar para las extracciones de DNA a partir de granos de maíz. Para tal fin, se realizaron las siguientes extracciones.

1. 1 semilla de maíz Yieldarg x Roundup Ready en 100 semillas de maíz no transgénico.
2. 1 semilla de maíz Yieldarg x Roundup Ready en 200 semillas de maíz no transgénico.
3. 1 semilla de maíz Yieldarg x Roundup Ready en 300 semillas de maíz no transgénico.
4. 1 semilla de maíz Yieldarg x Roundup Ready en 400 semillas de maíz no transgénico.
5. 1 semilla de maíz Yieldarg x Roundup Ready en 500 semillas de maíz no transgénico.

Cada muestra se maceró en licuadora, se tomaron 0.5 g del polvo que se obtuvo, se realizó extracción de ADN utilizando el kit DNeasy Plant maxi kit de Qiagen (anexo 12) y finalmente se realizó PCR para el promotor 35S CaMV, el terminador Nos y el gen de la zeína.

Con base en esta prueba, se estableció que un buen nivel de detección de una semilla transgénica en una mezcla de semillas no transgénicas se obtenía en un pool de 300 semillas.

## **Análisis de parentales**

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. Se trabajó con una de las dos hojas colectadas por cada planta. Se realizó Inmunostrip™, extracción de ADN y PCR. La otra hoja colectada se guardó como contramuestra.

Teniendo en cuenta que los eventos cultivados en el 2010 en campo y durante el tiempo de muestreo tienen en su mayoría el gen *Cry1F*, se utilizó la prueba Inmunostrip™ (Catálogo No. STX 10301 Agdia) que permite identificar la proteína *Cry1F*. El procedimiento para realizar esta prueba se muestra en la Figura 23 y se describe a continuación:

Se tomó una hoja de cada muestra, se limpió con una toalla absorbente previamente humedecida con alcohol al 70%, luego, se eliminó el exceso de alcohol utilizando una toalla absorbente seca, el tejido foliar se cortó con una cuchilla estéril para obtener 3 cuadros de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>, los cuales se maceraron con 400 µL de buffer SEB4 (preparado según las instrucciones de uso de la prueba Inmunostrip™), utilizando una punta azul para micropipeta a la cual previamente se le quemó la punta para dejarla roma. El tejido se maceró hasta que el buffer se tornó color verde claro. Posteriormente, se colocó una tirilla y después de 10 minutos se registró el resultado. Cuando la tirilla marco una línea, el resultado fue negativo y cuando marcó dos líneas el resultado fue positivo para presencia de

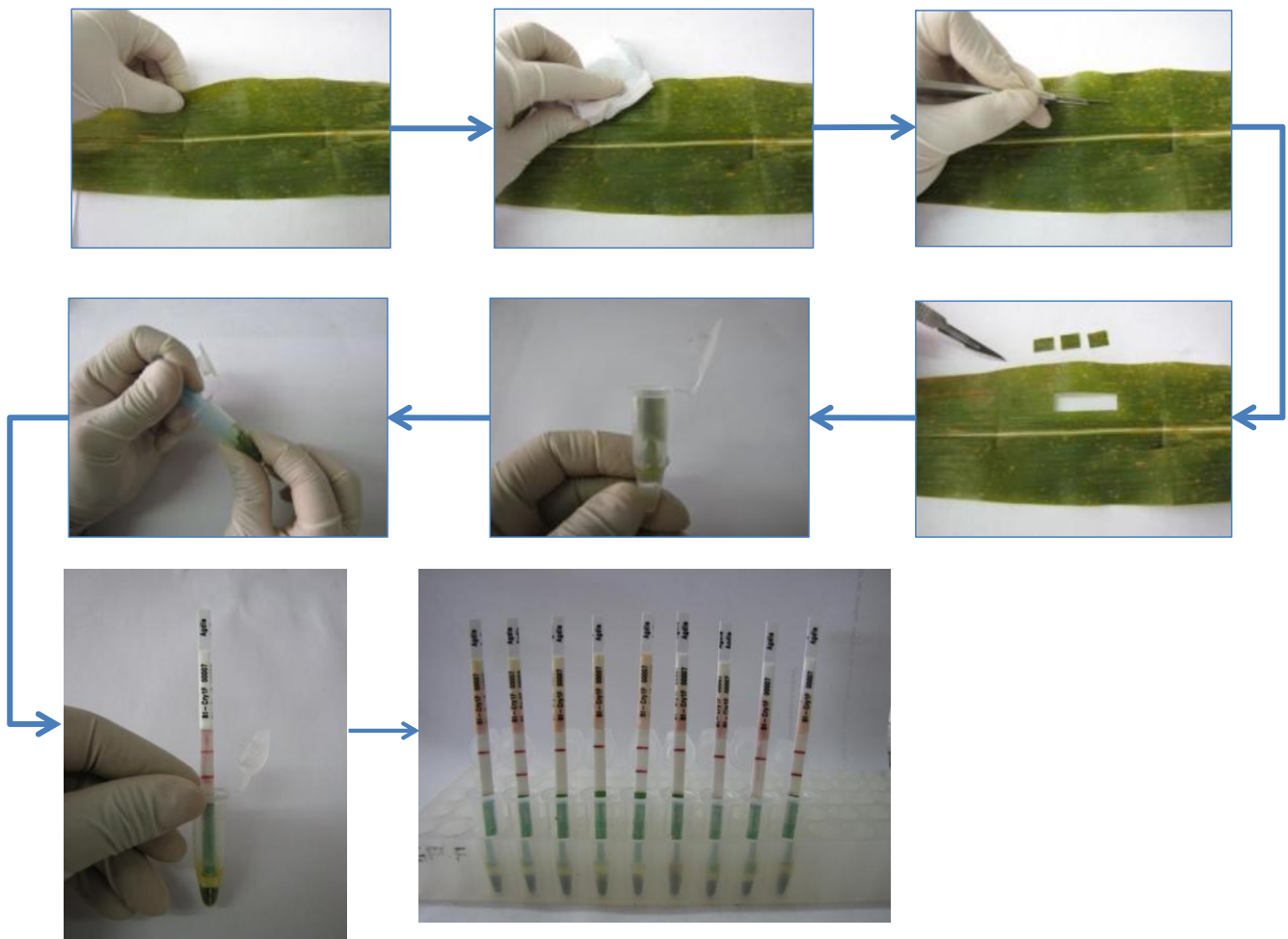
la proteína transgénica Cry1F. Los tubos eppendorf y las puntas fueron esterilizados a 15 psi y 121°C durante 20 minutos

Los lotes que tuvieron al menos 1 muestra positiva para la presencia de la proteína Cry1F utilizando la prueba Inmunostrip™, fueron descartados para las siguientes pruebas moleculares porque al menos una planta transgénica dentro de un lote, aumenta la probabilidad de encontrar híbridos en el análisis de la progenie.

Una vez obtenidos los resultados de la prueba Inmunostrip™ para Cry1F, se realizó extracción de DNA sobre las muestras de los lotes sin ningún individuo positivo. Sobre las extracciones se realizó PCR para amplificar con los primers 35S y nos, con el fin de identificar plenamente los individuos transgénicos que no pudieron ser encontrados usando solamente una prueba para identificar la proteína transgénica Cry1F, ya que como se mencionó anteriormente, los eventos GM liberados en el país contienen otros transgenes. Se utilizaron también los primers para Cry1F con el fin de confirmar los resultados obtenidos con la prueba inmunostrip y descartar la presencia de falsos negativos. Los primers para amplificar zp1 se utilizaron como control interno de la PCR.

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de Phillips *et al.*, (2003) modificado y la PCR se realizó según lo descrito en la validación de esta técnica.

**Figura 23.** Procedimiento seguido para utilizar las pruebas Inmunostrip™ para la detección de la proteína Cry1F en hojas de plantas madre.



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™ y PCR, ya que si existe la presencia de al menos una planta transgénica en un lote, se aumenta la probabilidad de encontrar positivos para eventos hibridación y sesgaría los resultados de flujo de genes vía polen.

### **Análisis de progenie**

Esta fase se realizó con el fin de detectar flujo de transgenes vía polen e identificar procesos de hibridación.

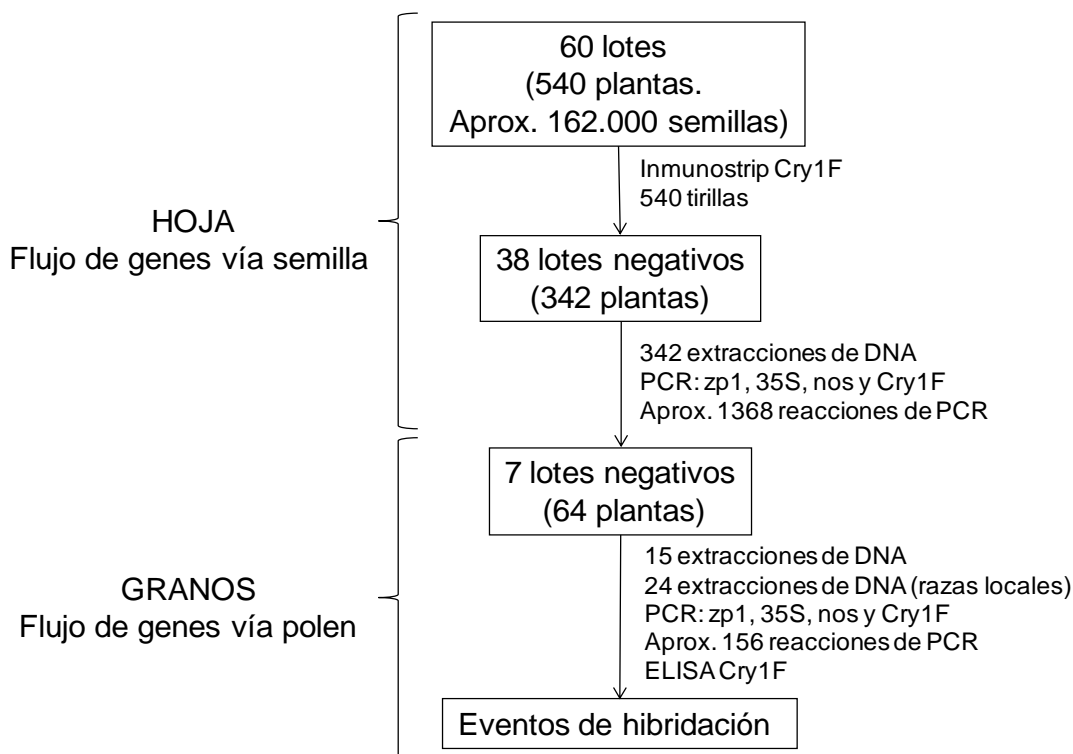
Para detectar flujo de genes e hibridación en las 9 plantas de cada uno de los lotes, se reunieron los granos de cada lote correspondientes a las plantas que fueron negativas para la presencia de algún transgen en los análisis anteriores y se mezclaron las semillas de las 9 mazorcas de un mismo lote. De esa mezcla, 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 tres muestras de 0.5 g para hacer extracción por triplicado utilizando el kit DNeasy Plant maxi kit de Qiagen. Se evaluó la presencia del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor y del terminador Nos y como control positivo se utilizaron los primers para amplificar una región del gen de la zeína.

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

Finalmente, se realizó la prueba ELISA utilizando el kit DAS ELISA de Agdia para detectar la proteína Cry1F (catálogo número: PSP10301, anexo 3) para las muestras que resultaron positivas en la PCR. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra. La lectura se midió usando un lector de placas Elisa a 655 nm. La proteína Cry1F se cuantificó utilizando el kit Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific).

*Condiciones de esterilización.* Los tubos eppendorf y las puntas fueron esterilizadas durante 20 minutos a 121°C 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 implementos 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.

Finalmente, a continuación se presenta un esquema en el que se resume la metodología realizada.



### 3.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Valle de san Juan se realizó el muestreo de 60 lotes de la siguiente forma:

- Lotes sembrados con maíz transgénico: Se tomaron muestras de las zonas buffer y/o de las zonas refugio de los lotes cultivados con las tecnologías de maíz transgénico: 30F35WH y 30F32WH de Pioneer y DK4004 de Monsanto. Dichos lotes se encontraban ubicados en las veredas: Hijo del Valle, Letras, Cabuyal, Capote, Michú, El Neme, Letras, Dinde, La Florida y Buena Vista Baja. Se realizó la colecta en 16 zonas de refugio y 13 zonas buffer (Tabla 16 y Figura 24).
- Lotes sembrados con la raza local denominada clavo. Se realizó la colecta en 4 lotes (Tabla 16 y Figura 24).
- Lotes sembrados con maíz convencional: Se tomaron muestras en lotes cultivados con variedades comerciales pertenecientes a las veredas: Hijo del Valle, Letras, Cabuyal, Capote, Michú, El Neme y Letras. Los híbridos convencionales de la región comprenden: Impacto, 30F35, 30F32, 30A1, P3862, DK 777 y DK7088. Se realizó la colecta en 27 lotes sembrados con maíz comercial no transgénico (Tabla 16 y Figura 24).

El muestreo total se realizó en 10 veredas del municipio del Valle de San Juan: Cabuyal, Capote, Dinde, Egidos, Santa Rosa, El Neme, Hijo del Valle, La Manga, Michu y Buena Vista Baja.

Se muestrearon un total de 540 plantas, de las cuales se colectaron 1080 hojas y 540 mazorcas, equivalente a un muestreo de aproximadamente 162.000 granos.

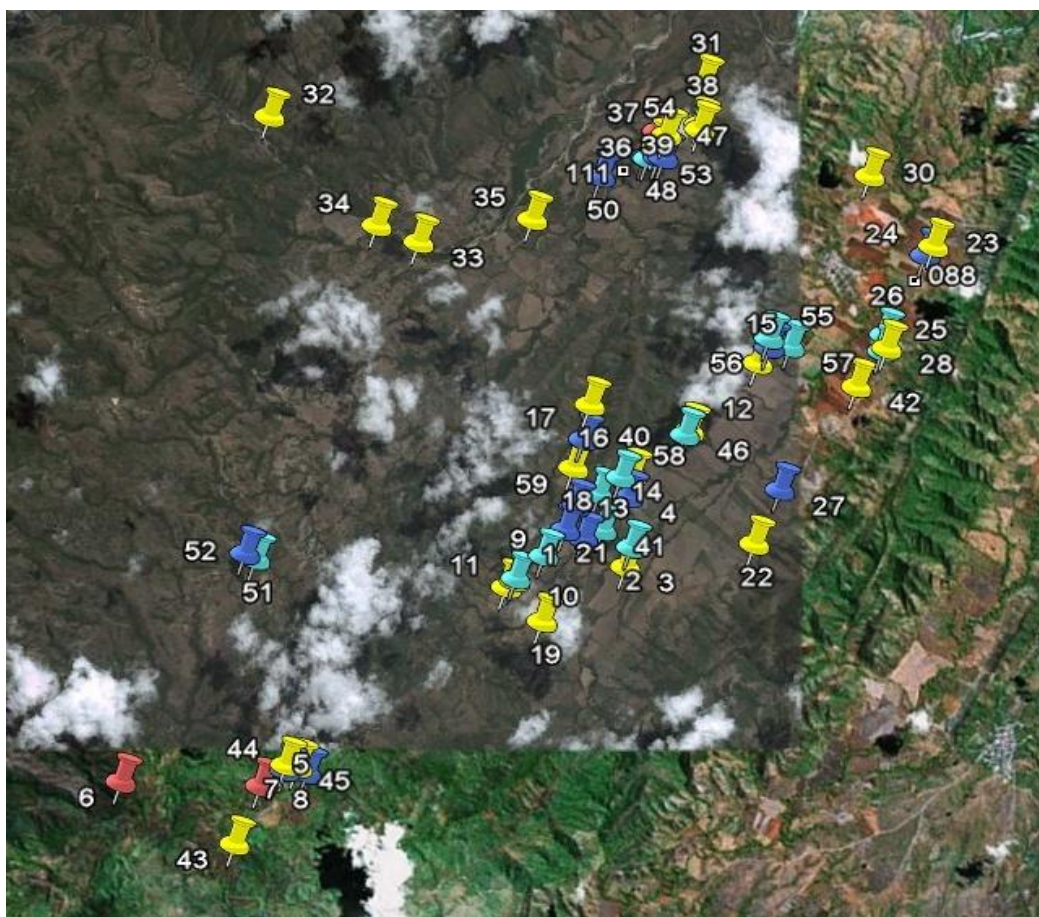
Teniendo en cuenta los datos de la “Lista de beneficiarios del apoyo a la comercialización de maíz amarillo segundo semestre 2010” publicada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y Fenalce, en el Valle de San Juan existen 107 productores de maíz con 1353,8 Ha sembradas. De acuerdo a esto y teniendo en cuenta que en el municipio no existe ningún otro registro de siembra de maíz, la colecta de muestras se realizó en lotes pertenecientes a 44 productores, lo cual equivale al 44,12% del total de productores de la zona. En términos de hectáreas, los sitios de muestreo comprenden un 25,57% del área total sembrada de maíz en la región si tenemos en cuenta que se hicieron colectas en un área equivalente a 373,3 Ha en caso de totalizar lotes transgénicos y

no transgénicos cubiertos por el estudio. Sin embargo, si sólo se tienen en cuenta las 152,8 Ha de maíz convencional que entraron en el muestreo, el estudio cubrió el 11,29% del área sembrada de maíz del Valle de San Juan.

