



PERÚ

Ministerio  
del Ambiente



## **ESTUDIO DE BIOLOGIA FLORAL Y ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLO PARA DETERMINAR EL CRUZAMIENTO Y EL FLUJO DE POLEN EN ALGODON**

**Documento del plan experimental para la realización del estudio del cruzamiento  
y el flujo de polen, el mismo que deberá identificar los factores que influyen  
dichos procesos y el procedimiento para su monitoreo**

**Consultor:  
Dr. Leopoldo Pompeyo Vásquez Núñez**

**Septiembre de 2016**

## INDICE

I.	RESUMEN EJECUTIVO	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	3
IV.	OBJETIVOS	4
	A.    Objetivo general	4
	B.    Objetivos específicos	4
V.	ENFOQUES Y ALCANCE	5
VI.	METODOLOGIA	6
VII.	RESULTADOS FINALES OBTENIDOS	7
	A.    PRIMER DISEÑO METODOLOGICO	7
	B.    SEGUNDO DISEÑO METODOLOGICO	9
	C.    TERCER DISEÑO METODOLOGICO	10
VIII.	CONCLUSIONES	11
IX.	RECOMENDACIONES	11
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	12

## I. RESUMEN EJECUTIVO

El Ministerio del Ambiente . MINAM, y la UNOPS (United Nations Office for Project Services), con la finalidad de obtener un estudio de la biología floral y establecimiento de protocolo para determinar el cruzamiento y el flujo de polen en algodón, se encuentra ejecutando dicho estudio a través del consultor que ha ganado la consultoría **Biología Floral y Establecimiento de Protocolo para Determinar la Hibridación y el Flujo de Polen en Algodón**.

El presente informe presenta tres formas experimentales para demostrar el flujo de genes a través del polen en el algodón.



## II. INTRODUCCION

En el Perú el Ministerio del Ambiente (MINAM) viene desarrollando el marco nacional de bioseguridad (normativo, institucional y técnico), ejecutable y transparente, que contribuya a la conservación y uso sostenible de su biodiversidad, a través de la completa implementación del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad (PCB) y regulaciones nacionales sobre bioseguridad. Para ello, el MINAM ha convocado a la UNOPS, la agencia de la Naciones Unidas que tiene como misión servir a las personas necesitadas, mediante proyectos de diversas áreas, entre las que se considera la sostenibilidad ambiental, para ejecutar el Proyecto MINAM-PNUMA/GEF %implementación del Marco Nacional de Bioseguridad en el Perú (IMNB-Perú).

El Perú suscribió el Protocolo de Cartagena sobre seguridad de biotecnología (PCB) del convenio sobre la Diversidad Biológica, siendo el MINAM el punto focal del Centro de Intercambio de Información en Seguridad de la Biotecnología. El 9 de diciembre del año 2011, se promulga la Ley 29811, Ley que establece la moratoria al ingreso y producción de organismos vivos modificados (OVM) al territorio nacional por un periodo de 10 años y se designa al MINAM como Punto Focal Nacional y Autoridad Nacional Competente.

El algodón es un cultivo que puede ser potencialmente afectado por la liberación al ambiente de OVM con fines de cultivo, se realizará el estudio de la biología floral y el flujo de genes inter e intraespecíficos que servirá para la elaboración de la línea de base del cultivo del algodón y así contar con información para la realización de los análisis de riesgo y la toma de decisiones ante las posibles y futuras solicitudes de liberación al ambiente de cultivares comerciales de algodón con eventos OVM.

El algodón en lo que se refiere a su biología floral está relacionado con la función que cumple de perpetuar su existencia mediante la producción sexual de gametos en sus órganos especiales que son los estambres como masculinos y el pistilo como femenino, por lo que la flor del algodón se caracteriza por ser completa y perfecta con su perianto formado por el cáliz y la corola que protegen al androceo y gineceo que son los encargados de producir los gametos masculino y femenino respectivamente y de acuerdo a la morfología, producción y forma de dispersión del polen, se produce una fecundación cruzada o alogámica y otra directa o autogámica, siendo la autogamia en mayor porcentaje que la alogamia (Barroso et al, 2007 y Yan et al 2015), siempre mayor de 5% de alogamia y menor que 95% de autogamia.

