

ANÁLISIS MOLECULAR Y DIFERENCIACIÓN DE GENOTIPOS DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

MOLECULAR ANALYSIS AND DIFFERENTIATION OF GENETICALLY MODIFIED COTTON GENOTYPES

Roberto Carlos Cid-Contreras, José Oscar Mascorro-Gallardo, Agustín de Jesús López-Herrera, Ernestina Valadez-Moctezuma*

Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, estado de México. 56230 México.
(evaladezm@chapingo.mx)

RESUMEN

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es confiable y precisa para verificar si las plantas pueden estar genéticamente modificadas (GM). Por razones ecológicas y reglamentarias es importante saber si las variedades de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) que se siembran en México son convencionales o GM y se necesitan procedimientos inequívocos para identificarlas. Bajo la hipótesis de que la presencia de al menos un elemento de transgénesis permite diferenciación y agrupación genotípica en muestras ciegas, el objetivo de este estudio fue determinar por medio de PCR la presencia de los elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* o *Tnos* en un conjunto de muestras ciegas de algodón bajo el supuesto de ser GM, para diferenciarlas y agruparlas con base en su estructura genética. El material estudiado fueron 20 muestras de algodón recolectadas en la Comarca Lagunera, México. Las muestras se analizaron con PCR para detectar el tipo de secuencia regulatoria de transgénesis utilizada; luego se genotiparon con marcadores de Inter-Secuencia Simple Repetida (ISSR) para determinar tipo y número de grupos. Los resultados indicaron que el 50% de las muestras contenía las secuencias *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos*; 15% a *nptII* y *Tnos*; 5% a *CaMV35S* y *nptII*, y 5% solo a *nptII*, y revelaron que la construcción genética en estos materiales de algodón fue distinta. El 25% de las muestras analizadas no presentó ningún elemento de transgénesis. Los iniciadores ISSR amplificaron 283 fragmentos, de los cuales el 61.5% fueron polimórficos. De acuerdo con los valores del índice de marcador y de bandas polimórficas, los iniciadores MicroAnch 4, MicroAnch 6 y UBC 872 fueron los más eficientes para diferenciar las muestras en estudio. El análisis de conglomerados y el de coordenadas principales separaron a las 20 muestras en dos grupos, además del genotipo silvestre. El análisis

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) technique is a reliable and accurate tool to prove that plants may be genetically modified (GM). For ecological and regulatory reasons, it is important to know whether cotton (*Gossypium hirsutum* L.) varieties planted in Mexico are conventional or GM. Unequivocal procedures are necessary to identify them. Under the hypothesis that the presence of at least one transgenesis element would allow genotypic differentiation and clustering in blind samples; the objective of this study was to determine by PCR the presence of the transgenesis elements *CaMV35S*, *nptII* or *Tnos* in a set of blind cotton samples assumed to be GM, in order to differentiate clusters based on their genetic structure. The material studied was 20 cotton samples collected in the Comarca Lagunera, Mexico. Samples were analyzed with PCR to detect the type of regulatory transgenesis sequence used; then, the samples were genotyped with Inter-Single Sequence Repeat (ISSR) markers to determine type and number of clusters. The results indicated that 50% of the samples contained *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* sequences; 15% corresponding to *nptII* and *Tnos*; 5% to *CaMV35S* and *nptII*, and 5% to *nptII* only, and revealed that the gene construction in these cotton materials was distinct. Twenty-five percent of the samples tested had no transgenesis elements. The ISSR primers amplified 283 fragments, 61.5% of which were polymorphic. According to the values of the index of marker and polymorphic bands, the primers MicroAnch 4, MicroAnch 6 and UBC 872 were the most efficient in differentiating the samples under study. Cluster analysis and principal coordinate analysis separated the 20 samples into two clusters, in addition to the wild genotype; and analysis of molecular variance indicated that 85% of the variation was attributed to genotypes within the clusters. PCR is a useful molecular technique to identify transgenesis elements for grouping plants according to their genetic similarity.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8765-6613>.

Recibido: octubre, 2020. Aprobado: mayo, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 303-316. 2021.

de varianza molecular indicó que el 85% de la variación se atribuyó a los genotipos dentro de los grupos. La PCR es una técnica molecular útil para identificar elementos de transgénesis y para agrupar plantas de acuerdo con su similitud genética.

Palabras clave: elementos de transgénesis, *Gossypium hirsutum*, muestras ciegas, marcadores ISSR, PCR.

INTRODUCCIÓN

Las plantas genéticamente modificadas (GM) aún generan gran polémica, tanto en el ámbito productivo y ambiental, como en la salud. El algodón (*Gossypium hirsutum* L.) es una especie que tiene importancia mayor en la industria textil por su fibra natural, pero su manejo tradicional requiere costos altos de producción y procesamiento (Fernández, 2001; Rocha-Munive *et al.*, 2018). India, China, Estados Unidos, Pakistán, Brasil, Turquía, Australia, Turkmenistán y Burkina son los productores principales de algodón GM (CIBIOGEM, 2018). Las variedades de algodón GM incorporan tipos diferentes de modificaciones, pero como en cualquier planta GM la modificación genética contiene secuencias reguladoras (elementos de transgénesis) que facilitan la expresión de los genes de interés que pueden modificarse (Chen *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2009). En México, el algodón GM se ha cultivado desde 1996 con adopción gradual y en el año 2008, el 96% del área cultivada era algodón GM (Purcell *et al.*, 2008; Rocha-Munive *et al.*, 2018).

Los laboratorios de detección y análisis de plantas GM por lo general usan técnicas basadas en métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares, los cuales permiten tener certeza sobre el tipo de modificación o evento genético presente en el material de estudio (Pérez-Urquiza *et al.*, 2013; Bajwa *et al.*, 2014). El método molecular de cribado basado en la detección específica con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias reguladoras más comunes, como el promotor *CaMV35S* y el terminador *Tnos*, permite identificar las plantas GM bajo un esquema cualitativo (Díaz y Galindo, 2014; Trejo-Saavedra *et al.*, 2015). Como opción, también se analiza la presencia de genes marcadores para la resistencia a antibióticos, y el más usado es el de la neomicin-fosfotransferasa (neomycin phosphotransferase II; *nptII*) que confiere resistencia a kanamicina (Breyer *et al.*, 2014). En muestras ciegas, la detección

Key words: transgenesis elements, *Gossypium hirsutum*, blind samples, ISSR markers, PCR.