**Tabla 16.** Tipo y número de lotes muestreados y área equivalente en hectáreas.

Tipo	No. Lotes	No. Hectáreas
Refugio	16	28 Convencional
		125,5 Transgénico
Buffer	13	8,35 Convencional
		95 Transgénico
Raza local	4	2,25
Convencional	27	114,2
TOTAL	60	152,8 Convencional
		220,5 Transgénico

**Figura 24.** Ubicación de los puntos de muestreo. Amarillo: Lotes sembrados con maíz convencional. Azul oscuro: Refugios. Azul claro: Zonas Buffer. Rojo: Lotes sembrados con razas locales



## Análisis de parentales

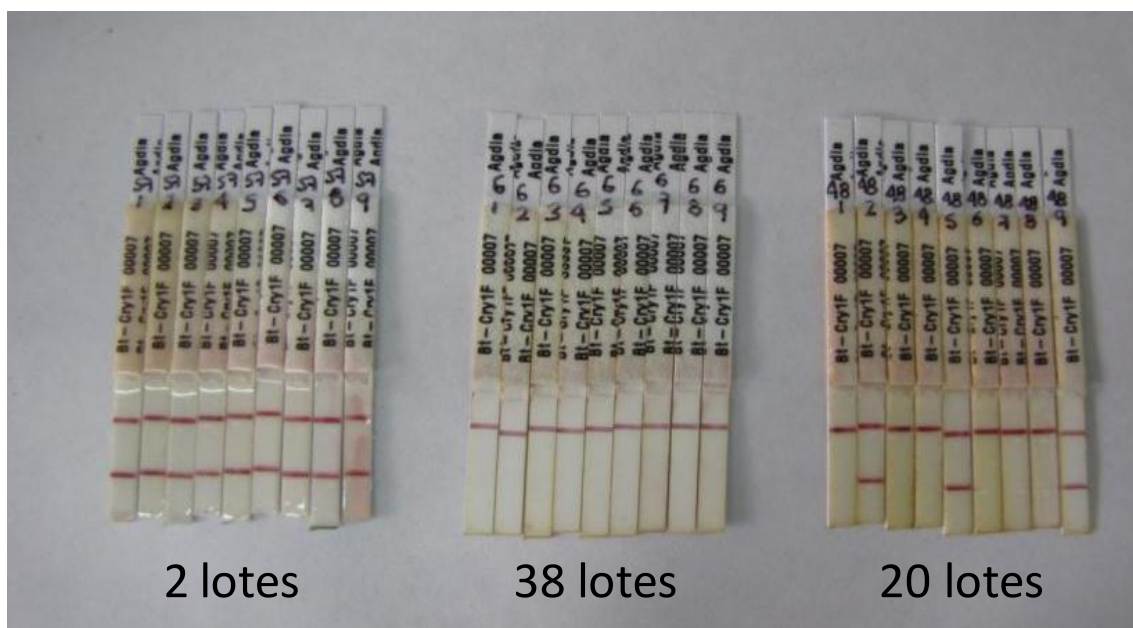
Con la prueba Inmunostrip™ para detectar la proteína *Cry1F*, se encontró que de los 60 lotes muestreados, 2 presentaron positivos para detección de la proteína transgénica en sus 9 plantas madre. 22 lotes tuvieron al menos un individuo que dio un resultado positivo para la prueba inmunostrip y los restantes 38 no presentaron plantas transgénicas en ninguna de las nueve muestras tomadas en cada lote (Tabla 17 y Figura 25).

En la Tabla 17 se especifica el número de lotes que presentaron 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 plantas madre transgénicas de acuerdo a cada categoría de lotes muestreados.

**Tabla 17.** Resultados pruebas Inmunostrip™ para la proteína *Cry1F*

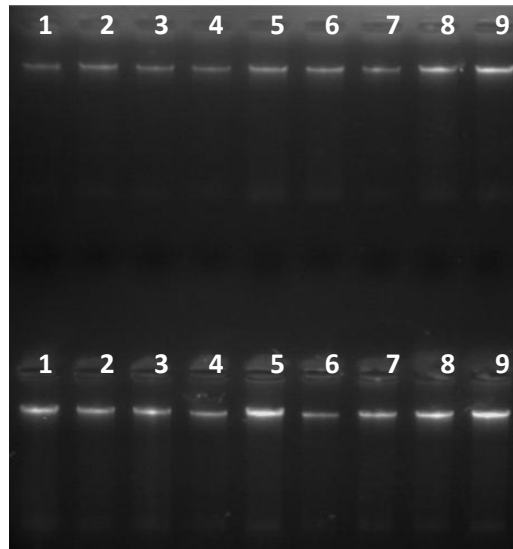
Número de individuos positivos	Maíz Convencional	Zona Buffer	Zona Refugio	Raza local	Número total de lotes
9	0	2	0	0	2
8	0	2	1	0	3
7	1	1	1	0	3
6	1	0	1	0	2
5	0	3	0	0	3
4	0	0	1	0	1
3	0	1	3	0	4
2	0	1	1	0	2
1	0	0	2	0	2
0	25	3	6	4	38
<b>Total Positivos</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>22</b>
<b>Total Negativos</b>	<b>25</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>38</b>

**Figura 25.** Resultados pruebas Inmunostrip™ para la proteína *Cry1F*. Dos lotes con las 9 muestras positivas. Treinta y ocho lotes con las 9 muestras negativas. Veinte lotes con al menos una muestra positiva. Un resultado positivo es aquel en el que se evidencias dos bandas.



Las extracciones de DNA realizadas con las hojas de los 9 individuos de los 38 lotes completamente negativos fueron de buena calidad (Figura 26) y con concentraciones de 112,3 a 859,6 ng/ul, la relación A260/A280 osciló entre 1,58 y 2,01. Se realizaron un total de 342 extracciones de DNA.

**Figura 26.** Extracciones de DNA para los 9 individuos de los lotes 12 (superior) y 15 (inferior).



Con las extracciones de DNA se realizó PCR para amplificar el gen de la zeína como control interno de la reacción, el cual amplificó para todas las muestras evaluadas (Figura 27. A).

Se encontró que de los 38 lotes evaluados (que previamente habían dado negativos para la proteína Cry1F mediante Inmunostrip), sólo 7 dieron negativos para la presencia del promotor 35S y del terminador Nos (Tabla 18 y Anexo 13). Lo cual indica que los 31 lotes restantes, aunque no contienen el transgen Cry1F, pueden contener cualquier transgen de los diferentes eventos de maíz transgénico que han sido liberados en el Departamento del Tolima.

Algunos o todos los 9 individuos evaluados en cada uno de estos 31 lotes fueron positivos para 35S y/o Nos. (Tabla 18 y Figura 27. B y C).

De los 31 lotes que resultaron positivos para PCR:

- 22 son lotes de maíz convencional
- 2 son zona buffer
- 5 son zona refugio
- 2 son lotes de razas locales

De los 7 lotes que resultaron negativos para PCR:

- 3 son lotes de maíz convencional
- 1 son zona buffer
- 1 son zona refugio
- 2 son lotes de razas locales

Adicionalmente, se realizaron PCR para amplificar una región del gen Cry1F, con el fin de validar los resultados obtenidos por Inmunostrip. En ningún caso se obtuvo amplificación para este gen (Figura 27. D) lo cual indica que la prueba Inmunostrip es confiable y no arrojó falsos negativos para las muestras evaluadas.

**Figura 27.** Amplicones obtenidos con las PCR a partir de ADN extraído de hojas.

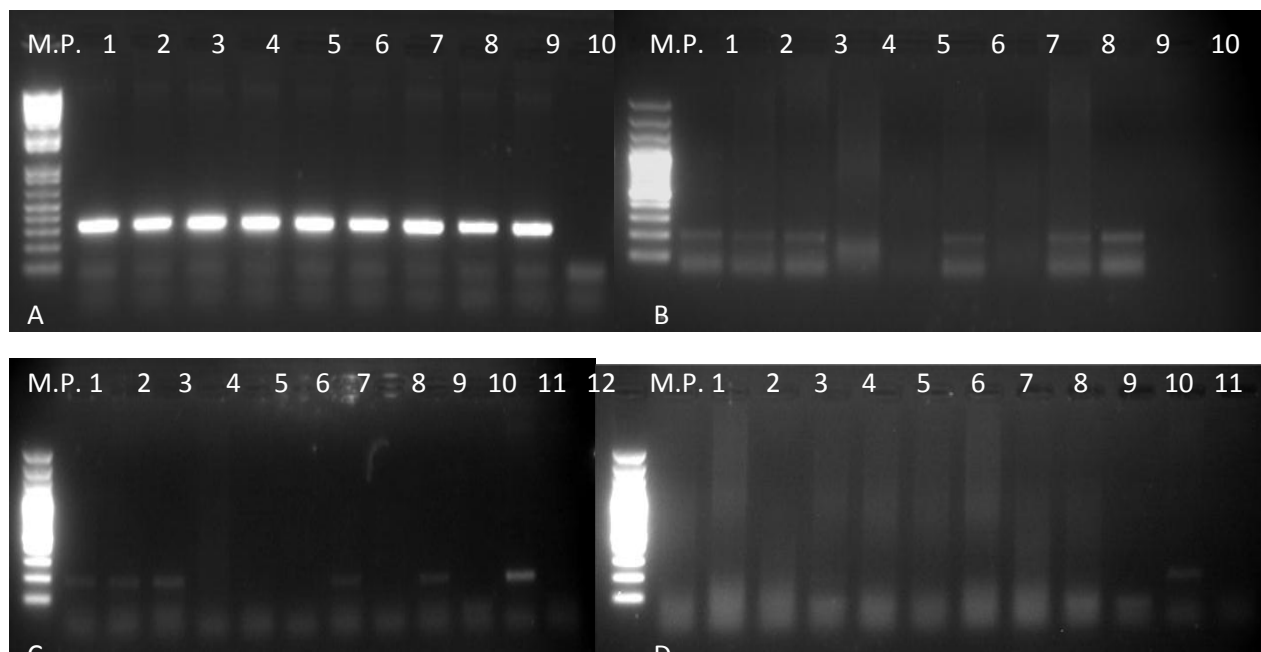
**A. zp1.** Amplicón 329pb. Carril 1 a 9 muestras del Lote 27. 10 Control absoluto (agua).

**B. 35S CaMV.** Amplicón 195pb. Carril 1 a 9 muestras del Lote 3. 10 Control negativo (maíz convencional). 11 Control absoluto (agua).

**C. Nos.** Amplicón 180pb. Carril 1 a 9 muestras del Lote 20. 10. Control negativo (maíz convencional). 11. Control positivo (maíz Yieldgard x Roundup Ready). 12. Control absoluto.

**D. Cry1F.** Amplicón 177pb. Carril 1 a 9 muestras del Lote 17. 10. Control negativo (maíz convencional). 11. Control positivo (maíz Herculex I). 12. Control absoluto.

Para todos los geles M.P. Marcador de peso molecular 100 pb.



**Tabla 18.** Número de lotes encontrados de acuerdo al número de muestras positivas para amplificación del primer 35S CaMV y/o Nos para cada una de las categorías.

Número de muestras positivas	Maíz Convencional		Zona Buffer		Zona Refugio		Raza Local	
	35S CaMV	Nos	35S CaMV	Nos	35S CaMV	Nos	35S CaMV	Nos
0	15	5	2	1	2	1	2	3
1	1	2	0	0	0	0	1	0
2	1	4	0	0	0	1	0	0
3	0	1	0	2	1	0	0	1
4	3	5	0	0	0	3	1	0
5	1	3	0	0	2	1	0	0
6	3	3	1	0	1	0	0	0
7	1	1	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	1	0	0	0	0	0	0
No. total de lotes negativos para ambos primers	3		1		1		2	
No. total de lotes positivos para por lo menos uno de los dos primers	22		2		5		2	

En conjunto, estos resultados son una prueba del flujo de genes vía semilla que se dio en la región del Valle de San Juan durante el primer semestre de 2010.

Se ha establecido que el flujo de genes puede ocurrir vía polen o vía semillas (Kim *et al.*, 2008), de acuerdo a esto, el presente estudio demuestra la existencia de flujo de transgenes vía semilla y via polen en el Valle de San Juan en el primer semestre de 2010 en cultivos de maíz convencional y la raza local clavo.

De acuerdo a la revisión de la posición geográfica de los lotes de maíz no transgénico, este flujo (vía semilla y vía polen) se da a distancias desde los 100 m hasta los 2 km.

El flujo de genes vía semilla puede explicarse por la germinación de semillas transgénicas que cayeron involuntariamente en estos lotes o porque dichas semillas que fueron diseminadas o esparcidas por el viento, aunque este caso es poco probable, debido al tamaño y al peso de las semillas de maíz.

Otra razón puede ser por contaminación de la semilla que se siembra inicialmente, es decir que el agricultor confía en que su semilla es una semilla no transgénica, pero en realidad, puede contener algunos granos de maíz transgénico.

También puede ser el resultado de que las semillas transgénicas son sembradas inadvertidamente durante la cosecha o errores humanos cometidos durante la siembra, cosecha o procesamiento de la semilla producen este tipo de flujo de transgenes.

Lo anterior se soporta con la cultura de uso de la semilla de la región. En el Valle de San Juan, los agricultores siembran la semilla a chuzo o contratan máquinas sembradoras, las cuales son utilizadas por diferentes agricultores, lo cuales también siembran maíz transgénico. Algunas semillas transgénicas pueden quedar en la sembradora y al iniciar la siembra en un lote destinado para maíz convencional, caen en el lote inadvertidamente, generando flujo de genes vía semilla y convirtiéndose en un foco para el flujo de genes vía polen en el interior de un lote de maíz no transgénico.

También 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 (SIOVM, en línea).

Una situación similar ocurre en los refugios o zonas buffer. El agricultor no tiene cuidado de demarcar claramente estas zonas y no verifican con rigurosidad que tipo de semilla es la que se está sembrando.

El muestreo en la zona buffer y en el refugio se realizó en compañía de los dueños de cada lote, por tal razón no cabe la posibilidad de haber muestreado en sitios equivocados, sin embargo, es posible que la información que nos dieron acerca de la ubicación de estas zonas fuera errónea y que se hayan ignorado o incumplido las disposiciones legales vigentes sobre el establecimiento de refugios y zonas buffer.

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 (Kim *et al.*, 2008).

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 (Mellon y Rissler, 2004, Heuberger *et al.*, 2010.) 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 (Heuberger *et al.*, 2010).

Con base en los resultados anteriores, el análisis de progenie se continuó con los 7 lotes señalados. Aunque en algunos de los 31 lotes restantes sólo una o dos plantas dieron positivas para la amplificación de las secuencias del promotor 35S y el terminador Nos, dichos lotes se descartaron del análisis posterior ya que con al menos un individuo transgénico dentro de un lote, aumenta la posibilidad de encontrar resultados positivos para el flujo de genes vía polen, lo cual sesgaría los resultados que se encuentren en cuanto a hibridación de organismos no transgénicos con organismos transgénicos.

### Análisis de progenie

En el análisis a los 7 lotes, se mezclaron las semillas de cada uno de los 9 individuos de cada lote. En el caso de las razas locales, en donde 2 lotes fueron positivos para flujo de genes vía semilla y 2 fueron negativos, se realizó un análisis diferente.

Dentro de los lotes de razas locales que tuvieron individuos positivos (Lote 5 y 29) se separaron las mazorcas provenientes de las plantas positivas de las mazorcas provenientes de las plantas negativas. Con el fin de evaluar, por un lado, si la progenie continuaba con los transgenes y por el otro para evaluar en las progenies de parentales negativos si había evidencia de eventos de hibridación.

Adicionalmente, teniendo en cuenta que la raza local es de grano blanco y los eventos transgénicos liberados en la región son de maíz de grano amarillo, algunas mazorcas de la raza local presentaron efecto Xenia (Figura 28). Por dicha razón, se realizó una mezcla por separado de los granos blancos y los granos amarillos (Figura 28). Con el fin de verificar que los eventos de hibridación (evidentes fenotípicamente en el caso de los granos amarillos) se están dando con plantas de maíz transgénico. Es importante aclarar que esta hipótesis no es del todo cierta, ya que los granos amarillos pueden originarse por transposones y no necesariamente por hibridación con plantas de maíz de grano amarillo.