La polinización cruzada se realiza mediante los insectos, siendo las más importantes los himenópteros, principalmente abejas que se alimentan de néctar y polen, dispersando el polen inclusive a grandes distancias (Freire et al, 2002).

La introducción del cultivo del algodón transgénico o genéticamente modificado (GM) constituye una amenaza a los cultivos d algodón no transgénico y a sus parientes silvestres.

El flujo de genes a través del polen, definido como la dispersión de genes en los cultivos a través del polen, se ha convertido en un objetivo principal en a evaluación de riesgos, debido a posible traslado de polen de plantas transgénicas a plantas no transgénicas. Este se ve afectado por muchos factores como el viento, la distancia, la cantidad y tipo de polinizadores y la probabilidad de fertilización, muchos estudios han demostrado que el flujo de genes a través del polen disminuye drásticamente al aumentar la distancia entre el donante y el receptor del polen cuando hay presencia de polinizadores, por lo tanto la ausencia de polinizadores eficientes y largas distancias son importantes para atenuar el riesgo ambiental (Yan et al 2015)

### III. ANTECEDENTES

Los algodones presentes en el Perú pertenecen a 3 especies que son ***Gossypium barbadense*** L., que es originario de nuestro país y el más cultivado con sus variedades pima, tanguis, algodón nativo y algodón arriñonado. ***Gossypium hirsutum*** L. con su variedad del cerro y su variedad de fibra de color verde y ***Gossypium raimondii*** Ulbrich, que es una especie endémica el Perú, no cultivada, totalmente silvestre y que no produce fibra textil, cuya importancia está en que es una especie diploide con  $2n=26$  cromosomas, portador del genoma D, que es uno de los componentes de las dos especies anteriores tetraploides  $4n=56$ , cuyo genoma AD, siendo el genoma A procedente de otra especie diploide asiática probablemente ***G. herbaceum*** L.

Los estudios existentes sobre la biología floral, cruzamiento y flujo de polen que se ha consultado corresponden a países como Brasil (9), México (8), Perú (6), Argentina (6), EE UU (4), India (2) y 1 en cada uno de los siguientes países: Colombia, Chile, Francia, Australia, Costa Rica, Pakistán, Venezuela y China, siendo Brasil el país donde más estudios sobre la temática de flujo de genes en algodón se ha encontrado solo tratan de las variedades cultivadas y no existen estudios al respecto de ***Gossypium raimondii***. En nuestro país se han hecho trabajos de mejoramiento genético mediante cruces utilizando las variedades también cultivadas pima, tanguis y del cerro; en algodón nativo se han hecho trabajos sobre biología floral en cuanto a su desarrollo biológico pero no hay trabajos experimentales de cruzamiento ni flujo de polen.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Contar con un plan experimental para la realización del estudio de cruzamiento y demostrar el flujo de genes a través del polen.

### 4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Identificar los factores que influyen dichos procesos.

4.2.2. Demostrar el procedimiento para el monitoreo del cruzamiento.

## V. ENFOQUES Y ALCANCE

El Ministerio del Ambiente (MINAM), es el ente rector del sector ambiente en el Perú y es la autoridad competente para formular la Política Nacional del Ambiente, aplicable a los tres ámbitos de gobierno. Asimismo, el Perú firmó el Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio de la diversidad biológica, teniendo al MINAM como el punto focal nacional de dicho protocolo en materia de bioseguridad y punto focal nacional del Centro de Intercambio de Información en Seguridad de la Biotecnología.