INTRODUCTION

Genetically modified (GM) plants still generate a great deal of controversy, both in the productive and environmental aspects, as well as in health. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is a species of major importance in the textile industry for its natural fiber, but its traditional management requires high production and processing costs (Fernandez, 2001; Rocha-Munive *et al.*, 2018). India, China, USA, Pakistan, Brazil, Turkey, Australia, Turkmenistan and Burkina are the main producers of GM cotton (CIBIOGEM, 2018). GM cotton varieties incorporate different types of modifications, but as in any GM plant the genetic modification contains regulatory sequences (transgenesis elements) that facilitate the expression of genes of interest that can be modified (Chen *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2009). In Mexico, GM cotton has been grown since 1996 with gradual adoption and in 2008, 96% of the cultivated area was GM cotton (Purcell *et al.*, 2008; Rocha-Munive *et al.*, 2018).

GM plant detection and analysis laboratories generally use techniques based on biochemical, immunological and molecular methods, which allow certainty about the type of modification or genetic event present in the study material (Pérez-Urquiza *et al.*, 2013; Bajwa *et al.*, 2014). The molecular screening method based on the specific detection with polymerase chain reaction (PCR) of the most common regulatory sequences, such as the *CaMV35S* promoter and the *Tnos* terminator, allows the identification of GM plants under a qualitative scheme (Díaz and Galindo, 2014; Trejo-Saavedra *et al.*, 2015). As an option, the presence of marker genes for antibiotic resistance is also analyzed, and the most widely used is neomycin phosphotransferase II (*nptII*), which confers resistance to kanamycin (Breyer *et al.*, 2014). In blind samples, the detection of any of these three sequences allows identification of GM plants.

Molecular markers, especially those that scan the genome, differentiate closely related genotypes. Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) (Weising *et al.*, 2005) are used to establish genetic similarities and relationships, population structures and

de cualquiera de estas tres secuencias permite identificar plantas GM.

Los marcadores moleculares, en especial los que exploran el genoma, diferencian genotipos con relación estrecha. Las Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR) (Weising *et al.*, 2005) se utilizan para establecer similitudes y relaciones genéticas, estructuras de población y diferencias entre eventos en algodón GM (Ullah *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2014; Chandrashekar *et al.*, 2015). En este estudio, con el fin de definir el número de grupos a los cuales pertenecían las muestras recolectadas, los marcadores moleculares se utilizaron para diferenciar y agrupar a los genotipos de algodón en función de su estructura genómica.

En el norte de México se realizaron estudios experimentales sobre aspectos agronómicos e industriales con variedades GM de algodón introducidas a México durante los años 2005 a 2015. Las modificaciones genéticas de esas variedades se consideraban de primera generación, cuya construcción genética incluía genes para tolerancia a insectos, a herbicidas o a ambos (CIBIOGEM, 2018). En nuestro estudio, algunos de estos genotipos de algodón se recolectaron en la región de la Comarca Lagunera, una zona algodoneira importante del norte de México, y se analizaron por vía molecular con la finalidad de conocer si eran GM, y en su caso, el tipo de elemento de transgénesis utilizado.

Con base en lo anterior, este estudio se planteó bajo la premisa de que la presencia de al menos un elemento de transgénesis permitiría la diferenciación y agrupación de muestras ciegas. El objetivo fue determinar por medio de PCR la presencia y el tipo de los elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* o *Tnos* en un conjunto de muestras ciegas de algodón bajo el supuesto de estar GM, para diferenciarlas y determinar su estructura genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de algodón de 20 muestras (numeradas del 1 al 20) se recolectaron en la zona de la Comarca Lagunera, México, de las cuales se desconocía si eran GM o convencionales. Un genotipo de algodón silvestre (NT, genotipo número 21) se incluyó como testigo negativo, y al vector binario pBI121 (muestra número 22) como testigo positivo por contener las secuencias *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* en su estructura genética (Chen *et al.*,

differences between events in GM cotton (Ullah *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2014; Chandrashekar *et al.*, 2015). In this study, in order to define the number of clusters present in the collected samples, molecular markers were used to differentiate, and cluster cotton genotypes based on their genomic structure.

In northern Mexico, experimental studies on agronomic and industrial aspects were conducted with GM cotton varieties introduced to Mexico during the years 2005 to 2015. The genetic modifications of these varieties were considered first generation, whose genetic construction included genes for tolerance to insects, herbicides, or both (CIBIOGEM, 2018). In our study, some of these cotton genotypes were collected in the region of Comarca Lagunera, an important cotton-growing area in northern Mexico, and were molecularly analyzed in order to know whether they were GM, and if so, the type of transgenesis element used.

Based on the above, this study was aimed under the assumption that the distinctive presence of transgenesis elements would allow blind samples differentiation and clustering. The objective was to determine by PCR the presence and type of the transgenesis elements *CaMV35S*, *nptII* or *Tnos* in a set of cotton blind samples assumed to be GM, in order to differentiate them and determining their genetic structure.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Cotton seeds from 20 samples (numbered 1 to 20) were collected in the Comarca Lagunera area, Mexico, of which it was not known whether they were GM or conventional. A wild cotton genotype (NT, genotype number 21) was included as a negative control, and the binary vector pBI121 (sample number 22) was included as a positive control because it contained the *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* sequences in its genetic structure (Chen *et al.*, 2003). Samples of ten seeds of each genotype were disinfested with 10% extran (Extran® MA, Merk) for 5 min and rinsed with water to remove detergent residues; they were then sown in Peat moss:Agrolita® (2:1) and watered twice a week with 50% Steiner nutrient solution (Steiner, 1961). Seedlings were grown under greenhouse conditions until they presented three true leaves.