**Figura 28.** Izquierda. Imagen de una mazorca de la raza local clavo con efecto Xenia. Centro. Mezcla de granos con la presencia de un grano amarillo. Derecha. Colores de grano encontrados en las mazorcas de la raza local clavo.



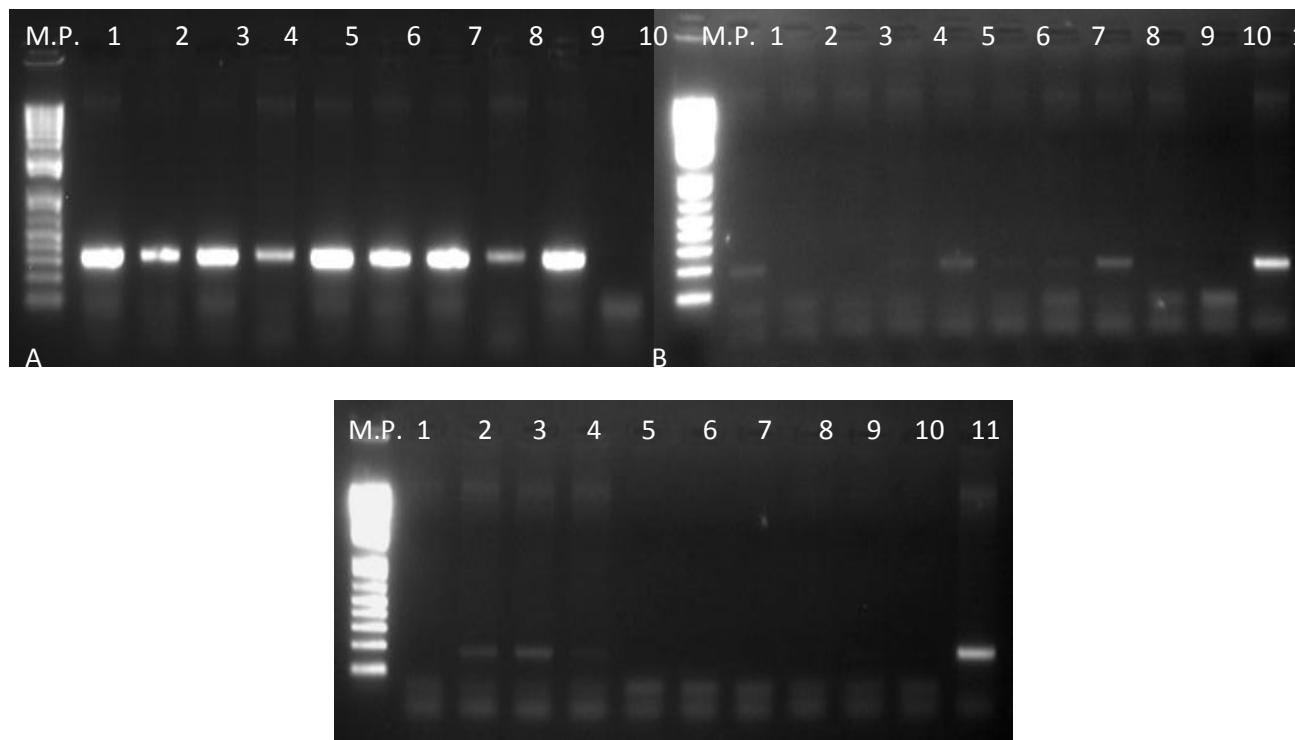
Una vez se realizaron las mezclas de semilla con base en las separaciones indicadas anteriormente, se hicieron las extracciones de DNA y las PCR usando los primers para el promotor 35S CaMV, el terminador Nos y el gen de la zeína (Figura 29). Los resultados se presentan en la tabla 19, en donde se indica para el caso de las pruebas con razas locales, con el número de lote y la letra A, las mezclas de granos amarillos, con el signo + las mezclas de granos provenientes de parentales transgénicos y con el signo – las mezclas de granos provenientes de parentales no transgénicos.

**Figura 29.** Amplicones obtenidos con las PCR a partir de ADN extraído de hojas.

**A. zp1.** Amplicón 329pb. Carril 1 a 9 muestras de los Lotes 6, 7 y 8. 10 Control absoluto (agua).

**B. 35S CaMV.** Amplicón 195pb. Carril 1 a 9 muestras de los Lotes 7, 26 y 29-. 10 Control negativo (maíz convencional). 11 Control positivo (maíz Yieldgard x Roundup Ready).

**C. Nos.** Amplicón 180pb. Carril 1 a 9 muestras de los Lote 35, 5+ y 29+A. 10. Control negativo (maíz convencional). 11. Control positivo (maíz Yieldgard x Roundup Ready).



De acuerdo a lo encontrado en las 3 réplicas realizadas para cada muestra, todos los lotes amplificaron en al menos 1 réplica las secuencias de los primers utilizados. Solamente el lote 36A y el 29+A, que corresponden a los granos amarillos del lote 36 y los granos amarillos del lote con un parental transgénico del lote 29 dieron negativos para la presencia de transgenes.

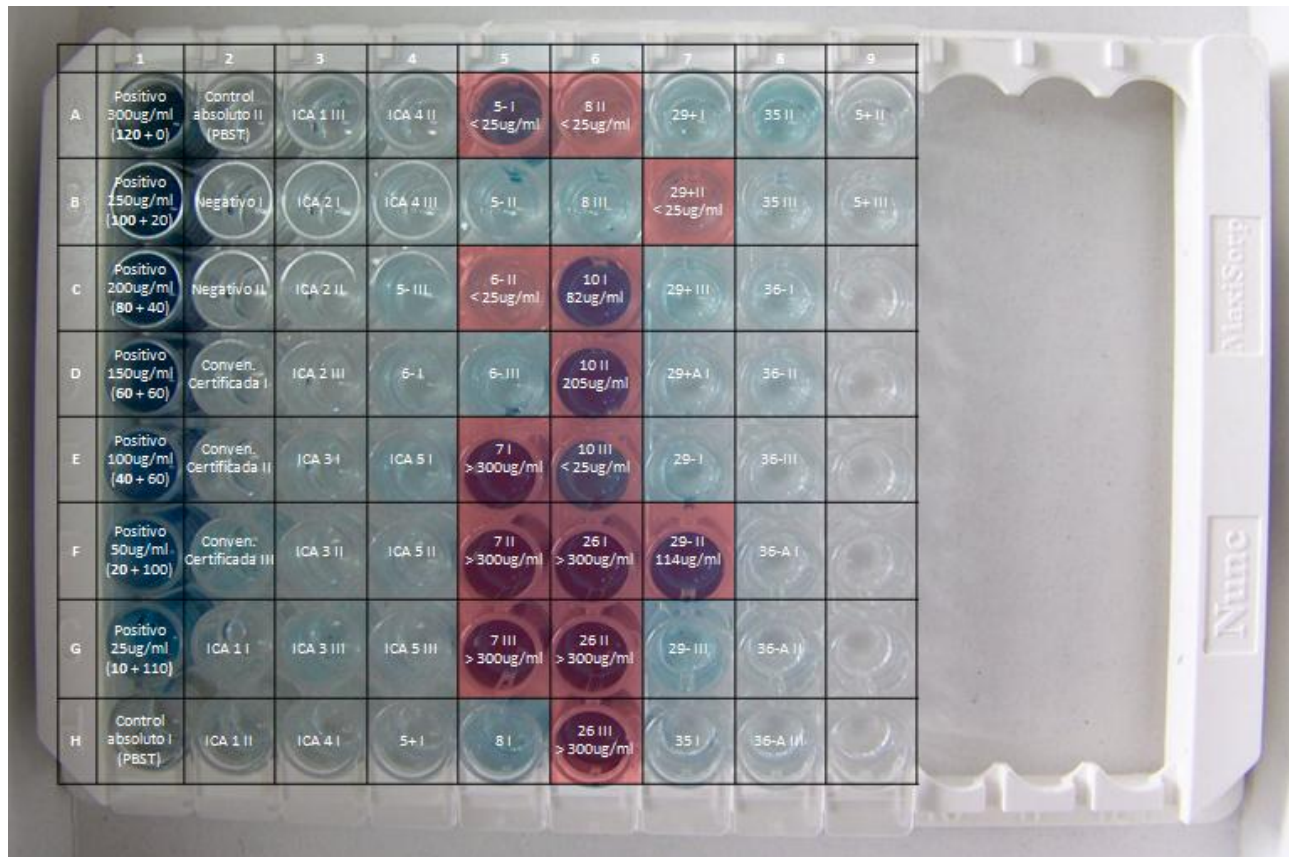
Con el fin de verificar los resultados, se realizó una prueba ELISA para detectar la proteína Cry1F. En este caso, se puede discernir si algunos de los positivos encontrados mediante PCR son eventos transgénicos que contienen el gen Cry1F, en caso de que tuvieran otro transgen, la prueba ELISA daría negativa.

La cantidad de proteína Cry1F en las pruebas de ELISA se cuantificó. Dichos resultados se presentan en Figura 30. En algunos casos los valores de concentración son más altos que en otros, esto se debe a que la extracción de proteína se hizo sobre el macerado de una mezcla de semillas que podían contener tanto granos transgénicos como granos no transgénicos.

**Tabla 19.** Resultados de la PCR para las extracciones de ADN de semillas.

Lote	Tipo de cultivo	35S	Nos	Positivos 35S			Positivos Nos		
				1	2	3	1	2	3
6	Raza local	Neg	Pos						X
7	Refugio	Pos	Pos	X			X		
8	Convencional	Neg	Pos						X
10	Convencional	Pos	Pos			X	X		X
26	Buffer	Pos	Pos	X	X	X	X		
35	Convencional	Pos	Pos		X	X		X	X
36	Raza local	Pos	Pos	X	X	X	X	X	X
36 A	Raza local	Neg	Neg						
5-	Raza local	Neg	Pos				X	X	
5+	Raza local	Pos*	Pos*	X			X		
29-	Raza local	Pos	Pos	X	X		X	X	X
29+	Raza local	Pos*	Pos*		X		X		
29+ A	Raza local	Neg	Neg						

**Figura 30.** Prueba de ELISA realizada en semillas. Se indica el tipo de muestra en cada pozo y la concentración de la proteína Cry1F calculada para cada caso. En rojo se señalan las muestras que dieron positivas para presencia de la proteína Cry1F.



De las 3 réplicas realizadas para cada muestra, al menos 1 réplica de la mayoría de los lotes dio positiva para la presencia de la proteína Cry1F. Exceptuando el lote 35, el 36 y el 36A (Tabla 20).

**Tabla 20.** Resultados de la prueba ELISA en semillas.

Lote	Tipo de cultivo	ELISA Cry1F	Positivos Cry1F		
			1	2	3
6	Raza local	Pos		X	
7	Refugio	Pos	X	X	X
8	Convencional	Pos		X	
10	Convencional	Pos	X	X	X
26	Buffer	Pos	X	X	X
35	Convencional	Neg			
36	Raza local	Neg			
36 A	Raza local	Neg			
5-	Raza local	Pos	X		
5+	Raza local	Neg			
29-	Raza local	Pos		X	
29+	Raza local	Pos		X	
29+ A	Raza local	Neg			

Si se reúnen los resultados obtenidos por cada una de las vías experimentales para analizar la progenie, se concluye que existe flujo de genes vía polen en los 7 lotes evaluados (Tabla 21).

**Tabla 21.** Comparación de los resultados obtenidos por PCR y por ELISA en semillas.

Lote	Tipo de cultivo	PCR 35S y/o Nos	ELISA Cry1F
6	Raza local	Pos	Pos
7	Refugio	Pos	Pos
8	Convencional	Pos	Pos
10	Convencional	Pos	Pos
26	Buffer	Pos	Pos
35	Convencional	Pos	Neg
36	Raza local	Pos	Neg
36 A	Raza local	Neg	Neg
5-	Raza local	Pos	Pos
5+	Raza local	Pos*	Neg
29-	Raza local	Pos	Pos
29+	Raza local	Pos*	Pos
29+ A	Raza local	Neg	Neg

En el caso de los lotes 35, 36 y 5+, aunque dieron positivos para la prueba de PCR, dieron negativos para la prueba ELISA, lo cual indica que el flujo de transgenes vía polen, no se dio por parte de maíz transgénico que contenga el gen Cry1F.

Los resultados concuerdan en ambas pruebas para el caso del lote 36A y el 29+A, lo cual indica los granos amarillos de las mazorcas de lote 36 no son transgénicos, a pesar de que los granos blancos si lo son, aunque sus parentales no fueran transgénicos.

Si la planta madre es no transgénica y llegó a cruzarse con un organismo transgénico que es hemicigótico para el transgen, entonces el transgen en la progenie se encontrará en una proporción 1:1. Si representamos la presencia de transgen con una A, entonces tendríamos la siguiente situación:

Planta madre no transgénica 0 0	x	Padre transgénico A 0
Progenie	:	A 0 : 0 0

Esto explica el porqué parte de las semillas de la progenie del lote 36 son transgénicas pero las semillas amarillas del lote 36 no lo son.

Sin embargo, también es importante tener en cuenta que el maíz es una planta alógama, por tal razón, cada uno de los granos equivale a un evento independiente de polinización. Así que no necesariamente, cada uno de los granos de polen que fecundaron a la planta madre no transgénica son de un padre transgénico.

En cuanto al lote 29+A, las semillas dieron negativas para presencia de transgenes a pesar de que provenían de plantas madres transgénicas. Los granos blancos del mismo lote y provenientes de parentales transgénicos, a diferencia de los granos amarillos, también dieron positivos para la presencia de transgenes.

Lo anterior puede explicarse de la siguiente manera:

Caso 1 (Probable para los granos blancos)

Planta madre transgénica A 0	x	Padre transgénico A 0
Progenie	:	A A : A 0

Caso 2 (Probable para los granos amarillos)

Planta madre transgénica A 0	x	Padre no transgénico 0 0
Progenie	:	A 0 : 0 0

De acuerdo a lo explicado en cada caso, es importante tener en cuenta que la planta madre detectada como transgénica, muy probablemente porta una sola copia de transgen, es decir que es hemicigota. Teniendo en cuenta esto, si llegó a cruzarse con polen de un parental no transgénico, la segregación del transgen en la progenie sería de 1:1. En tal caso, los granos amarillos fueron el producto del cruce con polen de un padre no transgénico. Mientras que los granos blancos que dieron positivos para presencia del transgen, pueden ser el resultado de varios cruces con padres en su mayoría transgénicos.

Otra explicación a estas dos situaciones puede originarse por fallas en la toma de la submuestra para realizar la extracción de DNA y proteína de cada prueba. Aunque se hizo por triplicado, es probable que del polvo fino seleccionado producto del macerado de la mezcla de semillas, se haya tomado una fracción que no contenía ninguna clase de transgenes.

Del análisis de progenie se concluye que existe flujo de genes vía polen en el Valle de San Juan para el primer semestre de 2010, lo que demuestra que en campo están ocurriendo eventos de hibridación entre plantas de maíz transgénico con plantas de maíz no transgénico. A pesar de que estudios

previos del ICA indican que el polen del maíz transgénico no viaja a más de 100 m, el flujo de genes vía polen está ocurriendo y es en gran medida el resultado de un flujo de genes vía semilla que no está siendo controlado, lo cual aumenta la probabilidad de que se presenten eventos de hibridación con padres transgénicos.

También es importante resaltar que en campo no se cumple las disposiciones legales con respecto a las medidas de bioseguridad para la siembra de maíz transgénico en el país y no se maneja las distancias establecidas de aislamiento.