El proyecto de implementación del marco nacional de Biotecnología en el Perú+ (IMNB-Perú) aprobado en el año 2010 por el Fondo para el Medio Ambiente Mundial (FMAM, GEF) que tiene como finalidad llenar los vacíos legales existentes para la aplicación del marco regulatorio nacional, el fortalecimiento de capacidades de los sectores competentes en bioseguridad y el incremento de la educación y participación en bioseguridad para la toma de decisiones sobre los OVM en beneficio de la conservación de la diversidad biológica del país.

En el protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad (PCB) señala, entre otros, el objetivo de evaluación de riesgo, focalizado a determinar y evaluar los posibles efectos adversos de los OVM en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica en el probable medio receptor teniendo también cuenta los riesgos para la salud humana.

El MINAM en el plan operativo institucional del año 2016 ha incluido la realización de estudio de la biología floral, el cruzamiento de genes y el flujo de polen en el cultivo del algodón, con el fin de identificar los mecanismos naturales que operan en la biología floral a nivel de especies y categorías intraespecíficas del algodón, así como estudiar las limitaciones al cruzamiento y el flujo de polen, flujo de genes, introgresión de genes y flujo de semilla en algodón.

Esta información que se obtendrá con el presente estudio servirá para la realización de los análisis de riesgos y la toma de decisiones para la liberación de OVM al ambiente ante la futura solicitud de liberación de cultivares comerciales de algodón con eventos OVM.

Siendo el algodón nativo una especie originaria de nuestro país que se encuentra todavía en forma natural con sus variedades de colores blanco, crema, pardo, marrón y lila, además de las variedades cultivadas Pima y Tanguis, también se tiene a *Gossypium raimondii* que es una especie endémica del Perú, de todos ellos es importante conocer su morfología, fenología, biología floral, distribución geográfica que ayudará a tomar decisiones fundamentadas sobre la autorización o no de introducir en nuestro país cultivares comerciales de algodón con eventos OVM, de tal modo que se evite impactos negativos sobre los recursos genéticos del algodón nativo.

En este informe se da a conocer los diseños experimentales para realizar el cruzamiento entre especies y cultivares de algodón.

## VI. METODOLOGIA

Para formular el plan experimental que demuestre el flujo de genes a través del polen mediante cruzamiento e identificar los factores que influyen dicho proceso y el procedimiento para su monitoreo se ha llevado a cabo los siguientes pasos:

- Obtener información sobre los diseños experimentales para demostrar el flujo de genes a través del polen realizados en diferentes países.
- Diseñar un plan experimental para demostrar el flujo genético a través del polen entre especies o cultivares de algodón.
- Identificar los factores que influyen en el proceso de cruzamiento.
- Describir los pasos que se siguen para el monitoreo del cruzamiento.



## VII. RESULTADOS FINALES OBTENIDOS

### A. PRIMER DISEÑO METODOLOGICO

#### **Flujo de genes de algodón transgénico a algodón no transgénico a través del polen en condiciones de invernadero**

Para evaluar la acción de los polinizadores con relación al flujo de genes de un cultivar comercial de algodón con evento transgénico a otros algodones nativos o convencionales se propone la metodología descrita por Yan y otros (2015), quienes utilizaron un invernadero en donde, se libera un polinizador, indicando que el más indicado es la abeja doméstica (*Apis mellifera*). El invernadero debe medir 60 m de largo por 8 de ancho, la semilla de algodón portador del evento transgénico se siembra en un sector de la parte central del invernadero en un rectángulo de 4 por 8 m, a ambos lados se siembra semilla de algodón nativo o convencional, en surcos con las plantas separadas por un espacio de 0.8 m y los surcos separados por 0.5 m de distancia, una parte de algodón nativo o convencional que queda a un costado del transgénico, se constituye en el grupo control y la otra parte del costado opuesto de tal modo que cuando se produzca la antesis o apertura floral sirva para el tratamiento experimental, el grupo de control se separa del algodón transgénico con una malla a prueba de insectos para que no pasen los polinizadores, el algodón nativo o convencional del otro lado queda sin separación para que los polinizadores visiten libremente las plantas de algodón portadores del evento transgénico y las plantas de algodón nativo o convencional.