2003). Muestras de diez semillas de cada genotipo se desinfectaron con extran 10% (Extran® MA, Merk) durante 5 min y se enjuagaron con agua hasta eliminar los residuos del detergente; después se sembraron en Peat moss:Agrolita® (2:1) y se regaron dos veces por semana con solución nutritiva Steiner 50% (Steiner, 1961). Las plántulas se desarrollaron en condiciones de invernadero hasta que presentaron tres hojas verdaderas.

Extracción de ADN

Para cada muestra (21 recolectas y el vector binario pBI121), el ADN se extrajo de hojas de tres repeticiones biológicas independientes. La extracción se realizó con 1 g de hojas frescas con el método duodecil sulfato de sodio (SDS) (Weising *et al.*, 2005). La integridad del ADN se evaluó con electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) y la cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Detección de elementos de transgénesis

La detección de *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* se efectuó por triplicado (repeticiones técnicas) para cada réplica biológica (9 reacciones totales de PCR por muestra). La mezcla de reacción para PCR contenía 200 µM de dNTPs, 1x de amortiguador *Taq*, 3 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador (Cuadro 1), 1U de *Taq* ADN polimerasa (Promega, EUA) y 100 ng de ADN genómico; excepto para el plásmido pBI121 para el cual se usaron 40 ng de ADN. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µL con agua libre de nucleasas. La reacción control consistió en agua en lugar de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) con la siguiente programación: un ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, 35 ciclos (94 °C, 60 s; 60-61 °C, 45 s y 72 °C, 60 s) (Cuadro 1) y una extensión final a 72 °C por 10 min.

DNA extraction

For each sample (21 collections and the binary vector pBI121), DNA was extracted from leaves of three independent biological replicates. Extraction was performed on 1 g of fresh leaves using the sodium dodecyl sulfate (SDS) method (Weising *et al.*, 2005). DNA integrity was assessed with electrophoresis in 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg mL⁻¹) and quantification was performed by spectrophotometry at 260 nm on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Detection of transgenesis elements

The detection of *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* was performed in triplicate (technical replications) for each biological replicate (9 total PCR reactions per sample). The PCR reaction mixture contained 200 µM dNTPs, 1x *Taq* buffer, 3 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer (Table 1), 1U *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) and 100 ng genomic DNA; except the plasmid pBI121, for which 40 ng DNA was used. The reactions were brought to a final volume of 25 µL with nuclease-free water. The control reaction consisted of water instead of DNA. Amplification was performed on a GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA) with the following programming: one pre-denaturation cycle at 94 °C for 5 min, 35 cycles (94 °C for 60 s, 60-61 °C for 45 s and 72 °C for 60 s) (Table 1) and a final extension at 72 °C for 10 min.

The amplified products were visualized with 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and silver nitrate staining (Sambrook and Russell, 2001). The molecular weight of the amplicons was determined with 100 and 1000 bp molecular weight markers (Promega®, Madison, WI, USA). Biological and technical replications were used to identify potential false positives and false negatives. A cluster analysis was performed to separate GM organisms based on the number and type of

Cuadro 1. Características de los iniciadores utilizados para la detección de los elementos regulatorios de transgénesis.

Table 1. Characteristics of the primers used for the detection of transgenesis regulatory elements.

Nombre	Secuencia del iniciador	T _m [†] (°C)	Amplicón (pb [‡])	Fuente
35S	F: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCAGATAGT-3' R: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	61	195	Díaz y Galindo (2014)
<i>nptII</i>	F: 5'-TGATTGAACAAGATGGATTGC-3' R: 5'-GAACCTCGTCAAGAAGGGGATA-3'	60	780	Ghanem (2011)
<i>Tnos</i>	F: 5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTGC G-3' R: 5'-GCGGGACTCTAATCATAAAAACCC-3'	60	130	Díaz y Galindo (2014)

[†]Temperatura de alineamiento utilizada; [‡]pb: pares de bases. ♦ [†]Alignment temperature used; [‡]pb: base pairs.

Los productos amplificados se visualizaron con electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por Polyacrylamide gel electrophoresis) 6% y tinción con nitrato de plata (Sambrook y Russell, 2001). El peso molecular de los amplicones se determinó con los marcadores de peso molecular de 100 y 1000 pb (Promega®, Madison, WI, USA). Las repeticiones biológicas y técnicas permitieron identificar los posibles falsos positivos y falsos negativos. Un análisis de conglomerados se realizó para separar a los organismos GM en función del número y tipo de elementos regulatorios de transgénesis que contenían. Este análisis de conglomerados se realizó con el método de promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados (UPGMA, por Unweighted pair group method with arithmetic mean) a partir de la matriz binaria de las amplificaciones de los tres elementos de transgénesis, y se usó el coeficiente de coincidencia simple (Rohlf, 2002).

Análisis ISSR

Los marcadores ISSR se obtuvieron con 16 iniciadores del conjunto #9 de la Universidad de Columbia Británica (Cuadro 2). La mezcla de reacción de 25 μ L para PCR contenía 200 μ M de dNTPs, 1x de amortiguador *Taq*, 3 mM de $MgCl_2$, 20 pmol del iniciador, 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega, EUA) y 100 ng de ADN genómico. El programa de termociclaje fue: un ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C durante 60 s, la temperatura de alineamiento específica para cada iniciador (Cuadro 2) por 45 s, y 72 °C durante 3 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se separaron en geles PAGE 6% y la tinción se realizó con nitrato de plata (Sambrook y Russell, 2001). Los perfiles de bandeos se codificaron en una matriz binaria.