De lo que se encontró en campo, se numeran las siguientes observaciones para el primer semestre de 2010 en el Valle de San Juan:

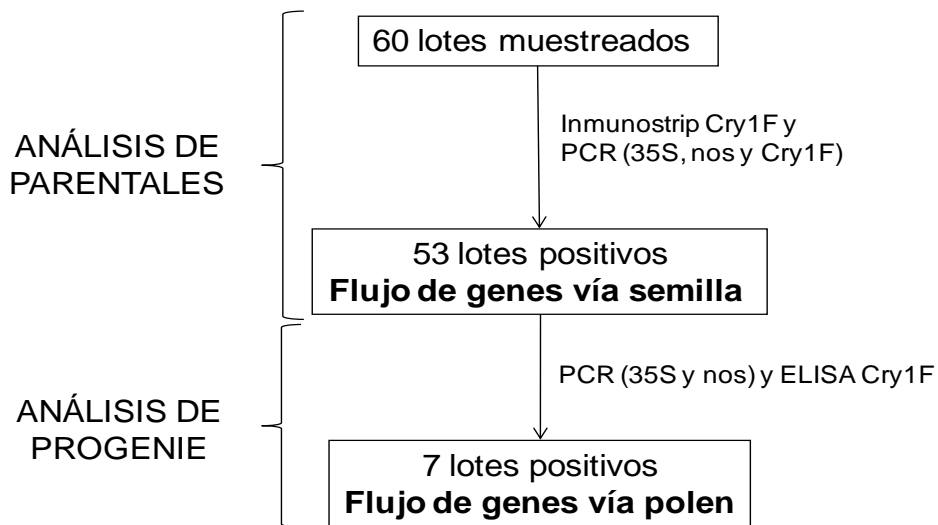
- No hay una distancia de 500 m entre lotes sembrados con razas locales y lotes sembrados con maíz transgénico, que es lo que el ICA reglamenta a través de la resolución 2894 de 2010.
- No todos los lotes de maíz transgénicos tienen refugio **y/o** zona buffer, que a su vez, también está reglamentado bajo la misma resolución del ICA.
- Utilizan un lote convencional como refugio para varios lotes y no se guarda la proporción 10:90.
- Algunos agricultores de la región reutilizan la semilla, incluso la transgénica.
- Las plagas no son un problema crucial para los productores de la zona.
- Antes sembraban maíz transgénico de la compañía Monsanto pero dejaron de utilizarlos por bajos rendimientos. Algunos están inconformes con los transgénicos de Pioneer que actualmente siembran.
- En la zona los agricultores no piden asesorías agronómicas sino que hacen las diferentes aplicaciones de acuerdo a su criterio.
- Reciben visitas del ICA y de Pioneer. A pesar de ello, es evidente que los agricultores no cumplen la normatividad.
- En las veredas Capote, La Manga y Santa Rosa hay pocos lotes transgénicos en la actualidad, pero antes los hubo. Por los malos resultados, los agricultores dejaron de sembrar los maíces GM.
- En algunos lotes se evidencia efecto Xenia

Teniendo en cuenta las observaciones y los resultados obtenidos de la prueba piloto, se puede concluir que no se están cumpliendo las normas de bioseguridad en el Valle de San Juan.

Aunque las disposiciones legales existen, no existe un control sobre cómo se están cumpliendo las normas.

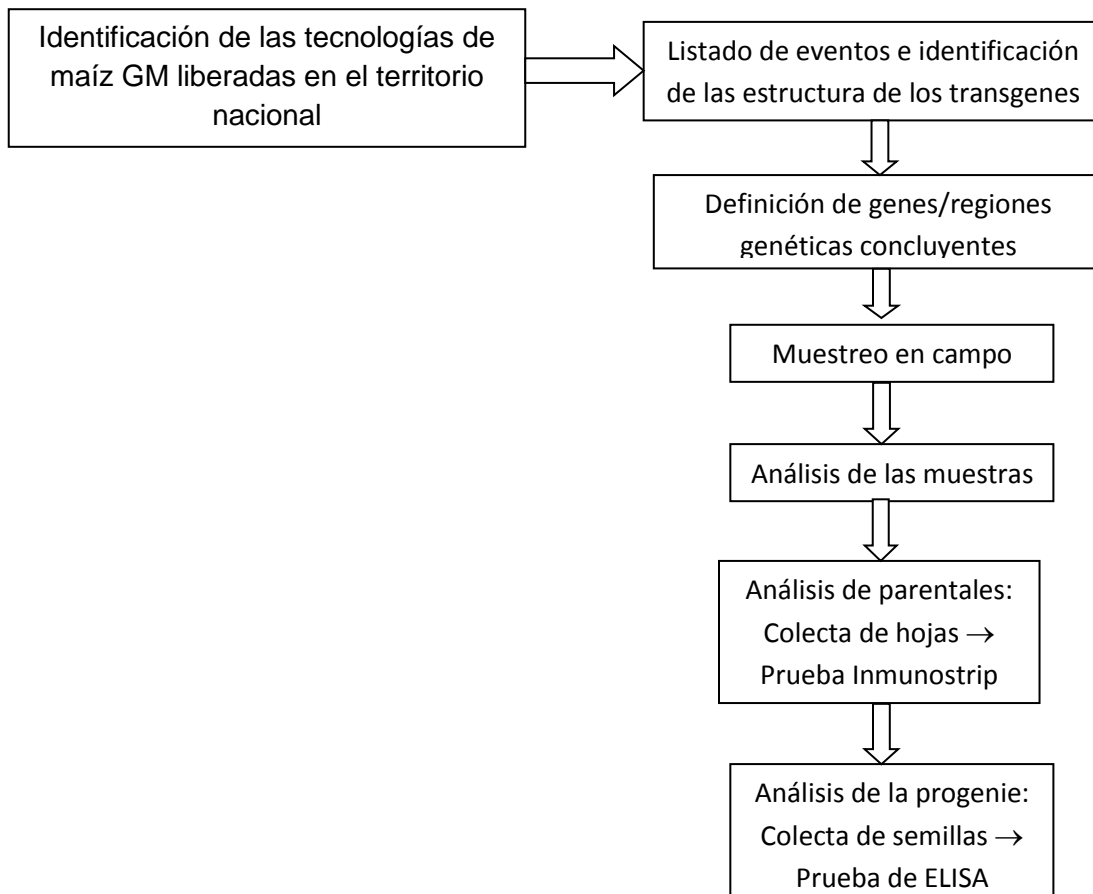
Por tal razón, este trabajo es un insumo para proponer estrategias para el monitoreo del flujo de genes, que a su vez, pueden ayudar en su prevención o disminución por la vía de la semillas y la vía del polen.

Finalmente, a continuación se presenta un esquema en el que se resumen los resultados obtenidos.



### 3.7 PROPUESTA DE MONITOREO DEL FLUJO DE GENES APLICABLE A LAS TECNOLOGÍAS TRANSGÉNICAS LIBERADAS COMERCIALMENTE EN LA AGRICULTURA COLOMBIANA

#### Esquema general



Se recomienda manejar las muestras siguiendo una cadena de custodia, por tal razón se propone que dos personas realicen el muestreo y el análisis de los parentales en campo y dos personas diferentes realicen el análisis de la progenie en laboratorio.

## Metodología de muestreo

Para realizar el monitoreo del flujo de genes se propone:

1. Identificar las tecnologías de maíz GM liberadas en el territorio nacional, realizar un listado de los eventos, identificar la estructura de cada uno de los transgenes y con base en eso, determinar los genes o regiones genéticas concluyentes con el fin de diseñar los primers.

De acuerdo a la situación actual del maíz transgénico en Colombia, los transgenes de los eventos a evaluar porque se encuentran liberados bajo siembra controlada son:

- Cry1F / PAT
- CP4EPSPS
- Cry1Ab
- Cry1F / PAT / CP4EPSPS
- Cry1Ab / CP4EPSPS
- Cry1Ab / PAT
- Cry1Ab / PAT / mEPSPS

Con base en esta información, los transgenes concluyentes, es decir, aquellos con los que se pueden identificar todos los eventos transgénicos liberados en el territorio nacional, ya que son comunes entre ellos son:

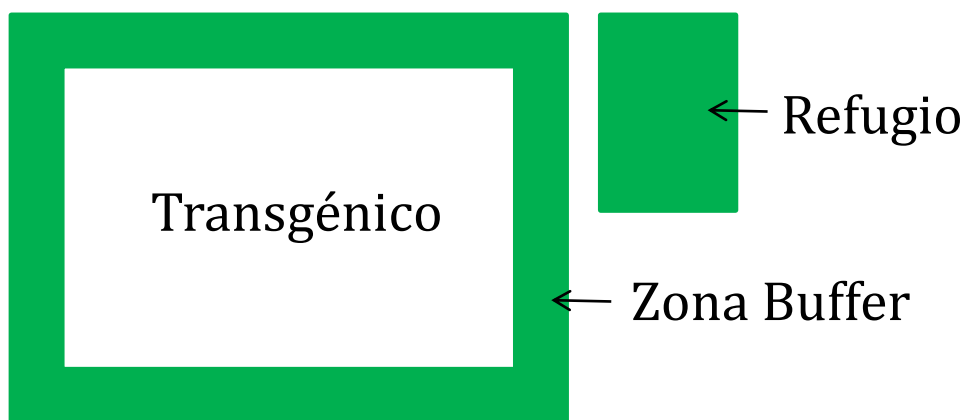
- Cry1Ab
- Cry1F ó PAT
- CP4EPSPS

2. Diseñar el muestreo. Se recomienda seleccionar por lo menos 3 municipios por departamento para hacer las colectas. Teniendo en cuenta que en Colombia hay 9 departamentos con maíz transgénico, entonces el sistema de monitoreo nacional comprende el muestreo de un total de 27 localidades:

- Recopilar información sobre la ubicación de los lotes sembrados con maíz en la localidad de estudio y ubicarlos en un mapa de la región.
- Realizar una visita previa a campo con el fin de verificar la información previamente recopilada y complementar el mapa en caso de que existan sitios nuevos para el muestreo.
- Seleccionar los sitios de muestreo de forma aleatoria dentro de cada categoría a evaluar (razas locales, maíces convencionales, maíces transgénicos (zona refugio y zona buffer) y parientes silvestres). La aleatoriedad es importante, ya que como se demostró con los resultados de la prueba piloto, no necesariamente el distanciamiento o la cercanía a un lote transgénico disminuye o aumenta las probabilidades de encontrar flujo de genes vía semilla o polen, dado que dicho fenómeno está ampliamente influenciado por la cultura de la semilla de cada localidad.

3. Realizar el muestreo en:

- Lotes sembrados con maíz transgénico. En este caso, el muestreo se realizaría en la zona buffer y/o en el refugio (especificar en caso de que el refugio sea transgénico). El muestreo se debe realizar en por lo menos el 10% de los lotes de maíz transgénico de la localidad (municipio).



- Lotes sembrados con razas locales o criollas de maíz. El muestreo se debe realizar en por lo menos el 10% de los lotes sembrados con razas locales de maíz de la localidad (municipio).
- Lotes sembrados con maíz convencional. El muestreo se debe realizar en por lo menos el 10% de los lotes sembrados con maíz convencional de la localidad (municipio).
- Zonas con parientes silvestres. Muestrear cada una de las poblaciones que se localicen en cada localidad, tomar muestras de 3 plantas por población.

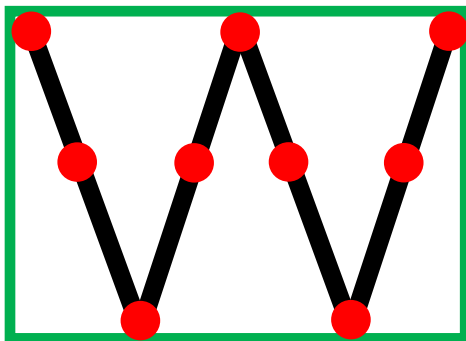
En cada sitio de muestreo registrar en la libreta de campo la siguiente información: Número del lote, fecha de colecta, vereda, finca, propietario, georeferenciación, número de hectáreas, tipo de cultivo, responsable de la colecta, fecha de siembra, fecha de floración, tener en cuenta el cálculo de la distancia con respecto al cultivo GM más cercano e información de la historia de siembra del lote y los datos de velocidad y dirección del viento en el campo.

Es importante anotar que el arreglo espacial de los muestreos debe depender de las condiciones locales de seguridad y accesibilidad.

Adicionalmente, el MAVDT debe encargarse de resolver el tema de acceso a recursos genéticos para el caso de parientes silvestres, de acuerdo a la Decisión 391.

### **Análisis de parentales**

En los lotes sembrados con razas locales, maíces convencionales y en los refugios de lotes sembrados con maíz transgénico se deben tomar muestras de 9 plantas, haciendo un recorrido en forma de W.



De cada planta se debe colectar una hoja joven verde y sana y se aplica la prueba Inmunostrip para el análisis del parental. Se deben utilizar tubos eppendorf de 1,5 ml y puntas azules de micropipeta (100-1000  $\mu$ L) con la punta quemada. Limpiar el material vegetal con una toalla absorbente humedecida con alcohol al 70% y secarla con otra toalla. Se toman dos o tres fragmentos de 1  $\text{cm}^2$  de

la hoja, se depositan dentro del tubo, se agregan 400 ul del buffer de extracción SEB4 que viene junto con las tirillas de inmunostrip y se macera con una punta azul de micropipeta.

Se debe realizar el procedimiento preferiblemente con guantes y los tubos eppendorf y las puntas debe ser esterilizadas durante 20 minutos a 121°C y 15 PSI de presión.

La metodología seleccionada es la de Inmunostrip, la ventaja que presenta es que la tirillas se pueden utilizar en campo, lo cual evita el transporte de mazorcas cuyos padres sean positivos y que luego no vayan a ser incluidas en el análisis del flujo de genes vía polen. Adicionalmente, el modelo experimental utilizado, demostró que es una metodología confiable. Las tirillas de Agdia que se utilizarían son:

- Una sola tirilla para Bt-Cry1F and Bt-Cry1Ab/1Ac with CP4 mEPSPS (No. Cat. STX 13200)

O dos tirillas:

- Bt-Cry1Ab/1Ac with Roundup Ready® (No. Cat. STX 74500)
- Bt-Cry1F (No. Cat. STX 10301)

Si la prueba da negativa (una sola banda), se procede a coleccionar una mazorca de la planta. Se muestrean todos los individuos del lote y en el caso que se encuentre un transgénico en el lote (prueba inmunostrip positiva), se tomará como flujo de genes vía semilla y no se utilizará para el análisis de flujo de genes vía polen, es decir que en este caso no se coleccionará ninguna mazorca del lote.

Para el caso de la zona buffer, se coleccionan hojas y mazorcas de 9 plantas tomadas al azar siguiendo el borde del cultivo transgénico.

Para las poblaciones de parientes silvestres, se toman muestras de 3 plantas por cada población encontrada en la localidad.

## **Análisis de progenie**

Las nueve mazorcas de cada lote se deben almacenar en bolsas Ziploc y luego deben ser desgranadas. Los granos totales de cada mazorca se empacan por separado en bolsas de papel previamente marcadas con el número de lote y de muestra para su transporte y almacenamiento.

Las muestras se transportan y almacenan al laboratorio siguiendo una cadena de custodia a temperatura ambiente y con humedad baja.

Como medida preventiva, es necesario hacer la aplicación del insecticida Lorsban® y del fungicida Vitavax®, para evitar también contaminación por hongos proveniente de la humedad generada por la aplicación del insecticida.

Se sugiere preferiblemente coleccionar mazorcas con evidencia de efecto Xenia y si es posible hacer un análisis por separado de granos blancos y granos amarillos, en casos en los que por el fenotipo del maíz no transgénico sea posible discernir por color de grano, semillas cuyos padres potencialmente puedan ser transgénicos.

Para el análisis de flujo de genes vía polen se propone realizar pruebas de ELISA, ya que su uso resulta más económico y más sencillo de emplear. Las pruebas se harían por triplicado sobre la mezcla de granos de las mazorcas seleccionadas dentro de un lote. Se utilizarían las pruebas de ELISA de Agdia:

- Bt-Cry1Ab/1Ac (No. Cat. PSP 06200)
- Bt-Cry1F (No. Cat. PSP 10301)
- Roundup Ready® (CP4 EPSPS) (No. Cat. PSP 74000)

Los resultados que arrojan este tipo de pruebas son cualitativos, en caso de querer hacer un análisis cuantitativo en el que se pueda determinar la concentración de la proteína transgénica en la muestra se recomienda utilizar el kit Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific).

### Desventajas de realizar el análisis a nivel de proteína

- El análisis se reduce a comprobar la expresión del transgen.

Limitaciones de la metodología:

- Pérdida de actividad de los anticuerpos: Cuando las pruebas se almacenan en condiciones inapropiadas como alta humedad y altas temperaturas.
- Nivel de detección: Si la concentración de la proteína transgénica es menor al límite de detección de la prueba, se obtendrán falsos negativos.
- Eficiencia de la extracción: Si no se realiza una buena maceración del tejido vegetal y no se utiliza el buffer adecuado, no se extraen las proteínas de manera correcta.

### Ventajas de realizar el análisis a nivel de proteína

- Procedimientos más fáciles de realizar y en mayor volumen.
- Se evita realizar la extracción de DNA y adicionalmente 3 reacciones de PCR por muestra para cada primer de cada región codificante (Cry1F, Cry1Ab y CP4EPSPS) y una adicional para el primer del control interno de la reacción. Adicionalmente, se deben realizar la espectrofotometría para evaluar la cantidad y calidad del DNA, los geles de agarosa para comprobar la calidad de la extracción del DNA y para visualizar los amplicones.
- Metodología más económica y toma menos tiempo.