Todas las plantas se controlan al menos 2 veces por semana hasta que las flores abran su corola o antesis, para asegurar la sincronía de floración de las plantas de algodón portadores del evento transgénico y las plantas de algodón nativo o convencional. Cuando todas las plantas de algodón están en plena floración se ponen en libertad a los polinizadores. Pasada la época de floración se evalúa el proceso de fructificación hasta la maduración de la cápsula y se recogen los capullos del receptor del polen o grupo tratamiento a distancia de 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 19.2, 25.6, y 36 m. y para el grupo control se recoge la semilla a distancias de 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 18.8 y 19.2 m., estos capullos se desmotan y se recoge la semilla por separado para la siguiente detección.

#### **Confirmación de la hibridación**

Las semillas obtenidas en F1, se siembran en un piso que contenga una mezcla para masetas, 75% de vermiculata y 25% de musgo, en un invernadero a una temperatura de 22 a 35°C y un fotoperiodo de 14 horas, Los semilleros de control también se siembran y evalúan.

Las plántulas se dejan crecer hasta la etapa de 3 hojas normales y una parte de cada plántula se utiliza para la extracción de ADN y la ampliación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el resto de plantas se deja crecer en número de 60 por cada punto de distancias para la confirmación del híbrido.

La presencia del evento transgénico en los híbridos putativos se verifica mediante la ampliación por PCR de la secuencia de fragmento de Cry IAC. El ADN se extrae de la hoja de una planta del semillero utilizando el protocolo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con la adición de 20 g/l de polivinilpirrolidona (PVN) en el tampón de extracción. 1 ul de muestras de ADN se utiliza para realizar la cuantificación espectroscópica usando un espectrofotómetro Nano Drop 2000

(Thermo Fisher EEUU). Los primers de 5qGAAGGATTGAGCAATCTCTAC-3qy 5q CAATCAGCCTAGTAAGGTCGT-3qse utilizan para amplificar el Cry I Ac con 80 ng de ADN. La condición de la PCR es: 95°C durante 4 min, seguido de 3. Ciclos a 94° C durante 60 s, 56°C durante 60 s, 72°C durante 90 s y una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. La detección de rutina para el ensayo de PCR se realiza por electroforesis en gel de agarosa (10 g de agarosa/l) con algodón GM como control positivo y algodón convencional como control negativo.

El flujo de genes expresado en % = [(número de plantas de la progenie que expresen haber adquirido el gen Bt) / (número de plantas evaluadas)] x 100.

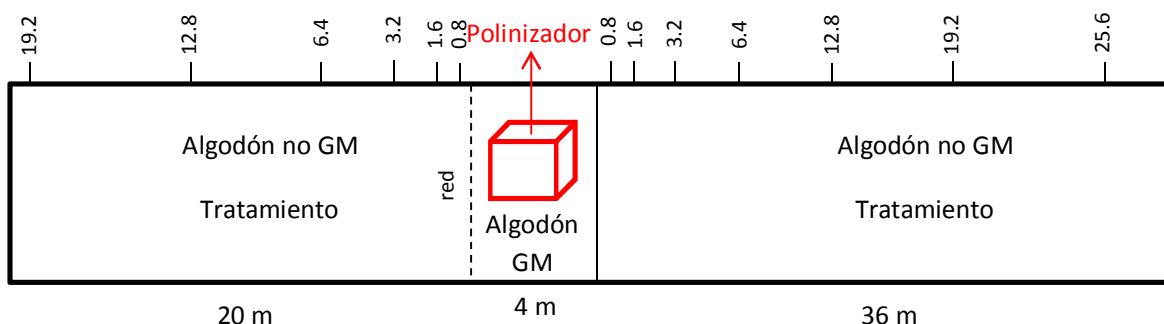
Se extrae a partir 0.1 g de una hoja de la progenie que exprese Cry I AC y se aplica para la detección de proteínas Bt, utilizando Bt-Cry y 1 kit de detección de Ab/Ac de conformidad con un método descrito previamente. La aparición de una banda indicará que es positivo.