La eficiencia de los iniciadores utilizados se determinó por medio del cálculo del Contenido de Información Polimórfica (PIC), Poder de resolución (Rp) e Índice de Marcador (MI) (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000). La matriz de similitud y el análisis de agrupamiento con el coeficiente de coincidencia simple (SM, por considerar las dobles ausencias como un factor de similitud; Lamdoy, 1994) se realizaron con el programa NTSYSpc 2.2. El análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en la matriz de similitud genética, se realizó con el paquete estadístico GenA-LEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). El análisis de varianza molecular (AMOVA) se efectuó con el programa GenA-LEx 6.5 para conocer la partición de la variación genética (Peakall y Smouse, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de elementos de transgénesis

La cantidad y calidad del ADN obtenido fueron adecuadas para el desarrollo de las técnicas de PCR.

transgenesis regulatory elements they contained. This cluster analysis was performed using the Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) from the binary matrix of the amplifications of the three transgenesis elements, and the simple coincidence coefficient was used (Rohlf, 2002).

ISSR Analysis

ISSR markers were obtained with 16 primers from set #9 from the University of British Columbia (Table 2). The 25 μ L reaction mixture for PCR contained 200 μ M dNTPs, 1x *Taq* buffer, 3 mM $MgCl_2$, 20 pmol of primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) and 100 ng of genomic DNA. The thermocycling program was: one pre-denaturation cycle at 94 °C for 5 min; 35 cycles at 94 °C for 60 s, at primer-specific alignment temperature (Table 2) for 45 s, and at 72 °C for 3 min; and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were separated on 6% PAGE gels and staining was performed with silver nitrate (Sambrook and Russell, 2001). Banding profiles were coded on a binary matrix.

The efficiency of the primers used was determined by calculating the Polymorphic Information Content (PIC), Resolution Power (Rp) and Marker Index (MI) (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000). The similarity matrix and clustering analysis with the simple matching coefficient (SM, because double absences are considered as a similarity factor; Lamdoy, 1994) were performed with the NTSYSpc 2.2 program. The principal coordinate analysis (PCoA), based on the genetic similarity matrix, was performed with the statistical package GenA-LEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). The analysis of molecular variance (AMOVA) was performed with the GenA-LEx 6.5 program to know the partitioning of genetic variation (Peakall and Smouse, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

Detection of transgenesis elements

The quantity and quality of DNA obtained were adequate for the development of PCR techniques. The amplified products of the *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* transgenesis elements had molecular weights of 160, 780 and 190 bp, respectively (Figure 1); Ghanem (2011), Diaz and Galindo (2014) and Cid-Contreras *et al.* (2019) found products of similar molecular weights for the primer pairs used. The *CaMV35S* promoter sequence was detected in 60% of the samples (genotypes 2, 4, 5, 7, 8, 8, 11, 11, 13, 14, 14, 15, 16, 17 and 18); the *nptII* gene sequence was detected in 75% of the samples (2, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 14, 15, 16, 17, 19 and 20) and the

Cuadro 2. Características de los iniciadores ISSR utilizados en genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum*).**Table 2. Characteristics of ISSR primers used in cotton genotypes (*Gossypium hirsutum*).**

Iniciador	Secuencia	Tm [†] (°C)	Bandas totales	Bandas polimórficas	PBP [‡] (%)	Rp [§]	PIC ^b	MI ^o
Microsat 2	(GACA) ₄	48	9	3	33.3	2.00	0.17	0.52
MicroAnch2	VDV(CT) ₇	68	11	1	9.10	0.10	0.01	0.01
MicroAnch4	(AGAC) ₄ GC	56	30	30	100	13.8	0.32	9.59
MicroAnch6	AC(GACA) ₄	54	30	30	100	19.7	0.42	12.7
INI2	(GA) ₈ YC	54	14	7	50.0	2.48	0.13	0.88
UBC 810	(GA) ₈ T	50	15	4	26.7	1.90	0.10	0.39
UBC 811	(GA) ₈ C	52	22	17	77.3	10.2	0.32	5.50
UBC 812	(GA) ₈ A	50	10	7	70.0	2.86	0.22	1.50
UBC 814	(CT) ₈ A	50	20	10	50.0	8.48	0.29	2.88
UBC 834	(AG) ₈ YT	52	11	5	45.5	4.19	0.25	1.26
UBC 842	(GA) ₈ YG	54	13	3	23.1	2.38	0.15	0.45
UBC 872	(GATA) ₄	42	48	48	100	32.8	0.42	20.3
UBC 879	(CTTCA) ₃	42	12	4	33.3	3.52	0.21	0.82
UBC 889	DBD(AC) ₇	68	15	2	13.3	0.67	0.04	0.08
UBC 890	VHV(GT) ₇	68	15	1	6.67	0.95	0.06	0.06
IS-16	B(ACA) ₅	50	8	2	25.0	2.86	0.28	0.56
Total			283	174	61.4			

[†]Tm: Temperatura de alineamiento utilizada; [‡]PBP: Porcentaje de bandas polimórficas; [§]Rp: Poder de resolución; ^bPIC: contenido de información polimórfica; ^oMI: Índice de marcador. ♦ [†]Tm: Alignment temperature used; [‡]PBP: Percentage of polymorphic bands; [§]Rp: Resolution power; ^bPIC: Polymorphic information content; ^oMI: Marker index.

Los productos amplificados de los elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* tuvieron pesos moleculares de 160, 780 y 190 pb, respectivamente (Figura 1); Ghanem (2011), Díaz y Galindo (2014) y Cid-Contreras *et al.* (2019) encontraron productos de pesos moleculares similares para los pares de iniciadores utilizados. La secuencia del promotor *CaMV35S* se detectó en el 60% de las muestras (genotipos 2, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 17 y 18); la secuencia del gen *nptII* se detectó en el 75% de las muestras (2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 y 20) y el terminador *Tnos* en el 65% (4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 19).

Lo anterior indicó que el 75% de las muestras de algodón recolectadas en la zona de la Comarca Lagunera eran plantas GM construidas con estos elementos de transgénesis, pero no todas compartían los mismos. Los tres elementos *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* estuvieron presentes en un mismo genotipo en el 50% de las muestras analizadas (genotipos 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 y 17); tres muestras contenían los elementos *nptII* y *Tnos* (genotipos 6, 12 y 19); una muestra (genotipo 2) presentó los elementos

Tnos terminator in 65% (4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 19).