### Análisis de costos

	<b>ANÁLISIS DE PARENTALES</b>	<b>ANÁLISIS DE LA PROGENIE</b>	<b>TOTAL</b>
	Prueba inmunostrip	Prueba Elisa	
Costo para una muestra	\$12.200	\$10.500	\$22.700
Costo por lote	\$109.800	\$94.500	\$204.300

En el análisis de costos no se tuvo en cuenta transportes, ni mano de obra. El costo de las pruebas por cada muestra y por lote incluye los fungibles. Los costos de la prueba ELISA se realizarían por triplicado.

## 4. BIBLIOGRAFÍA

- Agrobio. 2010. Estadísticas de cultivos GM 2009. En: [www.agrobio.org /index.php?option=com\\_content&task=view&id=7350](http://www.agrobio.org/index.php?option=com_content&task=view&id=7350). Consulta abril de 2010.
- Agrobio. 2011. Estadísticas de cultivos GM 2010. En: [www.agrobio.org /index.php?option=com\\_content&task=view&id=7350](http://www.agrobio.org/index.php?option=com_content&task=view&id=7350). Consulta julio de 2011.
- 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.
- Amand PC; Skinner DZ y Peaden RN. 2000. Risk of alfalfa transgene dissemination and scale dependent effects. *Theor Appl Genet.* 101: 107-114.
- Bannert M y Stamp P. 2007. Cross pollination of maize at long distance. *European Journal of Agronomy.* 27: 44-51.
- Beckie HJ y Hall LM. 2008. Simple to complex: Modelling crop pollen-mediated gene flow. *Plant Science.* 175: 615-628.
- 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.
- 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.
- 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.
- Brochero MF. 1995. El cultivo del algodón en Colombia y su crisis. Consideraciones para su reactivación. *Produmedios.* 138 p.
- Bushra Ch; Afshan Y; Tayyab H y Riazuddin S. 1999. Mini scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant molecular biology reporter.* 17: 1-7.
- Carpenter JE y Gianessi LP. 2001. Agricultural biotechnology: Updated benefit estimates. National Center for Food and Agricultural Policy. Washington. 46 p.
- 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.
- Chilcutt ChF y Tabashnik BE. 2004. Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. *PNAS.* 101(20): 7526-7529.
- CIP. 1997. Protocolo para extracción de ADN según el método CTAB, modificado en el laboratorio de biología molecular de la subdirección-INIA. Pág. 36. [www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe).

- 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.
- 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.
- 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>.
- 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.
- Freire EC. 2002. Fluxo gênico entre algodoeiros convencionais e transgênicos. *Rev. Bras. Ol. Fibras., Campina Grande*. 6(1): 471-482.
- 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.
- Gómez MI. 2008. Extracción de ADN para especies vegetales. *Corpoica*. 5 p.
- Guillemaut P y Laurence MD. 1992. Isolation of plant DNA: A fast, Inexpensive, and reliable method. *Plant molecular biology reporter*. 10(1): 60-65.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

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

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

Memorias XXIV Congreso ASCOLFI. Armenia. pp. 43-46.

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

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

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.

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

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

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

Silva, C.C.A. 2003. Perspectivas de la utilización de cultivos transgénicos en Colombia. In:

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](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/doctos/consulta_SIOVM.html). Consulta: Agosto de 2010.

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

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

UICN. 2004, Guía Explicativa del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. Unión Mundial para la Naturaleza. Serie de Política y Derecho Ambiental. [http:// www.uicn.org/Bookstore](http://www.uicn.org/Bookstore) 318 p.

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.

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 algodón transgénico. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Cargraphics S.A. 40 p.

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.

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

## 5. ANEXOS

**Anexo 1.** Listado de resoluciones sobre tecnologías en algodón GM liberadas al medio ambiente en el territorio nacional ([www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).

No. Resolución	Año	Objeto	Tecnología	Evento	Transgenes	Características	Región	Compañía
1247	2003	Se autorizan siembras comerciales de algodón.	Bollgard®	MON 531	Cry1Ac	Resistencia a insectos lepidópteros	Caribe húmedo colombiano	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
3440	2003	Se autorizan siembras comerciales de algodón.	Bollgard®	MON 531	Cry1Ac	Resistencia a insectos lepidópteros	Tolima, Huila y Valle del Cauca	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
01005	2004	Se autorizan siembras comerciales de algodón.	Bollgard®	MON 531	Cry1Ac	Resistencia a insectos lepidópteros	Caribe seco colombiano	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
01006	2004	Se autorizan siembras comerciales de algodón.	Roundup Ready	MON 1445	CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato	Caribe húmedo y Caribe seco colombiano	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003851	2005	Adelantar estudios de bioseguridad con algodón.	Bollgard II / Roundup Ready Flex®	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Caribe húmedo, Caribe seco, alto Magdalena, Valle del Cauca y Meta (Tolima, Huila, Valle del Cauca, Meta Córdoba y Cesar).	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003852	2005	Adelantar estudios de bioseguridad con algodón.	Bollgard / Roundup Ready	MON 531 x MON 1445	Cry1Ac + CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Caribe húmedo, Caribe seco, alto Magdalena, Valle del Cauca y Meta (Tolima, Huila, Valle del Cauca, Meta Córdoba y Cesar).	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

000358	2007	Se autorizan siembras comerciales de algodón.	Bollgard y Roundup Ready®	MON 531 x MON 1445	Cry1Ac / CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato. Resistencia a insectos lepidópteros	Alto Magdalena y Valle del Cauca	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
000366	2007	Se autorizan siembras comerciales de algodón.	Roundup Ready	MON 1445	CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Alto Magdalena y Valle del Cauca	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
1726	2007	Se autorizan siembras comerciales de algodón.	Bollgard II / Roundup Ready Flex.	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Alto Magdalena y Valle del Cauca	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
2202	2007	Se amplía la zona para siembra comercial de algodón.	Bollgard®	MON 531	Cry1Ac	Resistencia a insectos lepidópteros	Orinoquía colombiana	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
2203	2007	Se amplían las zonas para siembras comerciales de algodón.	Bollgard II / Roundup Ready Flex®	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Caribe húmedo, Caribe seco, y Orinoquía colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
2204	2007	Se amplían las zonas para siembras comerciales de algodón	Bollgard x Roundup Ready	MON 531 x MON 1445	Cry1Ac + CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Caribe húmedo, Caribe seco y Orinoquía colombiana	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
002943	2007	Se establece que el algodón con esta tecnología es apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo animal.	Bollgard x Roundup Ready	MON 531 x MON 1445	Cry1Ac + CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
002944	2007	Se establece que el algodón con esta tecnología es apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo animal.	Bollgard II / Roundup Ready Flex®	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
0307	2008	Se autoriza el empleo del algodón con esta tecnología como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos.	LiCotton 25®	ACS-GH001-3	PAT	Tolerancia al glufosinato de amonio.		Bayer CropScience S.A.
0310	2008	Se autoriza establecer que el algodón con esta tecnología es apto como materia prima para la	Bollgard II	MON 15985	Cry1Ac y Cry2Ab	Resistencia a insectos lepidópteros		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

		producción de alimentos para consumo de animales domésticos						
0311	2008	Se autoriza establecer que el algodón con esta tecnología es apto como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos	Roundup Ready® Flex	MON 88913	CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
000880	2008	Autoriza la importación de semillas de algodón para adelantar ensayos de Eficacia Biológica y pruebas de evaluación agronómica.	Roundup Ready® Flex	MON 88913	CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena y Orinoquía	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001681	2008	Se autorizan evaluaciones agronómicas y siembras comerciales de algodón.	Bollgard II / Roundup Ready Flex®	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena y Orinoquía	Bayer CropScience S.A.
000682	2009	Se implementa el plan de manejo, bioseguridad y seguimiento para siembras comerciales en el país de algodones genéticamente modificados.					Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena y Orinoquía	
5111	2009	Se ordena el registro de la variedad de algodón DP141 B2RF	Bollgard II / Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Valle Geográfico del río Magdalena	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
5112	2009	Se ordena el registro de la variedad de algodón FiberMax FM 9180 B2F.	Bollgard II / Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Valle Geográfico del río Magdalena y Valle Geográfico del río Cauca	Bayer CropScience S.A.
5113	2009	Se ordena el registro de la variedad de algodón FiberMax FM 9063B2F	Bollgard II / Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Valle geográfico del río Magdalena y Valle geográfico del río	Bayer CropScience S.A.

							Cauca.	
5114	2009	Se ordena el registro de la variedad de algodón FiberMax 9171 B2F	Bollgard II / Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Valle Geográfico del río Magdalena y Valle Geográfico del río Cauca	Bayer CropScience S.A.
5115	2009	Se ordena el registro de la variedad de algodón FiberMax FM 9162B2F	Bollgard II / Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Valle Geográfico del río Magdalena y Valle Geográfico del río Cauca	Bayer CropScience S.A.
1037	2009	Autoriza la importación de semillas de algodón con esta tecnología para adelantar estudios de eficacia biológica y pruebas de evaluación agronómica.	LICotton 25		PAT	Tolerancia al glufosinato de amonio.	Alto Magdalena, Caribe húmedo, Caribe seco, Valle del Cauca y Orinoquía Colombiana	Bayer CropScience S.A.
2403	2010	Se autoriza la ampliación de zonas para siembras comerciales de algodón con la tecnología Liberty Link (LICotton 25)	LICotton 25		PAT	Tolerancia al glufosinato de amonio.	Caribe húmedo	Bayer CropScience S.A.
1258	2010	Se autorizan siembras comerciales de algodón	Roundup Ready Flex	MON 88913	CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato	Caribe Seco, Caribe Húmedo, Orinoquía, Valle Geográfico del río Cauca y Valle Geográfico del río Magdalena.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

**Anexo 2.** Resumen de la situación actual en cultivos de algodón genéticamente modificados liberados en Colombia.

Tecnologías	Transgenes	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, Caibe Húmedo, Orinoquía, Valle Geográfico del río Cauca y Valle Geográfico del río Magdalena.	1258	2010	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
Bollgard x Roundup Ready®	Cry1Ac / CP4 EPSPS	Tolerancia al glifosato. Resistencia a insectos lepidópteros	Estudios de bioseguridad	Caribe húmedo, Caribe 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 / Roundup Ready Flex.	Cry1Ac y Cry2Ab + CP4 EPSPS/CP4 EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato	Estudios de bioseguridad	Caribe húmedo, Caribe 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 CropScience 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 FM 9180	Valle geográfico del río Magdalena y Valle geográfico del río Cauca.	5112	2009	Bayer CropScience S.A.
			Registro de la variedad FiberMax FM 9063B2F		5113	2009	
			Registro de la variedad FiberMax 9171 B2F		5114	2009	
			Registro de la variedad FiberMax FM 9162B2F		5115	2009	
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.

LICotton 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, Caribe seco, Valle del Cauca y Orinoquía Colombiana	1037	2009	Bayer CropScience S.A.
			Ampliación de zonas para siembras comerciales	Caribe húmedo	2403	2010	Bayer CropScience S.A.

**Anexo 3.** Registros biológicos de parientes silvestres que se encuentran en Colombia (Garrido, 2007, 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)

	Nombre	Responsable identificación	Colector	Departamento	Municipio	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud máxima	Altitud mínima
1	<i>Gossypium barbadense</i> L.	Desconocido	Gómez E.	Valle	Robles				1080	1080
2	<i>Gossypium hirsutum</i> L. var. <i>deltapine 16</i>	Desconocido	Escobar L.A., Uribe G.	Tolima	Espinal	Vereda Santana. Finca San Gerónimo			340	340
3	<i>Gossypium hirsutum</i> L. var. <i>deltapine 17</i>	Desconocido	Escobar L.A., Uribe G.	Tolima	Espinal	Vereda Santana. Finca San Gerónimo			340	340
4	<i>Gossypium</i> sp.	Desconocido	Girón M.	Valle	Andalucía	Estación ferrocarril				
5	<i>Gossypium</i> sp.	Desconocido	Girón M.	Valle	Andalucía	Estación ferrocarril				
6	<i>Gossypium barbadense</i> L.	Pérez J.A.	Gómez G.J., Montoya J.A.	Córdoba	Coveñas	Golfo de Morrosquillo				
7	<i>Gossypium herbaceum</i> L.	Duque J., J. M.	Duque J., J. M.	Valle del Cauca		Granja Exp.Palmira.Alt.1088m..			1088.0	1088.0
8	<i>Gossypium herbaceum</i> L.	Duque J., J. M.	Duque J., J. M.	Valle del Cauca		Granja Experimental de Palmira.			1088.0	1088.0
9	<i>Gossypium herbaceum</i> L.	Duque J., J. M.	Duque J., J. M.	Valle del Cauca		Granja Experimental de Palmira.			1088.0	1088.0
10	<i>Gossypium</i> sp.	SIN	García B., H.	Córdoba		Entre Cerete y Ciénaga de Oro, Hacienda La Hermita (Berastegui).			30.0	30.0
11	<i>Gossypium</i> sp.	SIN	García B., H.	Tolima		Carretera entre Honda y Mariquita.	51.927	-748.779	500.0	400.0

12	Gossypium sp.	SIN	Barkley W., F. A.	Córdoba						30.0	30.0
13	Gossypium sp.	Fuertes, Ja.	Saravia, Ca.	Valle del Cauca						1100.0	1000.0
14	Gossypium barbadense L.	Desconocido	Marulanda O., Rodríguez V.	Cesar	San Martín						
15	Gossypium barbadense L.	Bunch P.	Fonnegra R.	Guajira	Barrancas						
16	Gossypium herbaceum L.	Rentería E.	Sierra E., Viviescas N., Marquez A.	Antioquia	Ríonegro					30	30
17	Gossypium barbadense L.	Desconocido	Marquez S., Pineda C.	Chocó	Acandí					5	5
18	Gossypium barbadense L.	Desconocido	Bunch P.	Guajira							
19	Gossypium barbadense L.	Desconocido	Albert L., Santa J.	Magdalena	Santa Marta					30	30
20	Gossypium sp.	Desconocido	Desconocido								
21	Gossypium hirsutum L.	Desconocido	Zarucchi J.L., Barbosa C.	Vichada	Cumarimbo					110	110
22	Gossypium sp.	Desconocido	Zarucchi J.L., Barbosa C.	Vichada	Cumarimbo					110	110

23	Gossypium barbadense L.	Desconocido	Marquez S. y Pineda C.	Chocó	Acandí	San Francisco de Asís	8	-77	5	5
24	Gossypium barbadense L.	Callejas R.	Callejas R.	Antioquia	Medellín				1465	1465
25	Gossypium sp.	Palacios M., Mosquera S.	Palacios M., Mosquera S.	Chocó	Carmen de Atrato	Vereda El Roble			1780	1880
26	Gossypium barbadense L.	Vélez J.G	Vélez J.G, Blandón R.E.	Antioquia	Medellín	Barrio Velódromo, Calle 47D 78A15	6	-76	1530	1530
27	Gossypium sp.	Vélez J.G	Vélez J.G., Blandón J.	Antioquia	Medellín	Barrio Velódromo, Calle 47D 78A15	6	-76	1530	1530
28	Gossypium barbadense L.	Idárraga A.	Aguirre-Corrales H. de J.	Antioquia	Fredonia	Paraje Sabaletas, Finca las Brisas			1420	1420
29	Gossypium barbadense L.	Fuertes J.	Betancur J., Porras J.	Caquetá	San Vicente del Caguán	Vereda Candilejas, Hato El Retorno. Laguna El Retorno. Bosque que rodea la laguna	1	-74	265	265
30	Gossypium sp.	Fuertes J.	Roldán F.J., García L.C., Sylva G., Vásquez P.	Guajira	Maicao	Corregimiento Albania, Carretera Albania a Tabaco, sitio la Estrella, río Ranchería			150	150
31	Gossypium barbadense L.	Caballero R.	Caballero R.		Río Satinga	Vereda San Isidro				
32	Gossypium barbadense L.	Desconocido	Muñoz E.	Antioquia	Montebello	Vereda Sabanitas	6	-76	1300	1300
33	Gossypium sp.	Desconocido	Fonnegra R., Torres H.	Antioquia	Betulia	Paraje Sabaletas			500	500
34	Gossypium sp.	Desconocido	Correa A.	Antioquia	Copacabana-Bello				1600	1600
35	Gossypium sp.	Desconocido	Pérez V.	Antioquia	Hispania				950	950