Los autores hicieron otra evaluación tanto para el híbrido confirmado que exprese esa proteína Bt, y el cultivar convencional. Para ello rociaron con una solución al 0.25% de glifosato (insecticida) en el estadio de 4 hojas.

La altura de las plantas que sobrevivieron se miden a los 0, 7, 14 y 28 días después de la aplicación del glifosato y la tasa de supervivencia se registra a los 42 días después de la aplicación del glifosato. Cada tratamiento tenía 50 plántulas y se repite 3 veces.

Las larvas del insecto plaga que se utiliza para confirmar la resistencia a los insectos de los híbridos confirmados, deben criarse en un laboratorio, en condiciones de temperatura y humedad adecuada, la dieta que se suministre debe ser sintética y a los adultos se alimenta con una solución de miel al 10%. Las larvas criadas con dieta artificial hasta el tercer estadio, luego se transfieren a tubos de vidrio (1 cm x 6 cm) que contengan las hojas en la etapa de 5 hojas del híbrido confirmado, igual del algodón GM proveniente del control y del algodón GM, luego a los 6 días se registra el peso y la morbilidad de las larvas cada tratamiento con 60 larvas y se repite 3 veces.

Análisis de los datos. Estadística descriptiva se dan como valores medios y los errores estándar de la media. Los datos se analizan mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey a P=0.05 nivel de significación. Las estadísticas se realizan con el software SPSS 16.0 (IBM, Armonk, NY) Los análisis de regresión se registran utilizando el software Sigma Plot 10.00 8systat software Inc. San José).



## B. SEGUNDO DISEÑO METODOLOGICO

### **Control de semillas convencionales no transgénicas para demostrar su pureza o contaminación con el gen transgénico Bt**

Actualmente se sabe que se siembra ilegalmente cultivos genéticamente modificados que causan efectos negativos en la agricultura desde que fueron comercializados por primera vez a gran escala desde el año 1996.

Se ha reportado que hasta el año 2005, 39 países sembraban cultivos transgénicos y solo en 21 de ellos eran legales y 18 ilegales (Royo et al, 2008), lo que causa daño y contamina los cultivos convencionales no transgénicos, además causa daño ambiental, económico y a la salud.

Con el fin de saber si las semillas comerciales de algodón convencional y los algodones nativos, semicultivados, se conservan libres del gen Bt, se lleva a cabo un plan experimental, para detectar la presencia del gen Bt en las semillas comerciales que no contienen el evento transgénico Bt. (Royo y otros, 2004)

Para este experimento se toma muestras de semillas de las desmotadoras existentes en el país y que comercializan dichas semillas, identificando el cultivar o especie a la que pertenece, en una muestra de 300 a 400 gr.

Para detectar la contaminación de las semillas convencionales cuyas muestras se colectan en los molinos y se siembran en un invernadero, se utiliza maceteros en número de 50 a 100 por muestra, distribuidos en surcos, se controla su desarrollo sin utilizar productos químicos, de ninguna naturaleza para no alterar la presencia de plantas con eventos transgénicos.

Para hacer la evaluación de la contaminación con el gen Bt se utiliza larvas de *Alabama argillacea*, que es un lepidóptero que ataca a la hoja del algodón; y se alimenta con fragmentos de hojas en una placa multipocillo y luego se observan los resultados de la ingestión a tiempos predeterminados. Para cada muestra, se hicieron 4 repeticiones, es decir 4 pocillos con trozos de hojas de la misma planta. Las placas se preparó colocando en cada pocillo agar agar, una porción circular de hoja de algodón denominado disco foliar y una oruga, la placa se sella con papel film y los tiempos de observación son a las 24, 48 y 72 horas.