This indicated that 75% of the cotton samples collected in the Comarca Lagunera area were GM plants constructed with these transgenesis elements, but not all of them shared the same elements. The three elements *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* were present in the same genotype in 50% of the samples analyzed (genotypes 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 and 17); three samples contained the elements *nptII* and *Tnos* (genotypes 6, 12 and 19); one sample (genotype 2) presented the elements *CaMV35S* and *nptII*, and only one sample was positive for *nptII* (genotype 20). The remaining 25% of the samples (genotypes 1, 3, 9, 10 and 18) did not present any of the genetic elements analyzed.

Regarding the controls used, the three sequences of interest (*CaMV35S*, *nptII* and *Tnos*) were identified in the pBI121 plasmid with the indicated primers, whereas none of these elements were detected in the wild-type cotton genotype.

The use of biological and technical replications decreases the final probability of experimental error.

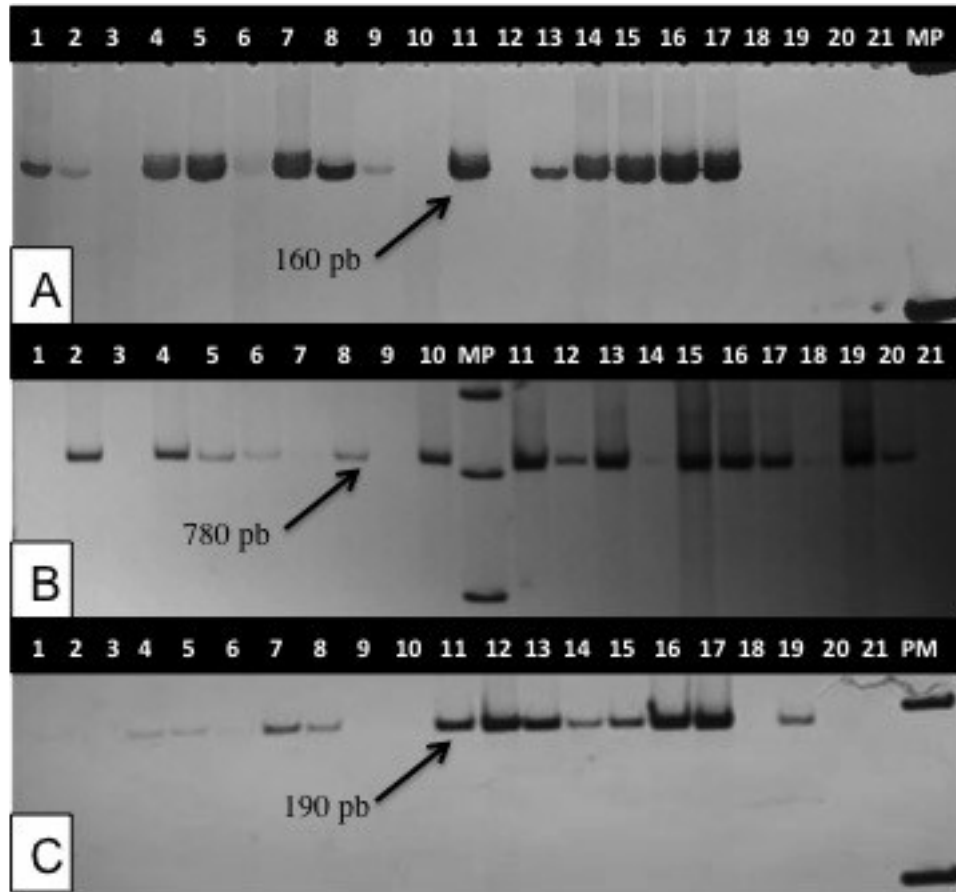


Figura 1. Amplicones de los tres elementos de transgénesis en algodón (*Gossypium hirsutum*). Líneas 1 a 20 corresponden a las muestras ciegas de algodón y 21 al algodón silvestre. Panel A: fragmento de 160 pb del promotor *CaMV35S*; panel B: fragmento de 780 pb del gen *nptII*; C: fragmento de 190 pb del terminador *Tnos*. MP: marcador de peso molecular de 100 pb.

Figure 1. Amplicons of the three transgenesis elements in cotton (*Gossypium hirsutum*). Lines 1 to 20 correspond to blind cotton samples and 21 to wild cotton. Panel A: 160-bp fragment of the *CaMV35S* promoter; panel B: 780-bp fragment of the *nptII* gene; C: 190-bp fragment of the *Tnos* terminator. MP: 100 bp molecular weight marker.

CaMV35S y *nptII*, y solamente una muestra fue positiva para *nptII* (genotipo 20). El 25% de las muestras restantes (genotipos 1, 3, 9, 10 y 18) no presentaron ninguno de los elementos genéticos analizados.

Respecto a los controles utilizados, en el plásmido pBI121 se identificaron las tres secuencias de interés (*CaMV35S*, *nptII* y *Tnos*) con los iniciadores indicados, mientras que en el genotipo silvestre de algodón no se detectó ninguno de estos elementos.

El uso de repeticiones biológicas y técnicas disminuye la probabilidad final del error experimental. Bajo nuestro esquema de trabajo, sólo en una repetición técnica se obtuvieron tres falsos positivos y tres falsos negativos. Estos problemas se han reportado anteriormente por Lipp *et al.* (1999) al determinar

Under our scheme of work, three false positives and three false negatives were obtained in only one technical repetition. These problems have been reported previously by Lipp *et al.* (1999) in determining the presence of the *CaMV35S* promoter and the *Tnos* terminator in GM maize and soybean plants. The errors that have been reported may be mainly due to cross-contamination, out-of-calibration measuring equipment or pipetting errors. For this reason, in this type of assay, it is suggested to perform at least three technical replicates for each biological repetition in order to avoid false results as much as possible.