36	Gossypium sp.	Desconocido	Bunch P.	Guajira		Laguna los Juncos en la carretera entre Tabaco y Estrella				
37	Gossypium sp.	Desconocido	Roldán F.J., García L.C., Sylva G.	Guajira	Maicao	Corregimiento Albania, Carretera Calabazito-Río Ranchería, sitio La Batea	11	-73	120	120
38	Gossypium herbaceum L.	Robledo E.	Desconocido	Antioquia	Medellín					
39	Gossypium barbadense L.	Desconocido	Carvajal M.	Antioquia	Santa fé de Antioquia					
40	Gossypium sp.	Vélez J.G	Vélez J.G, Blandón R.E.	Antioquia	Medellín	Barrio Velódromo, Calle 47D 78A15	6	-76	1530	1530
41	Gossypium barbadense L. var. peruvianum (Cav.) Mauer	Zapata J.	Salas L.	Antioquia	Medellín	Facultad de Agronomía			1540	1540
42	Gossypium barbadense L.	Fuertes J.	Gutiérrez G., Schultes R.E.	Vaupés		Alto Vaupés. Alrededores de Miraflores			300	300
43	Gossypium hirsutum L.	Zapata J.	Pereira A.E.	Antioquia	Puerto Berrio		6	-74	123	123
44	Gossypium hirsutum L.	Hermano Daniel	Hermano Daniel	Antioquia	Medellín	Barrio La América				
45	Gossypium barbadense L.	Killip E.P.	Araque J., Barkley F.	Norte de Santander					120	120
46	Gossypium barbadense L.	Hermano Daniel	Hermano Tomás		Salamina					
47	Gossypium barbadense L. var. peruvianum (Cav.) Mauer	Desconocido	Toro R.	Antioquia	Armenia					

48	Gossypium arboreum L.	de Benavides O.S.	de Benavides O.S	Nariño	Pasto	A 500 m del puente sobre el río Juanambú				
49	Gossypium barbadense L.	Romero-C. R.	Romero-C. R.	Bolivar		Entre Sincelejo y Colosó				
50	Gossypium barbadense L.	Mora L.E.	Mora L.E.	Nariño	Ancuyá	Carretera Ancuya a El Llano			1300	1300
51	Gossypium barbadense L.	de Benavides O.S.	de Benavides O.S	Nariño	Ancuyá	Carretera a Condagua			1350	1350
52	Gossypium sp.	de Benavides O.S.	de Benavides O.S	Nariño	Tablón	Carretera Panamericana. Remolino			900	900
53	Gossypium arboreum L.	Desconocido	Ramírez B. R.	Cauca	Patía	Alrededores de Mojarra			700	700
54	Gossypium arboreum L.	Desconocido	Guerrero O.D.	Nariño	Tumaco	A 500 m del puente sobre el río Juanambú			2	2
55	Gossypium arboreum L.	Desconocido	Ramírez B. R	Nariño	Tumaco	Proximidades de Tangareal			150	150
56	Gossypium sp.	Desconocido	de Benavides O.S	Nariño	Pasto	Puente Juanambú. Carretera Panamericana			1000	1000
57	Gossypium sp.	Desconocido	López-J. G.	Putumayo	Mocoa	Carretera a Condagua			400	500
58	Gossypium herbaceum L.	Carbonó E.	Carbonó E.	Magdalena	Santa Marta	San Pedro Alejandrino, granja de la U.T.M				
59	Gossypium barbadense L.	Romero-C. R.	Romero-C R.	Bolivar		Entre Sincelejo y Colosó				
60	Gossypium barbadense L.	Romero-C. R.	Romero-C R.	Bolivar		Entre Sincelejo y Colosó				
61	Gossypium barbadense L.	Romero-C. R.	Romero-C R.	Magdalena		San Pedro Alejandrino, granja de la U.T.M				

62	Gossypium barbadense L.	Romero-C. R.	Romero-C R.	Magdalena		Eera Inta Sáenz Peña				
63	Algodón		La Rotta, C.	Amazonas	Miriti-Paraná	Santa Isabel, reserva indígena Miraña, chagra de Teresa Miraña.				
64	Algodón		Betancur, J.	Caquetá	San Vicente Del Caguán	vereda Candilejas, hato El Retorno, lag. El Retorno				
65		Cárdenas, D.	Arias, J.C.	Amazonas	Leticia	Cabecera Municipal.				
66	Algodón	Cárdenas, D.	Marín, C.	Putumayo	Mocoa	serranía del Churumbelo, vereda Bajo Afán, sector entre la parcela de estudio Sinchi y el puente sobre el río Mocoa.			800	800
67	Algodón		Díaz, J.	Caquetá	Florencia	vereda La Holanda, finca Villa Lola			551	551
68	Algodón	Alvarado, A.	Alvarado, A.	Amazonas	Leticia	resguardo indígena Ticuna-Uitoto, km 6-11, comunidad indígena Monilla Amena, km 9,8, vía Leticia-Tarapacá			90	90
69	algodón	Cárdenas, D.	Cárdenas, D.	Vaupés	Morichal	gran resguardo indígena del Vaupés, comunidad indígena de Wacurabá, cabecera cñ. Cuduyarí, vegetación creciendo alrededor de la comunidad (cultivada)			300	300
70	Gossypium arborescens L.	Romero C., R.	Jurado, M. T.	Cauca	Popayán	Vereda El Placer.			1800.0	1800.0
71	Gossypium barbadense L.	Fuertes, J.	Betancur B., J. C.	Caquetá	San Vicente del Caguán	Sabasn del Yari, Vda. Candilejas, hato El Retorno.	10.905	-7.428.333	265.0	265.0
72	Gossypium barbadense L.	SIN	Little, E. L. Jr.	Huila	Baraya	.			750.0	750.0

73	Gossypium barbadense L.	Jaramillo M., R.	Pintón, S.	Norte de Santander		Frontera colombo-venezolana, 30km de Rio de Oro por el Caño del Norte.			500.0	300.0
74	Gossypium barbadense L.	Romero C., R.	Romero C., R.	Magdalena		Isla de Salamanca.			0.0	0.0
75	Gossypium barbadense L.	Romero C., R.	Romero C., R.	Bolívar		Entre Sincelejo y Coloso.			0.0	0.0
76	Gossypium barbadense L.	Saravia, Ca.	Saravia T., C.	La Guajira	Uribia	Rumbo a Ipanaru..			0.0	0.0
77	Gossypium barbadense L.	Torres R., J. H.	Torres R., J. H.	Cundinamarca	Nilo	Inspeccion de Pueblo Nuevo, hacienda Palermo y Paguez.			1000.0	1000.0
78	Gossypium barbadense L.	Cuadros V., H.	Cuadros V., H.	Bolívar		Volcanes de lodo de Turbaco.			150.0	150.0
79	Gossypium barbadense L.	Fernández A., J. L.	Fernández A., J. L.	Santander	Suaita	Via San Jospe de Suaita a Guadalupe, trayecto vda. El Placer-San Jose de Suaita.	6.15	-73.35	0.0	0.0
80	Gossypium barbadense L.	SIN	Dugand G., A.	Atlántico	Usiacurí	Camino de Isabel Lopez.			100.0	100.0
81	Gossypium barbadense L.	Fernández A., J. L.	Fernández A., J. L.	Santander	Suaita	Via San Jose de Suaita a Guadalupe, trayecto vda. El Placer-San Jose de Suaita.	6.15	-73.35	0.0	0.0
82	Gossypium barbadense L.	Lowy, P.	Lowy, P.	Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina		Carretable en South End desde Elsy Bay hasta Bloeing Hole.			0.0	0.0
83	Gossypium barbadense L.	Killip, E. P.	Barkley W., F. A.	Norte de Santander		Valle del rio Peralonso, alrededores de Santiago.			120.0	120.0
84	Gossypium barbadense L.	SIN	Flórez, C. A.	Bolívar		Islas de San Bernardo, isla Mucura.			1.0	1.0

85	Gossypium barbadense L.	SIN	Flórez, C. A.	Bolívar		Islas de San Bernardo, isla Mucua.			1.0	1.0
86	Gossypium barbadense L.	Rivera D., O.	Dueñas G., H. del C.	Bolívar	Zambrano	Ciénaga de Zambrano,.			600.0	600.0
87	Gossypium barbadense L.	Espina Z., J.	Córdoba, W. A.	Chocó	Quibdó	Barrio Niño Jesus.			0.0	0.0
88	Gossypium barbadense L.	Rivera D., O.	Pedraza, Pa.	Cundinamarca	Pandi	Vereda El Guarumo.	4.240.224	-7.451.984	550.0	550.0
89	Gossypium barbadense L.	Fernández A., J. L.	Fernández A., J. L.	Santander	Suaita	Zona La Cascada y curva del Viento.	6.15	-73.35	1540.0	1540.0
90	Gossypium barbadense L.	SIN	Flórez, C. A.	Bolívar		Archipiélago de San Bernardo, isla Mucura.			1.0	1.0
91	Gossypium barbadense L.	SIN	Flórez, C. A.	Bolívar		Archipiélago de San Bernardo, isla Mucura.			1.0	1.0
92	Gossypium herbaceum L.	SIN	Duque J., J. M.	Amazonas	Leticia	Trapecio, alrededores de Leticia.			0.0	0.0
93	Gossypium herbaceum L.	SIN	La Rotta, C.	Amazonas		Trapecio amazonico, alrededores de Leticia.			0.0	0.0
94	Gossypium herbaceum L.	Suárez, S.	Arias G., J. C.	Amazonas	Leticia	Cabecera municipal.			0.0	0.0
95	Gossypium herbaceum L.	Cuatrecasas, J.	Cuatrecasas, J.	Casanare	Orocué	.			140.0	140.0
96	Gossypium herbaceum L.	SIN	Pérez A., E.	Cundinamarca	Nilo	.			0.0	0.0
97	Gossypium herbaceum L.	SIN	Pérez A., E.	Cundinamarca	Nilo	.			0.0	0.0
98	Gossypium sp.	SIN	Barkley W., F. A.	Antioquia	Rionegro	Hacienda Montenegro, cerca a la Pintada.	57.433	-7.559.944	600.0	600.0

99	Gossypium sp.	SIN	Cuatrecasas, J.	Magdalena		Sierra Nevada de Santa Marta, southeastern slope hoyo del rio Donachui, ravine SE of Donachui.			1500.0	1350.0
100	Gossypium sp.	SIN	Cuatrecasas, J.	Magdalena		Sierra Nevada de Santa Marta, hoyo del rio Donachi.			1500.0	1350.0
101	Gossypium sp.	SIN	Grant, M. L.	Atlántico	Sabanalarga	12 km of Sabanalarga.			50.0	50.0
102	Gossypium sp.	SIN	Grant, M. L.	Atlántico	Sabanalarga	12 km of Sabanalarga.			50.0	50.0
103	Gossypium sp.	SIN	Plowman, T. C.	Cauca		Houseyard in Finca El Trigal midway between rio Guachicono and Panamerican Highway.			960.0	960.0
104	Gossypium sp.	SIN	Schultes, R. E.	Putumayo	Mocoa	Mocoa y alrededores al norte.			850.0	750.0
105	Gossypium sp.	SIN	Schultes, R. E.	Putumayo	Mocoa	Mocoa y alrededores al norte.			850.0	750.0
106	Gossypium sp.	SIN	Gutiérrez V., G.	Vaupés		Alrededores de Miraflores.			300.0	300.0
107	Gossypium sp.	SIN	Edén, M. J.	Caquetá		Quebrada Anduche, abandoned house site in derived.			0.0	0.0
108	Gossypium sp.	SIN	Duque J., J. M.	Caldas	Chinchiná	Granja cafetera.			1300.0	1300.0
109	Gossypium sp.	Fernández A., J. L.	León, H.	Chocó	Riosucio	Parque Nacional Natural Los Katios, camino a Tilupo, alto via Sautata, desviando por el camino a Tilupo, salto parte baja.			250.0	100.0
110	Gossypium sp.	Fuertes A., J.	Pérez A., E.	Cundinamarca	Tocaima	.			0.0	0.0
111	Gossypium sp.	SIN	Pérez A., E.	Cundinamarca	Tocaima	.			0.0	0.0
112	Gossypium sp.	SIN	Roldán, F. J.	La Guajira	Maicao	Carretera Calabazito-Rio Rancheria, sitio La Batea.	11.133.333	-72.566.666	120.0	120.0
113	Gossypium sp.	SIN	Duque J., J. M.	Caldas	Villamaría	Granja Cafetera de Chinchina.			1300.0	1300.0

114	Gossypium sp.	SIN	Lozano C., G.	Amazonas	Leticia	Camino hacia Tarapaca, km 17.			0.0	0.0
115	Gossypium sp.	SIN	Jaramillo M., R.	Santander	Onzaga	.			3050.0	3050.0
116	Gossypium sp.	SIN	Sierra, E. E.	Santander	Puerto Wilches	.			900.0	900.0
117	Gossypium hirsutum	Mendoza, Humberto	Zarucchi, J.L. y C. Barbosa	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	110	110
118	Gossypium barbadense	Montes, J.	Añez, O., M. Van der Hammen y J. A. Montes	La Guajira	Uribia	Corregimiento de Siapana				
119	Gossypium	Desconocido	Moreno, L.M.	Magdalena		Los Cocos				
120	Gossypium hirsutum	Mendoza, Humberto	Zarucchi, J.L. y C. Barbosa	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	110	110
121	Gossypium barbadense	Sin Dato	S. Márquez	Chocó	Acandí	Sin Dato	838333	-771.167	5	5

**Anexo 4.** Variedades de algodón cultivadas en Colombia, años 1918- 2010 (Norato, 2005, Brochero, 1995, Álvarez, 1990, Garrido, 2007).

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	Stoneville 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 7 <sup>a</sup>	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 5.** Protocolo de extracción de ADN de hojas (Phillips *et al.*, 2003; Falcón y Valera, 2007.)

- 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, rescatar 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 ADN agregando 10 µL de NaCl 2M y 250 µL de isopropanol y reposar la muestra a - 20°C durante 3 horas máximo.
  - Centrifugar por 30 minutos a 12000 gr a 4°C, 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 centrifuga 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 6.** 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L de conjugado enzimático por pozo.
4. Realizar un esquema para identificación de cada uno de los pozos de la prueba. Adicionar 100  $\mu$ L de cada muestra preparada dentro del pozo correspondiente de la prueba. Adicionar 100  $\mu$ L 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 (4°C).
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  $\mu$ L 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 los 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  $\mu$ L 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 7.** Listado de resoluciones sobre tecnologías en maíz GM liberadas al medio ambiente en el territorio nacional ([www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)).

No. Resolución	Fecha	Objeto	Tecnología	Evento	Transgenes	Características	Región	Compañía
003848	Diciembre 16 de 2005	Se autoriza adelantar estudios de bioseguridad con maíz Bt 11 (NB7212 Bt11)	Maíz Bt11	Bt11	Cry1Ab / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Tolima, Valle del Cauca, Meta y Córdoba	Syngenta S.A.
003849	Diciembre 16 de 2005	Se autoriza adelantar estudios de bioseguridad con maíz Roundup Ready®	Maíz Roundup Ready	NK 603	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Tolima, Valle del Cauca, Meta, Cesar y Córdoba	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003850	Diciembre 16 de 2005	Se autoriza continuar los estudios de bioseguridad con maíz Yieldgard®	Maíz Yieldgard	MON 810	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.	Tolima, Valle del Cauca, Meta y Córdoba	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
3853	Diciembre 16 de 2005	Se autoriza adelantar estudios de bioseguridad con maíz Bt Herculex I (Cry1F)	Maíz Bt Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Tolima, Valle del Cauca, Meta y Córdoba	Du Pont de Colombia S.A.
003744	Diciembre 15 de 2006	El maíz Roundup Ready® evento NK 603 es apto para consumo como alimento de animales domésticos	Maíz Roundup Ready	NK 603	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003745	Diciembre 15 de 2006	El maíz Herculex I® evento TC 1507 es apto para consumo como alimento de animales domésticos	Maíz Bt Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.		Du Pont de Colombia S.A.
003746	Diciembre 15 de 2006	El maíz Yieldgard® evento MON 810 es apto para consumo como alimento de animales domésticos	Maíz Yieldgard	MON 810	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
00464	Febrero 26 de 2007	Se autorizan siembras controladas de maíz con la tecnología Bt Herculex I (TC-1507)	Maíz Bt Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Caribe Húmedo	Du Pont de Colombia S.A.