La muerte de las orugas en cada pocillo del cuadruplicado implica un resultado positivo para la presencia del gen Bt, lo que ocurre normalmente a la 24 y 48 horas de observación.

La evidencia de que la oruga sufre el envenenamiento se nota por los cambios visibles en sus características de movilidad y aspecto.

Se considera a la planta transgénica positiva (+), cuando las 4 placas permanecen intactas con los trozos de hojas sin consumir y las placas donde los trozos de hojas son consumidas por la larva, el algodón es no transgénico.

El sistema de control fue realizado con hojas de algodón certificado como Bt y otro con hojas de algodón convencional también certificado.

## C. TERCER DISEÑO METODOLOGICO

### Frecuencia de los insectos en la polinización y producción de algodón

El objetivo de este estudio es evaluar la frecuencia de visitas de los insectos polinizadores y su efecto en la producción del número de frutos y semillas en el algodón (Sanchez y Melerbo, 2004)

Para el desarrollo del experimento se siembra una variedad de algodón nativo o convencional en un área de 720 m<sup>2</sup> (16 x 45) con 18 surcos de 45 m de largo y una separación entre surcos de 0.9 m y entre planta y planta 0.5 m.

Durante la floración los botones a punto de abrir se marcan con hilo de color y se protegen con sacos de papel, para impedir el acceso de los insectos con 25 repeticiones (25 flores) y otras 25 flores se mantienen libres para ser visitadas por abejas y otros polinizadores.

Se hacen las colectas de los insectos visitantes del cultivo y se conservan en alcohol al 70%, debidamente etiquetados para su posterior identificación.

Se evalúa la frecuencia de visitas de estos insectos durante todo el día, desde las 8 a.m. hasta las 5 p.m. y haciendo el recuento de insectos en los 5 primeros minutos de cada hora.

Se sigue la observación del desarrollo de los frutos tanto de las flores ensacadas como las que se dejaron descubiertas. Una vez que los frutos maduran y botan el capullo, aproximadamente los 50 días después del marcado de los botones; se hace el conteo de semillas por cada cápsula.

Todos los datos se analizan estadísticamente utilizando un programa o software estadístico. Para la comparación de medidas se utiliza la prueba de Tukey a 5% de probabilidad. Para analizar la frecuencia de visitas de los insectos a las flores durante el día, se utiliza el análisis de regresión para los polinomios octogonales obteniendo así las ecuaciones adecuadas a los patrones observados en las condiciones experimentales.

De acuerdo a este experimento llevado a cabo en Brasil se demuestra que la mayor frecuencia de *Apis mellifera* en las flores de algodón, permite la polinización cruzada, dando como resultado el aumento en la producción del número de semillas por fruto en un 29.45% ± 3.45, al producirse esta polinización cruzada también hay flujo de genes.

## VIII. CONCLUSIONES

Mediante la presente consultoría se propone las siguientes conclusiones.

1. Para medir el flujo de genes a través del polen se propone utilizar la técnica ensayada por Yan y otros (2015) quien utilizó un invernadero donde se cultivaron los dos tipos de algodón uno con eventos transgénicos y el otro convencional, liberó polinizadores para que efectúen la polinización cruzada y luego comprobar en el algodón convencional la presencia del gen Bt mediante el método PCR.
2. Para comprobar si las semillas de un cultivar de algodón convencional han sido contaminadas con el gen Bt, se proponen adoptar la metodología seguida por Royo y otros (2004) quien utilizó un plan experimental, sembrando las semillas en un invernadero y con las hojas de las plantas se alimentó a un insecto plaga, mediante este tipo de experimento se comprueba la contaminación con el gen Bt, si el insecto plaga muere o si no se alimenta de las hojas y no muere.
3. Para comprobar la influencia de la polinización cruzada en la mayor producción de semillas por fruto se hace la evaluación de la frecuencia de visitas de los insectos polinizadores y su efecto en la mayor producción del número de semillas por fruto.