The reliability in the validity of a qualitative method, such as endpoint PCR, requires including

la presencia del promotor *CaMV35S* y el terminador *Tnos* en plantas de maíz y soya GM. Los errores que se han informado se pueden deber principalmente a la contaminación cruzada, equipos de medición descalibrados o errores de pipeteo. Por esta razón en este tipo de ensayos se sugiere realizar al menos tres repeticiones técnicas por cada repetición biológica con el fin de evitar tanto como sea posible resultados falsos.

La confiabilidad en la validez de un método cualitativo, como el de PCR punto final, requiere incluir repeticiones durante todo el proceso, desde la obtención inequívoca de la muestra, la obtención de ADN de calidad, la cantidad del ADN y de los iniciadores; así como una separación electroforética adecuada, sin prescindir del uso de testigos positivos y negativos confiables (Centro Nacional de Metrología, 2017). Además, la experiencia del analista es muy importante para identificar las posibles causas de error y la determinación del resultado final. En nuestro estudio, se utilizaron geles PAGE para separar y visualizar de manera más apropiada los productos de PCR, porque su sensibilidad de separación es superior a la documentada para geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001).

El análisis de conglomerados UPGMA, basado en el tipo de elemento genético, permitió separar a los genotipos de algodón en dos grupos (Figura 2). El primer grupo incluyó a los genotipos 1, 3, 9, 10 y 18 que no presentaron ninguno de los elementos buscados; mientras que el segundo grupo contenía los genotipos GM. En este segundo grupo, los genotipos se subdividieron en función del número de elementos de transgénesis detectados; un subgrupo contuvo los genotipos que presentaron conjuntamente los tres elementos genéticos (genotipos 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 y 17); otro subgrupo estuvo formado por los genotipos que presentaron los elementos *nptII* y *Tnos* (genotipos 6, 12 y 19). En otro subgrupo estuvo el genotipo 2 que contenía a los elementos *CaMV35S* y *nptII*, y el último subgrupo contuvo el genotipo 20 con el elemento *nptII*. La no coincidencia de los tres elementos en algunas muestras sugiere que estos genotipos pudieron transformarse con el uso de otros promotores, u otros terminadores. Esto promueve que los genes de interés insertados se puedan regular de manera diferente en las plantas GM expuestas a ambientes diversos. Shao *et al.* (2009) y De Guglielmo y Fernández Da Silva (2016) observaron combinaciones de promotores y terminadores para la generación

replicaciones durante el todo el proceso, desde la unequivocal obtención de la muestra, la obtención de calidad DNA, la cantidad de DNA y primers. Así como una adecuada electrophoretic separation, without dispensing the use of reliable positive and negative controls (Centro Nacional de Metrología, 2017). In addition, the analyst's experience is very important in identifying possible causes of error and the determination of results at the end. In our study, PAGE gels were used to more appropriately separate and visualize PCR products because their separation sensitivity is superior to that documented for agarose gels (Sambrook and Russell, 2001).

The UPGMA cluster analysis, based on the type of genetic element, allowed separating the cotton genotypes into two clusters (Figure 2). The first group included genotypes 1, 3, 9, 10 and 18 that did not present any of the elements searched, while the second group contained the GM genotypes. In this second group, the genotypes were subdivided according to the number of transgenesis elements detected. One subgroup contained the genotypes that jointly presented the three genetic elements (genotypes 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 and 17); another subgroup consisted of the genotypes that presented the *nptII* and *Tnos* elements (genotypes 6, 12 and 19). In another subgroup was genotype 2 containing the *CaMV35S* and *nptII* elements, and the last subgroup contained genotype 20 with the *nptII* element. The mismatch of the three elements in some samples suggests that these genotypes were transformed with the use of other promoters, or other terminators. This promotes that the inserted genes of interest may be regulated differently in GM plants exposed to diverse environments. Shao *et al.* (2009) and De Guglielmo and Fernandez Da Silva (2016) observed combinations of promoters and terminators for the generation of gene constructs, some of them different from those identified in this study.

Differentiation with ISSR markers

The 16 ISSR primers generated 283 total fragments in 21 cotton samples, of which 174 were polymorphic (61.4%). The number of total fragments and polymorphic fragments varied depending on the primer used. Total fragments ranged from 8 for primer IS-16 to 48 for primer UBC 872, and polymorphic fragments ranged from one fragment for primers

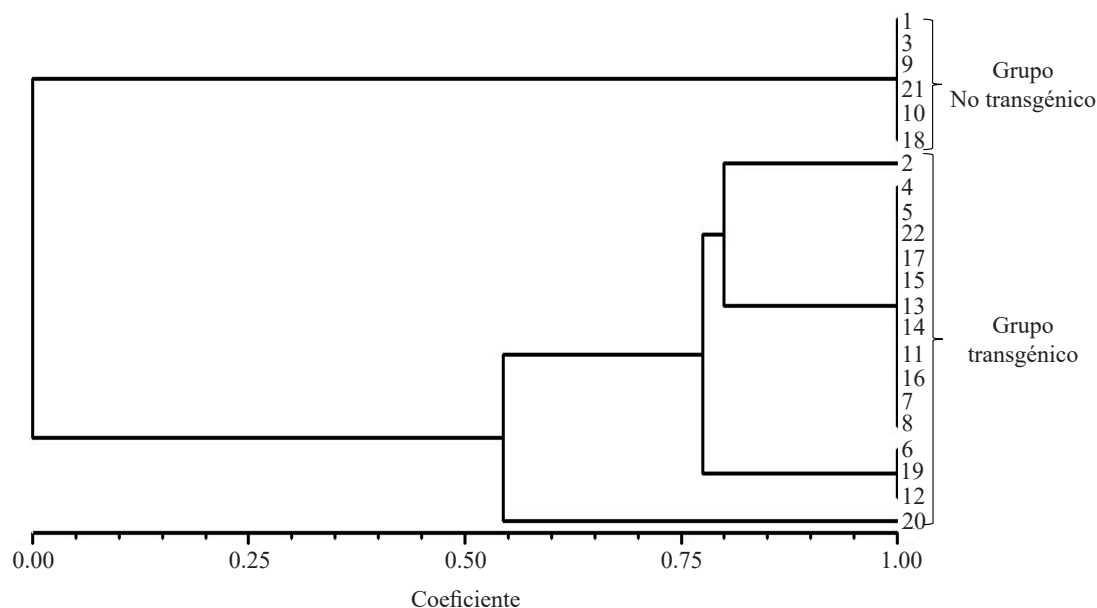


Figura 2. Dendrograma derivado del análisis UPGMA con datos de detección de los elementos genéticos *CaMV35S*, gen *nptII* y *Tnos* en 21 genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum*).