00465	Febrero 26 de 2007	Se autorizan siembras controladas de maíz con la tecnología Yieldgard® (MON 810)	Maíz Yieldgard	MON 810	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.	Caribe húmedo y alto Magdalena	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001365	Junio 4 de 2007	El maíz Yieldgard® X 2 Roundup Ready® (MON 810 X NK 603) es apto para consumo como alimento de animales domésticos	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	MON 810 x NK 603	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001727	Julio 3 de 2007	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz con la tecnología Yieldgard® (MON 810)	Maíz Yieldgard	MON 810	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.	Valle geográfico del río Cauca y Llanos Orientales	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001728	Julio 3 de 2007	Se autorizan siembras controladas de Maíz con la tecnología Roundup Ready® (NK 603)	Maíz Roundup Ready	NK 603	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, alto Magdalena, valle geográfico del río Cauca y Llanos Orientales	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001729	Julio 3 de 2007	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)	Maíz Bt Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Valle geográfico del río Cauca y Llanos Orientales.	Du Pont de Colombia S.A.
2201	Agosto 14 de 2007	Se autorizan siembras controladas de Maíz Yieldgard® (MON 810) + Roundup Ready® (NK 603)	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	MON 810 x NK 603	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, alto Magdalena, valle geográfico del río Cauca y Orinoquia	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
002367	Agosto 28 de 2007	El maíz con tecnología Yieldgard Dos® (MON 89034) es apto para consumo como alimento de animales domésticos	Maíz Yieldgard VT PRO	MON 89034	Cry1A.105 / Cry2Ab2	Resistencia a insectos lepidópteros.		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003351	Diciembre 7 de 2007	Se autoriza ampliar las zonas de evaluación para estudios de bioseguridad con maíz Herculex I (TC-1507)	Maíz Bt Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Zona Cafetera y Caribe seco	Du Pont de Colombia S.A.

309	Febrero 11 de 2008	Se autoriza a Syngenta S. A. el empleo del Maíz Bt11 como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos	Maíz Bt11	Bt11	Cry1Ab / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.		Syngenta S.A.
000646	Marzo 3 de 2008	Se autorizan Siembras Controladas con semillas de maíz Yieldgard a la empresa DuPont de Colombia S.A.	Maíz Yieldgard	MON 810	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.	Caribe húmedo, valle geográfico del alto Magdalena, valle geográfico del río Cauca y Llanos Orientales	DuPont de Colombia S.A.
000859	Marzo 18 de 2008	Se autoriza la importación de semillas de maíz con tecnología Herculex I a la empresa Dow AgroScience S.A. para adelantar ensayos	Maíz Bt Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Caribe Húmedo, Caribe Seco, Valle geográfico del río Cauca, Alto Magdalena, Zona Cafetera y Orinoquía.	Dow AgroSciences de Colombia S.A.
000877	Marzo 25 de 2008	Se autoriza la importación de semillas de maíz MON-00021-9 (Evento GA21) para adelantar ensayos.	Maíz Roundup Ready	GA21	EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Caribe seco, valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena, Zona Cafetera y Orinoquía	Syngenta S.A.
000878	Marzo 25 de 2008	Se autorizan Siembras Controladas de maíz Herculex I (TC 1507) X Roundup Ready (NK 603) en las zonas agroecológicas donde los eventos individuales Herculex I y NK 603 se encuentran autorizados para siembras controladas	Maíz Herculex I x Roundup Ready	TC 1507 x NK 603	Cry1F / PAT / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio y al glifosato.	Caribe húmedo, Caribe seco, alto Magdalena, valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales y Área Cafetera	DuPont de Colombia S.A.
000879	Marzo 25 de 2008	NO se autoriza la importación de semillas de maíz MON-88017-3 (CCR)	Maíz MON 88017	MON-88017-3	Cry3Bb1 / CP4EPSPS	Resistencia a Diabotrica. Tolerancia al glifosato.		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

000881	Marzo 25 de 2008	Se autoriza la importación de semillas de maíz YieldGard VT PRO para adelantar estudios de bioseguridad	Maíz Yieldgard VT PRO	MON 89034	Cry1A.105 / Cry2Ab2	Resistencia a insectos lepidópteros.	Caribe húmedo, Caribe seco, valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena, Zona Cafetera y Orinoquía	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001677	Mayo 28 de 2008	Se autorizan Siembras Controladas con semillas de maíz Herculex I x Roundup Ready a la empresa Dow AgroSciences de Colombia S.A.	Maíz Herculex I x Roundup Ready	TC-1507 x NK-603	Cry1F / PAT / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio y al glifosato.	Caribe húmedo, Caribe seco, alto Magdalena, valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales y Área Cafetera	Dow AgroSciences de Colombia S.A.
001678	Mayo 28 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas para siembras controladas de maíz Herculex I	Maíz Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Alto Magdalena	Du Pont de Colombia S.A.
001679	Mayo 28 de 2008	Se autorizan siembras controladas de maíz Bt-11 (NB-7212 Bt11)	Maíz Bt11	Bt11	Cry1Ab / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Valle geográfico del río Cauca y Caribe húmedo	Syngenta S.A.
001680	Mayo 28 de 2008	Se autorizan siembras controladas de maíz con el evento NK-603 a la empresa DuPont de Colombia S.A.	Maíz Roundup Ready	NK 603	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, valle geográfico del alto Magdalena, valle geográfico del río Cauca y Llanos Orientales	Du Pont de Colombia S.A.
003738	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz Herculex I x Roundup Ready a la empresa Dow AgroSciences de Colombia S.A	Maíz Herculex I x Roundup Ready	TC-1507 x NK-603	Cry1F / PAT / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio y al glifosato.	Área Cafetera	Dow AgroSciences de Colombia S.A.

003739	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz Roundup Ready® a la empresa DuPont de Colombia S.A.	Maíz Roundup Ready	NK 603	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe Seco y Área Cafetera	Du Pont de Colombia S.A.
003740	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz Roundup Ready® a la empresa Compañía Agrícola Colombiana Ltda. y Cía. S.C.A.	Maíz Roundup Ready	NK 603	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe Seco y Área Cafetera	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003741	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembras de maíz con la tecnología Herculex I® a la empresa DuPont de Colombia S.A.	Maíz Herculex I	TC-1507	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Área Cafetera	Du Pont de Colombia S.A.
003742	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz Yieldgard® a la empresa DuPont de Colombia S.A.	Maíz Yieldgard	MON 810	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.	Caribe Seco y Área Cafetera	DuPont de Colombia S.A.
003743	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz Yieldgard® a la empresa Compañía Agrícola Colombia Ltda. & Cía. S.C.A.	Maíz Yieldgard	MON 810	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.	Caribe Seco y Área Cafetera	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003744	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz Yieldgard® x Roundup Ready® a la empresa Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	MON 810 x NK 603	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe Seco y Área Cafetera	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003745	Noviembre 4 de 2008	Se autoriza la ampliación de zonas de siembra de maíz Herculex I x Roundup Ready a la empresa DuPont de Colombia S.A.	Maíz Herculex I x Roundup Ready	TC-1507 x NK 603	Cry1F / PAT / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio y al glifosato.	Área Cafetera	Du Pont de Colombia S.A.

001036	Marzo 16 de 2009	Se autoriza importación de semillas de maíz Yieldgard VT PRO x Roundup Ready 2 para estudios de bioseguridad y evaluación agronómica	Maíz Yieldgard VT PRO x Roundup Ready 2	MON 89034 x NK 603	Cry1A.105 / Cry2Ab2 / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Alto Magdalena, Caribe Húmedo, Caribe Seco, Valle del Cauca y Orinoquia	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003083	Agosto 18 de 2009	Se autoriza el empleo de maíz con la tecnología conjunta Herculex I (TC 1507) X Roundup Ready (NK 603) para consumo directo y/o como materia prima para la producción de alimentos para animales domésticos	Maíz Herculex I x Roundup Ready	TC-1507 x NK 603	Cry1F / PAT / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio y al glifosato.		Du Pont de Colombia S.A.
003656	Septiembre 28 de 2009	Ampliación del híbrido de maíz amarillo con tecnología Bt MAXIMUS Bt11 para la subregión natural de la Orinoquia	Maíz Bt11	Bt11	Cry1Ab / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Orinoquia	Syngenta S.A.
003784	Octubre 6 de 2009	Se autoriza ampliar las zonas de evaluación para estudios de bioseguridad con maíz Yieldgard VT PRO x Roundup Ready 2	Maíz Yieldgard VT PRO x Roundup Ready 2	MON 89034 x NK 603	Cry1A.105 / Cry2Ab2 / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Área Cafetera	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
003787	Octubre 6 de 2009	Se autoriza la ampliación de zonas para siembras controladas de maíz Bt11	Maíz Bt11	Bt11	Cry1Ab / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Orinoquia y valle geográfico del río Magdalena	Syngenta S.A.
005069	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz blanco con tecnología Roundup Ready DK 234 RR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales del ICA	Maíz Roundup Ready	DK 234 RR	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquia Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

005070	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz amarillo con tecnología Roundup Ready DK 003 RR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales del ICA	Maíz Roundup Ready	DK 003 RR	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
005071	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz amarillo con tecnología Yieldgard x Roundup Ready DK 1040 YGRR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales del ICA	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	DK 1040 YGRR	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
005072	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz blanco con tecnología Yieldgard x Roundup Ready DK 777 YGRR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales del ICA	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	DK 777 YGRR	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
005073	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz amarillo con tecnología Yieldgard x Roundup Ready DK 4004 YGRR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales del ICA	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	DK 4004 YGRR	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
005074	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz amarillo con tecnología Yieldgard x Roundup Ready DK 4004 RR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares	Maíz Roundup Ready	DK 4004 RR	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

		Comerciales del ICA						
005075	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz blanco con tecnología Yieldgard x Roundup Ready DK 234 YGRR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales del ICA	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	DK 234 YGRR	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
005076	Diciembre 18 de 2009	Registro del híbrido de maíz amarillo con tecnología Yieldgard x Roundup Ready DK 003 YGRR a la Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A. en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales del ICA	Maíz Yieldgard x Roundup Ready	DK 003 YGRR	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001254	Abril 9 de 2010	Se autoriza el uso del maíz evento MON 88017 como alimento animal o como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos	Maíz MON 88017	MON-88017	Cry3Bb1 / CP4EPSPS	Resistencia a insectos coleópteros. Tolerancia al glifosato.		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
001257	Abril 9 de 2010	Se autoriza la importación de semillas de maíz con el evento MIR162 (SYN-IR162-4) para adelantar ensayos de bioseguridad y pruebas de evaluación agronómica.	Maíz MIR162	SYN-IR162-4	vip3Aa20	Resistencia a insectos lepidópteros.	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Syngenta S.A.
001260	Abril 9 de 2010	Se autoriza la importación de semillas de maíz con tecnología VT Triple PRO (VT3P) (MON 89034 x MON 88017) para adelantar ensayos de investigación en campo.	Maíz VT Triple PRO (VT3P)	MON 89034 x MON 88017	Cry1A.105 / Cry2Ab2 / Cry3Bb1 / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros y coleópteros. Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

002402	Julio 19 de 2010	Se autoriza el empleo de maíz GA21 (MON-00021-9) como alimento o como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos	Maíz GA21	MON-00021-9	mEPSPS	Tolerancia al glifosato.		Syngenta S.A.
002407	Julio 19 de 2010	Se autoriza el empleo de maíz Bt11 x MIR162 x GA21 (SYN-BT011-1 x SYN-IR162-4 x MON-00021-9) como alimento o como materia prima para la producción de alimentos para consumo de animales domésticos	Maíz Bt11 x MIR162 x GA21	SYN-BT011-1 x SYN-IR162-4 x MON-00021-9	Cry1Ab / PAT / vip3Aa20 / mEPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato y al glufosinato de amonio.		Syngenta S.A.
002894	Septiembre 6 de 2010	Se implementa el Plan de manejo, bioseguridad y seguimiento para siembras controladas de maíz genéticamente modificado	Todos	Todos	Todos	Todas	Todas	Todas
002936	Septiembre 6 de 2010	Se autorizan siembras controladas de maíz GA21 (MON-00021-9)	Maíz GA21	MON-00021-9	mEPSPS	Tolerancia al glifosato.	Caribe húmedo, Caribe Seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía.	Syngenta S.A.
003915	Noviembre 24 de 2010	Se autorizan siembras controladas de maíz Bt11 x GA21 (SYNBT011-1 x MON-00021-9)	Maíz Bt11 x GA21	SYNBT 011-1 x MON-00021-9	Cry1Ab / PAT / mEPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato y al glufosinato de amonio.	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquía.	Syngenta S.A.

004469	Diciembre 27 de 2010	Se autoriza la importación de semillas de maíz Herculex RW (DAS-59122-7) para adelantar ensayos de bioseguridad y pruebas de evaluación agronómica.	Maíz Herculex RW	DAS-59122-7	Cry34Ab1 / Cry35Ab1 / PAT	Resistencia a insectos coleópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena, Area Cafetera y Orinoquía Colombiana.	DuPont de Colombia S.A.
004471	Diciembre 27 de 2010	Se autoriza el empleo de maíz MIR162 (SYN-IR162-4) para consumo directo y/o como materia prima para la producción de alimentos para animales domésticos	Maíz MIR162	SYN-IR162-4	vip3Aa20	Resistencia a insectos lepidópteros.		Syngenta S.A.
004473	Diciembre 27 de 2010	Se autoriza el empleo de maíz Herculex RW (DAS-59122-7) para consumo directo y/o como materia prima para la producción de alimentos para animales domésticos	Maíz Herculex RW	DAS-59122-7	Cry34Ab1 / Cry35Ab1 / PAT	Resistencia al gusano de la raíz del maíz. Tolerancia al glufosinato de amonio.		DuPont de Colombia S.A.
004474	Diciembre 27 de 2010	Se autoriza el empleo de maíz Bt11 x GA21 (SYNBT011-1 x MON-00021-9) para consumo directo y/o como materia prima para la producción de alimentos para animales domésticos	Maíz Bt11 x GA21	SYNBT 011-1 x MON-00021-9	Cry1Ab / PAT / mEPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato y al glufosinato de amonio.		Syngenta S.A.
004475	Diciembre 27 de 2010	Se autoriza el empleo de maíz MON 863 para consumo directo y/o como materia prima para la producción de alimentos para animales domésticos	Maíz MON 863	MON-00863-5	Cry3Bb1	Resistencia a insectos lepidópteros.		Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

**Anexo 8.** Resumen de la situación actual en cultivos de maíz genéticamente modificados liberados en Colombia.

<b>Tecnología</b>	<b>Transgenes</b>	<b>Característica</b>	<b>Situación Actual</b>	<b>Región</b>	<b>Compañía</b>
Maíz Herculex I	Cry1F / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera	Du Pont de Colombia
			Evaluaciones Agronómicas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, Alto Magdalena, Área Cafetera y Orinoquia	Dow AgroSciences de Colombia S.A.
Maíz Roundup Ready	CP4EPSPS	Tolerancia al glifosato.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Siembras Controladas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera	Du Pont de Colombia
Maíz Yieldgard	Cry1Ab	Resistencia a insectos lepidópteros.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
			Siembras Controladas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera	DuPont de Colombia S.A.
Maíz Herculex I x Roundup Ready	Cry1F / PAT / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio y al glifosato.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera	Du Pont de Colombia
			Siembras Controladas	Caribe húmedo, Valle geográfico del río Cauca, Llanos Orientales, Alto Magdalena y Área Cafetera	Dow AgroSciences de Colombia S.A.
Maíz Yieldgard x Roundup Ready	Cry1Ab / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle geográfico del río Cauca, Alto Magdalena, Área Cafetera y Orinoquia	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

Maíz Bt 11	Cry1Ab / PAT	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Valle geográfico del río Cauca, Alto Magdalena y Orinoquia	Syngenta S.A.
Maíz Bt11 x GA21	Cry1Ab / PAT / mEPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato y al glufosinato de amonio.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquia.	Syngenta S.A.
Maíz GA21	mEPSPS	Tolerancia al glifosato.	Siembras Controladas	Caribe húmedo, Caribe Seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquia.	Syngenta S.A.
Maíz Yieldgard VT PRO	Cry1A.105 / Cry2Ab2	Resistencia a insectos lepidópteros.	Estudios de bioseguridad	Caribe húmedo, Caribe seco, valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena, Área Cafetera y Orinoquia	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
Maíz Yieldgard VT PRO x Roundup Ready	Cry1A.105 / Cry2Ab2 / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros. Tolerancia al glifosato.	Estudios de bioseguridad y evaluaciones agronómicas	Caribe húmedo, Caribe seco, valle geográfico del río Cauca, alto Magdalena, Área Cafetera y Orinoquia	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.
Maíz Herculex RW	Cry34Ab1 / Cry35Ab1 / PAT	Resistencia a insectos coleópteros. Tolerancia al glufosinato de amonio.	Estudios de bioseguridad y evaluaciones agronómicas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena, Area Cafetera y Orinoquia Colombiana.	DuPont de Colombia S.A.
Maíz MIR162	vip3Aa20	Resistencia a insectos lepidópteros.	Estudios de bioseguridad y evaluaciones agronómicas	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquia Colombiana.	Syngenta S.A.
Maíz VT Triple PRO (VT3P)	Cry1A.105 / Cry2Ab2 / Cry3Bb1 / CP4EPSPS	Resistencia a insectos lepidópteros y coleópteros. Tolerancia al glifosato.	Ensayos de investigación en campo	Caribe húmedo, Caribe seco, Valle Geográfico del río Cauca, Valle Geográfico del río Magdalena y Orinoquia Colombiana.	Compañía Agrícola Colombiana Ltda. & Cía. S.C.A.