## IX. RECOMENDACIÓN

Para comprobar el flujo de genes entre una población de algodón transgénico y otra población de algodón nativo o convencional, se recomienda el método de alimentación de larvas de *Alabama arguillacea*, con hojas de plántulas de ambas poblaciones y ver sus efectos, si muere o no la larva. Este método es más sencillo y eficaz frente la prueba de PCR por ser más complicada y especializada.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Borém, Aluizio (2001) Fluxo gênico do algodão no Brasil. Brasil.
2. Cardoso Pires, Viviane (2009) Biología Floral de *Gossypium barbadense* e Abelhas Potencialmente Carreadoras de Polen de *Gossypium hirsutum latifolium* para *Gossypium barbadense* (Malvaceae) no Distrito Federal: Subsídios para a Análise de Risco de Fluxo Genético de Algodoeiros Geneticamente Modificados no Brasil (Tesis de maestría) Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
3. Sanchez Junior, João Luiz Benedito y Malerbo-Souza, Darclot Terezinha (2004) Freqüência dos insetos na polinização e produção de algodão. *Acta Scientiarum, Agronomy* 26 (4), p. 461-465.
4. Heuberger, Shannon; Ellers-Kirk, Christa; Tabashnik, Bruce E. y Carrie` re Yves (2010) Pollen- and Seed-Mediated Transgene Flow in Commercial Cotton Seed Production Fields. Open Access . *Plos One* 5 (11). p. 1-8.
5. Hutmacher, Robert B.; Vargas, Ron N. y Wright, Steven D. (2006) Methods to Enable the Coexistence of Diverse Cotton Production Systems. *Agricultural Biotechnology in California Series N° 8191*. p 1-6.
6. Jenczewski, Eric, Ronfort, Joëlle and Chèvre, Anne-Marie (2003) Crop-to-wild gene flow, introgression and possible fitness effects of transgenes. *Environmental Biosafety Research* 2 (1), p. 9-24.
7. Mahmood-ur-Rahman, S. Ramzan, Shaheen, T., Hussain, K., Qasim, M., Asif, M. and Bukhari, S. A. (2014) Vertical flow of Bt genes in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(6), p. 1904-1907.
8. Rache Cardenal, Leidy Yanira (2011) Monitoreo del flujo de genes de algodón transgénico en la agremiación remolino s.a. (Espinal . Tolima) (Tesis de maestría) Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
9. Royo, Olegario M.; Gonzalez, Ariela J.; Poisson, Juan A. F.; Simonella, María A.; Martinez, Elisa (2008) Contribución al control de las contaminaciones con el transgen Bt en las multiplicaciones comerciales de algodón del INTA. *Revista Idia XXI Año VIII, N° 10*. p. 14-18.
10. Sanchez Junior, João Luiz Benedito y Malerbo-Souza, Darclot Teresinha. (2004) Freqüência dos insetos na polinização e produção de algodão. *Acta Scientiarum. Agronomy* 26 (4), p. 461-465
11. Van Deynze, Allen E.; Sundstrom, Frederick J. and Bradford, Kent J. (2005) Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity. *Crop Science* 45. p. 1565. 1570.
12. Yan, Shuo; Zhu, Jialin; Zhu, Weilong; Li, Zhen, Shelton, Anthony M.; Luo, Junyu; Cui, Jinjie; Zhang, Qingwen y Liu, Xiaoxia (2015) Pollen-mediated gene flow from transgenic cotton under greenhouse conditions is dependent on different pollinators. *Scientific Reports* 5. p. 1-9.