Figure 2. Dendrogram derived from UPGMA analysis with detection data of *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos* genetic elements in 21 cotton genotypes. (*Gossypium hirsutum*).

de construcciones genéticas, algunas de ellas diferentes a las identificadas en este estudio.

Diferenciación con marcadores ISSR

Los 16 iniciadores ISSR generaron 283 fragmentos totales en 21 muestras de algodón, de los cuales 174 fueron polimórficos (61.4%). El número de fragmentos totales y de fragmentos polimórficos variaron en función del iniciador utilizado. Los fragmentos totales variaron desde 8 para el iniciador IS-16 hasta 48 para el iniciador UBC 872, y los polimórficos variaron desde un fragmento para los iniciadores MicroAnch 2 y UBC 890, hasta 48 para el iniciador UBC 872. Los perfiles de ADN obtenidos con el iniciador UBC 889 también fueron evidentes, para el cual se consideraron 15 fragmentos de ADN claramente visibles y con poco polimorfismo (Figura 3). El porcentaje de bandas polimórficas obtenido en nuestro estudio fue mayor al reportado por Dongre *et al.* (2004) y por Noormohammadi *et al.* (2011) quienes usaron el mismo tipo iniciadores en diferentes materiales de algodón y obtuvieron valores de 54.0 y 54.34%, respectivamente.

MicroAnch 2 and UBC 890, to 48 for primer UBC 872. DNA profiles obtained with primer UBC 889 were also evident, for which 15 clearly visible DNA fragments with little polymorphism were considered (Figure 3). The percentage of polymorphic bands obtained in our study was higher than that reported by Dongre *et al.* (2004) and by Noormohammadi *et al.* (2011) who used the same type of primers on different cotton materials and obtained values of 54.0 and 54.34%, respectively.

The polymorphic index value of the primers ranged from 0.01 for MicroAnch 2 primer to 0.42 for MicroAnch 6 and UBC 872 primers. Ashraf *et al.* (2016) determined similar PIC values, also in cotton (Bt). Primer UBC 872 was the most efficient primer for assessing genetic variability in these genotypes because it presented the highest resolving power value: 20.3 (Table 2). The ISSR primers used in our research were also efficient for separating GM chrysanthemum seedlings according to Cid-Contreras *et al.* (2019), indicating that their genetic structure is repeated in genomes of diverse species, and demonstrating their usefulness for genotyping and differentiating plants of diverse genera and species.

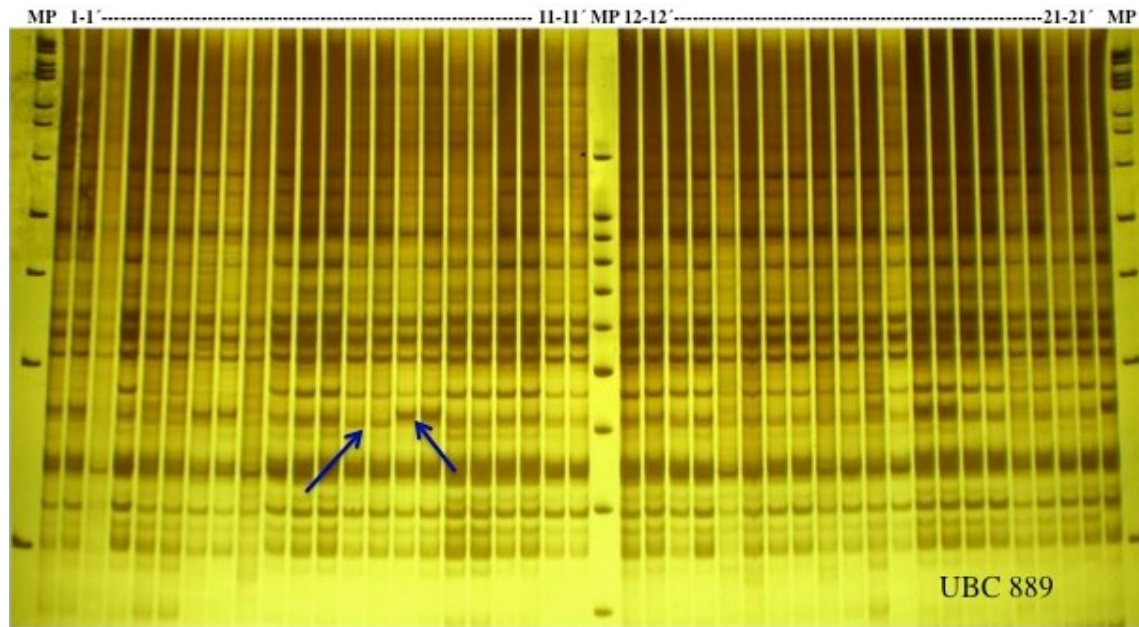


Figura 3. Perfiles ISSR obtenidos con el iniciador UBC 889 de dos repeticiones independientes de 21 genotipos de algodón. Las flechas señalan dos polimorfismos. Los MP son de 100 y 1000 pb.

Figure 3. ISSR profiles obtained with the UBC 889 primer from two independent replications of 21 cotton genotypes. Arrows point to two polymorphisms. The MPs are 100 and 1000 bp.