**Anexo 9.** Razas locales de maíz en Colombia y su distribución.

Nombre	Región	Abundancia	Origen	Reporte
Blanco	Región Caribe	Abundante		2002
Cacho de buey	Región Caribe	Abundante		2002
Costeño (Cuba)	Tolima, Caldas, Cundinamarca, Antioquia, Santander, Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico, Magdalena, Cesar y Guajira (3 a 2170 msnm)		Raza Híbrida Colombiana entre Cristalino Amarillo del Caribe y Cilíndrico Dentado de Venezuela	1957
Cuba Hoja Blanca	Región Caribe	Abundante		2002
Cuba Hoja Prieta	Región Caribe	Abundante		2002
Puya	Guajira, Magdalena, Cesar, Norte de Santander, Santander y Antioquia (12 a 1000 msnm)		Raza Híbrida Colombiana entre Clavo y Cilíndrico Dentado de Venezuela	1957
Puya Grande	Norte de Santander y Nariño		Raza Híbrida Colombiana entre Clavo y Cilíndrico Dentado de Venezuela	1957
Vela (Puya o Tucita) Blanco	Región Caribe	Abundante		2002
Vela (Puya o Tucita) Amarillo	Región Caribe	Abundante		2002
Cariaco	Tolima, Cundinamarca, Antioquia, Choco, Córdoba, Atlántico, Bolívar y Magdalena (15 a 400 msnm)		Probablemente introducida de Brasil	1957
Cariaco amarillo	Región Caribe	Abundante	Comercial	2002
Cariaco rayado	Región Caribe	Escaso		2002
Cariaco rojo	Región Caribe	Escaso		2002
Azulito	Región Caribe	Escaso		2002
Brisa	Región Caribe	Escaso		2002
Cucaracho	Región Caribe	Escaso		2002
Lomo bayo amarillo	Región Caribe	Escaso		2002
Manteca	Región Caribe	Escaso	Comercial	2002
Minga	Región Caribe	Escaso		2002
Negrito	Región Caribe	Escaso		2002
	Guajira, Magdalena y Atlántico		Raza Híbrida Colombiana	1957
Ojo de gallo	Región Caribe	Escaso		2002
Panó	Región Caribe	Escaso		2002
Piedrita (Piedrecita)	Región Caribe	Escaso		2002
Sangre toro	Región Caribe	Escaso		2002
Tacaloa Amarillo	Región Caribe	Escaso	Comercial	2002
Tacaloa Mojoso	Región Caribe	Escaso		2002
Berrendo	Región Caribe	Perdido		2002
Guajiro (Guajirita)	Región Caribe	Perdido		2002
Huevito	Región Caribe	Perdido		2002
Javao	Región Caribe	Perdido		2002

	Región Caribe	Perdido		2002
Pira	Cundinamarca, Tolima, Huila, Nariño, Valle, Meta y Santander (400 a 2000 msnm)		Raza Primitiva	1957
Pochó	Región Caribe	Perdido		2002
Pompo	Región Caribe	Perdido		2002
Venezolano	Región Caribe	Perdido		2002
Pollo (Gallo)	Cundinamarca y Boyacá (1600 a 2160 msnm)		Raza Primitiva	1957
Pira Naranja	Nariño (980 a 1800 msnm)		Probablemente introducida de Ecuador y Chile	1957
Clavo	Nariño, Tolima, Caldas, Norte de Santander y Choco (670 a 2600 msnm)		Probablemente introducida de Perú	1957
Guirua	Magdalena (1850 a 1870 msnm)		Probablemente introducida	1957
Maíz Dulce	Nariño (2580 msnm)		Probablemente introducida del Ecuador o de Perú	1957
Maíz Harinoso Dentado	Cundinamarca, Nariño, Tolima y Boyacá (380 a 2600 msnm)		Probablemente introducida de Venezuela	1957
Andaqui	Huila, Meta, Caquetá y Putumayo (480 a 700 msnm)		Probablemente introducida	1957
Imbricado	Nariño, Cundinamarca y Boyacá (2000 a 2625 msnm)		Probablemente introducida del Ecuador o de Perú	1957
Sabanero	Nariño, Putumayo, Cauca, Huila, Valle del Cauca, Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Santander y Norte de Santander (800 a 3104 msnm)		Probablemente introducida	1957
Cabuya	Cundinamarca y Norte de Santander (2100 a 2645 msnm)		Raza Híbrida Colombiana entre Sabanero y Clavo	1957
Cacao	Cundinamarca, Boyacá, Santander y Norte de Santander (800 a 1800 msnm)		Raza Híbrida Colombiana entre Sabanero y Costeno	1957
Yucatan	Valle del Cauca, Cundinamarca y Tolima (350 a 1350 msnm)		Raza Híbrida Colombiana entre Comun y Andaqui.	1957
Montana (Campoalegre, Limeno)	Nariño y Antioquia (1600 a 2600 msnm)		Raza Híbrida Colombiana entre Sabanero y Pira Naranja	1957
Capio	Nariño y Antioquia (2120 a 2600 msnm)		Raza Híbrida Colombiana entre Sabanero y Pira Naranja. Es una sub raza del Montana	1957
Amagaceno (De ano, Yunga)	Nariño, Cauca, Valle, Huila, Tolima, Caldas, Antioquia, Cundinamarca,		Raza Híbrida Colombiana entre Montana y Chococeno	1957

	Boyacá, Choco y Norte de Santander (600 a 2594 msnm)			
Comun (Diente de caballo)	Nariño, Cauca, Valle, Huila, Caquetá, Tolima, Caldas, Antioquia, Cundinamarca, Santander, Magdalena (127 a 2193 msnm)		Raza Hibrida Colombiana entre Costeno y Amagaceno	1957
Chococeno	Nariño, Cauca, Valle del Cauca, Choco y Antioquia (0 a 200 msnm)		Raza Hibrida Colombiana entre el maiz confite peruano y Tripsacum	1957



#### 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 11.** Protocolo de extracción de ADN en hojas de maíz. Tomado y modificado a partir de Phillips *et al.* (2003)

Para la extracción de ADN en hojas de maíz se utilizó un protocolo con el siguiente procedimiento:

- Colocar cuatro fragmentos cuadrados de hoja de maíz de aproximadamente 1.5 cm<sup>2</sup> en un tubo eppendorf.
- Agregar 200 µL el buffer de extracción 2X CTAB y macerar
- Agregar 400 µL del buffer y continuar con la maceración del tejido vegetal.
- Agregar otros 400 µL del buffer, agitar en un vortex y centrifugar a 10.000 rpm, por 5 minutos
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 500 µL del mismo buffer, 7 µL de beta-mercaptoetanol y mezclar bien en un vortex.
- Incubar 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
- Adicionar 200 µL de cloroformo y centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos
- Extraer el sobrenadante y colocarlo en otro tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio,
- Adicionar 1mL de Isopropanol, agitarlo ligeramente a mano y dejar reposar para precipitar el ADN durante 1 hora.
- Centrifugar el precipitado a 12.000 rpm por 15 minutos.
- Descartar el sobrenadante (cuidando el precipitado obtenido) y secar al medio ambiente sobre papel toalla para secar el ADN.
- Adicionar 500 µL de etanol al 70% y agitar ligeramente con el vortex.
- Dejar reposar por 15 minutos a 4°C para después centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos.
- Descartar la fase líquida y secar a medio ambiente por aproximadamente 25 minutos sobre papel toalla.
- Adicionar 300 µL de buffer de lavado (Etanol 76% y 10mM de acetato de amonio), pasándolo por el vortex y dejando reposar por 15 minutos a -20°C.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos y proceder a descartar para secar a medio ambiente aproximadamente 30 minutos sobre papel toalla.
- Agregar 50 µL de la solución de TE, para resuspender el ADN y adicionar 2 µL de RNAsa (10 mg/ µL), dejar reposar por 2 a 3 horas a 4°C.

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

**Preparación 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)

**Preparación Buffer TE**

Reactivo	Concentración Final
Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA	1 mM

## **Anexo 12.** Protocolo de extracción de ADN en semilla de maíz. Kit DNeasy Plant Maxi de Qiagen

### **Para tener en cuenta antes de empezar**

- El Buffer AP1 puede tomar un color amarillento durante su almacenamiento. Esto no afecta el procedimiento.
- Todos los pasos de centrifugación se desarrollan a 3.000-5.000 g (aunque 5.000 g es preferible) a temperatura ambiente (15-25 °C).

### **Cosas para hacer antes de empezar**

- El Buffer AP3/E concentrado puede formar precipitados durante su almacenamiento. Si es necesario, caliéntelo en baño maría a 65°C para redisolverlo (antes de agregar etanol). No caliente el Buffer AP3/E luego de que el etanol ha sido adicionado.
- Precaliente el Buffer AP1 a 65°C en baño maría. Este calentamiento es necesario para el procedimiento del DNeasy Plant Maxi y también permite disolver cualquier precipitado que se haya podido formar en el Buffer AP1.
- Los Buffer AW y Buffer AP3/E se encuentran concentrados. Antes de usarlos por primera vez, agregue la cantidad apropiada de etanol (96-100%) como se indica en la botella para obtener la solución de trabajo.
- Precaliente el baño maría a 65°C.

### **Procedimiento**

#### **1. Triture las semillas utilizando la licuadora.**

En el procedimiento con el TissueLyser, congelan en nitrógeno líquido la jarra con la muestra durante 30 s. Luego trituran las muestras y recongelan en nitrógeno líquido durante 30 s. Después vuelven a triturar las muestras y transfieren el polvo a un tubo de centrifuga de 15 ml sin dejar descongelar la muestra e inmediatamente continúan con el siguiente paso.

#### **2. Adicionar 5 ml de Buffer AP1 (precalentado a 65°C) y 10 ul de la solución stock de RNasa A (100 mg/ml) a un máximo de 1 g (peso húmedo) o 0,2 g (peso seco) de la muestra triturada. Mezclar en el vortex vigorosamente.**

No deben quedar terrones, debe removerlos pipeteando, con el vortex o usando pistilos ya que pueden disminuir el rendimiento del DNA.

Nota: No mezcle el Buffer AP1 y la RNasa A antes de ser utilizados en este paso.

#### **3. Incubar la mezcla durante 10 min. a 65°C. Agitar 2 a 3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo.**

Este paso lisa las células.

#### **4. Agregar 1.8 ml de Buffer AP2 al lisado, mezclar e incubar por 10 min. en hielo.**

Este paso precipita detergentes, proteínas y polisacáridos.

#### **5. Centrifugar el lisado a 3.000-5.000 g por 5 min a temperatura ambiente.**

Se formará un pellet, pero algunas partículas van a flotar.

#### **6. Pipetear el sobrenadante y llevarlo a la columna "QIAshredder Maxi spin" (color lila) la cual debe estar junto con un tubo colector de 50 ml y centrifugar a 3.000-5.000 g por 5 min a temperatura ambiente (15-25°C). Transferir la fracción que atravesó la columna a un nuevo tubo del 50 ml (no incluido en el kit) sin remover o agitar el pellet. Tenga en cuenta el volumen.**

Generalmente, de 5 a 6 ml del lisado se recupera. Después de la centrifugación de la muestra, muchos detritos y precipitados van a ser retenidos en el filtro pero algunos se depositarán en el pellet del tubo colector. No perturbe el pellet cuando transfiera el sobrenadante.

#### **7. Adicionar 1,5 volúmenes del Buffer AP3/E al lisado y mezclar inmediatamente con el vortex.**

Por ejemplo: Para 5 ml del lisado, adicionar 7.5 ml del Buffer AP3/E. Reduzca la cantidad del Buffer AP3/E de manera proporcional si el volumen del lisado es menor. Un precipitado puede formarse luego de la adición del Buffer AP3/E, pero esto no afectará el procedimiento.

Nota: Asegúrese del que el etanol ha sido adicionado al Buffer AP3/E.

Nota: Es importante que pipetee el Buffer AP3/E directamente al lisado y que mezcle inmediatamente.

8. **Pipetear la mezcla anterior (incluyendo cualquier precipitado que haya podido formarse) y llevarla a la columna “DNeasy Maxi spin” la cual debe estar junto con un tubo colector de 50 ml. Centrifugar a 3.000-5.000 g por 5 min a temperatura ambiente (15-25°C). Desechar la fracción que atravesó la columna. Reutilice el tubo colector en el siguiente paso.**
9. **Adicionar 12 ml de Buffer AW a la columna “DNeasy Maxi spin” y centrifugar por 10 min. a 3.000-5.000 g para secar la membrana. Desechar la fracción que atravesó la columna y el tubo colector (con mucho cuidado para evitar que la columna entre en contacto con la fracción y tome de nuevo etanol).**

Nota: Asegúrese del que el etanol ha sido adicionado al Buffer AW antes de ser usado.

Es importante secar la membrana de la columna “DNeasy Maxi spin” ya que el etanol residual puede interferir en las siguientes reacciones. Este paso de centrifugación asegura que no se transfiera etanol residual durante la elución.

Luego de lavar con el Buffer AW, la columna “DNeasy Maxi spin” queda ligeramente coloreada. En caso de que la coloración sea muy notoria, revise la Guía de Resolución de Problemas de la página 45 (Troubleshooting Guide-“Darkly colored membrane or green/yellow eluate after washing with Buffer AW”)

10. **Transferir la columna “DNeasy Maxi spin” a un nuevo tubo de 50 ml. Agregar 0.75-1 ml de Buffer AE directamente a la membrana. Incubar 5 min. a temperatura ambiente (15-25°C) y centrifugar por 5 min. a 3.000-5.000 g para eluir.**

Nota: Si se eluye con menos volumen se obtendrá mayor concentración de DNA pero se disminuye su rendimiento.

11. **Agregar otros 0.75-1 ml de Buffer AE directamente a la membrana y repetir el paso de elución anterior.**

La primera y la segunda elución pueden hacerse en un mismo tubo o separadamente. Se debe tener cuidado de que la columna no haga contacto con la elución obtenida.

**Anexo 13.** Resultados de la PCR realizada sobre las extracciones de hoja de los 9 individuos de los 38 lotes negativos para Inmunostrip. Las x señalan los casos en los que hubo amplificación para cada caso. En azul se señalan los lotes que dieron negativos para presencia de transgenes.

Lote	35S	Nos	Positivos 35S									Positivos Nos									Tipo de cultivo
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
3	Pos	Neg	x	X	x			x		x	x										Convencional
5	Pos	Neg				x															Raza Local
6	Neg	Neg																			Raza Local
7	Neg	Neg																			Refugio
8	Neg	Neg																			Convencional
9	Pos	Pos			x		x	x	x	x	x	x		x					x		Buffer
10	Neg	Neg																			Convencional <sup>1</sup>
11	Pos	Pos				x	x		x		x							x		x	Convencional
12	Neg	Pos														x		x			Convencional <sup>2</sup>
15	Pos	Pos							x	x		x	x		x	x	x	x			Convencional
16	Neg	Pos											x	x		x	x		x	x	Convencional
17	Pos	Pos	x								x	x		x			x				Refugio
18	Neg	Pos														x	x	x	x		Convencional
19	Neg	Pos											x	x		x		x	x	x	Convencional
20	Neg	Pos										x	x	x	x				x		Convencional
22	Pos	Pos	x				x	x	x	x	x				x	x	x	x			Convencional
23	Pos	Pos	x			x		x	x	x					x				x		Convencional
24	Pos	Pos			x		x	x		x	x			x					x	x	Refugio
25	Neg	Pos										x	x						x		Buffer
26	Neg	Neg																			Buffer
27	Pos	Pos	x				x		x	x	x				x	x		x	x		Refugio
28	Pos	Pos									x				x	x	x	x	x		Convencional
29	Pos	Pos						x	x	x	x	x			x					x	Raza Local
30	Pos	Pos	x	x				x	x	x	x	x					x	x	x		Convencional
31	Neg	Pos													x				x	x	Convencional
32	Neg	Pos													x						Convencional

33	Pos	Pos			x		x		x		x	x	x	x				x		x	Convencional
34	Pos	Neg	x	x			x	x													Convencional
35	Neg	Neg																			Convencional
36	Neg	Neg																			Raza Local
37	Neg	Pos										x	x	x	x	x	x	x	x	x	Convencional
38	Neg	Pos												x	x	x			x		Convencional
39	Neg	Pos															x				Convencional
43	Neg	Pos														x			x		Convencional
45	Neg	Pos												x		x			x	x	Convencional
47	Neg	Pos											x	x				x	x		Refugio
50	Pos	Pos			x	x	x		x	x	x			x	x	x			x	x	Refugio
54	Pos	Pos	x	x	x	x			x	x	x			x	x	x		x	x	x	Convencional