El valor del índice polimórfico de los iniciadores varió de 0.01 para el iniciador MicroAnch 2 hasta 0.42 para los iniciadores MicroAnch 6 y UBC 872. Ashraf *et al.* (2016) determinaron valores similares de PIC, también en algodón (Bt). El iniciador UBC 872 fue el más eficiente para evaluar la variabilidad genética en estos genotipos porque presentó el valor mayor de poder de resolución, 20.3 (Cuadro 2). Los iniciadores ISSR usados en nuestra investigación también fueron eficientes para separar plántulas de crisantemo GM según Cid-Contreras *et al.* (2019), lo cual indica que su estructura genética está repetida en genomas de diversas especies, y se demuestra su utilidad para genotipar y diferenciar plantas de géneros y especies distintas.

El análisis UPGMA para los marcadores ISSR (Figura 4) mostró una distribución diferente de los genotipos comparada con la agrupación obtenida en la identificación de elementos genéticos (Figura 2). El valor mayor de similitud (0.84) se registró entre los genotipos 16 y 17; mientras que el menor (0.58) fue entre los genotipos 1 y 21 (NT). Con un valor de distancia de 0.715, los 20 genotipos se separaron claramente entre ellos, se conformaron dos grupos, además de la muestra 21 (algodón silvestre) que se

The UPGMA analysis for ISSR markers (Figure 4) showed a different distribution of genotypes compared to the grouping obtained in the identification of genetic elements (Figure 2). The highest similarity value (0.84) was recorded between genotypes 16 and 17; while the lowest (0.58) was between genotypes 1 and 21 (NT). With a distance value of 0.715, the 20 genotypes were clearly separated from each other, two clusters were formed, in addition to sample 21 (wild cotton) which remained as an independent genotype. The first group included genotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 and 10; and among them, genotypes 1, 3, 9 and 10 that did not contain any of the genetic elements analyzed. The second group consisted of genotypes 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20, which correspond to GM plants (except sample 18, which turned out to be conventional).

The formation of these two clusters indicates that the genomic structure of the samples in them is similar, including the respective conventional genotypes. Within each group, the samples were also separated with different similarity coefficients and evidenced the difference between them. The separation of each sample within the clusters is due to the random insertion of the transgenesis assembly.

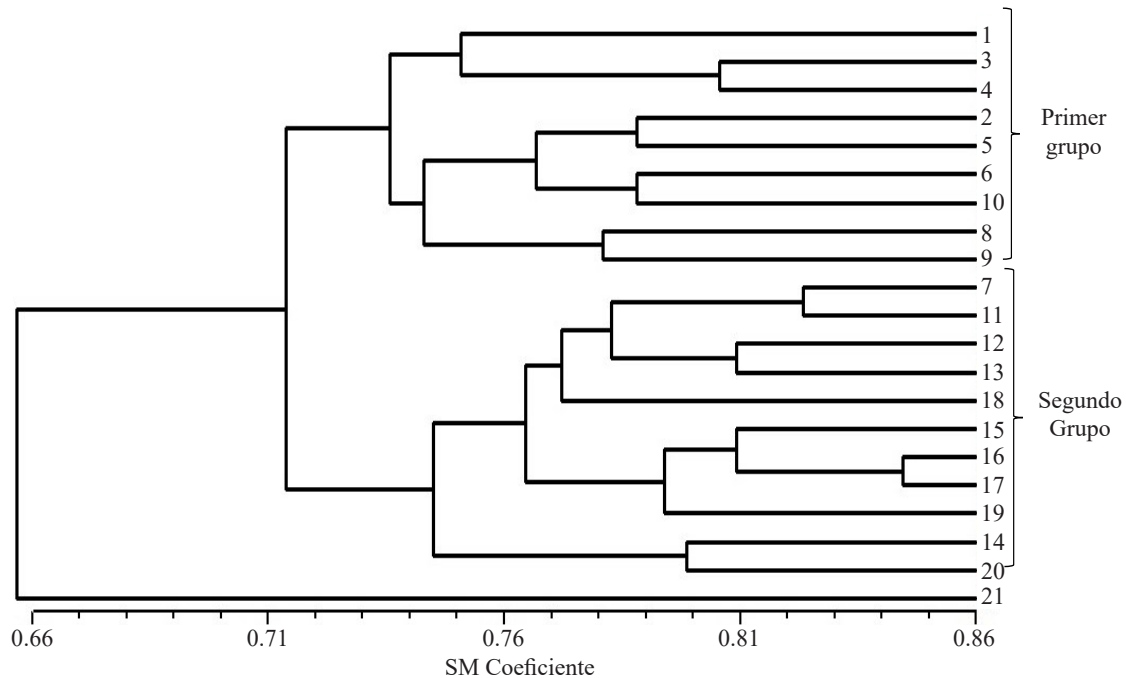


Figura 4. Dendrograma derivado del análisis UPGMA con datos de amplificación de 16 iniciadores tipo ISSR en 21 genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum*).

Figure 4. Dendrogram derived from UPGMA analysis with amplification data from 16 ISSR-type primers in 21 cotton genotypes. (*Gossypium hirsutum*).

mantuvo como genotipo independiente. El primer grupo incluyó a los genotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10; y entre ellos, los genotipos 1, 3, 9 y 10 que no contenían a ninguno de los elementos genéticos analizados. El segundo grupo estuvo conformado por los genotipos 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 que corresponden a plantas GM (excepto la muestra 18 que resultó ser convencional).

La conformación de estos dos grupos indica que la estructura genómica de las muestras en ellos es similar, incluyendo los genotipos convencionales respectivos. Dentro de cada grupo las muestras también se separaron con coeficiente de similitud distinto y evidenciaron la diferencia entre ellas. La separación de cada muestra al interior de los grupos se debe a que la inserción del ensamble de transgénesis es aleatoria. Los perfiles reproducidos por los iniciadores cambiaron debido a esto, se expresaron por la longitud o cantidad de fragmentos amplificados. Por otro lado, los grupos que se conforman con el uso de datos de marcadores moleculares hacen referencia a que los individuos que se mantienen agrupados tienen estructuras genómicas similares (Noormohammadi *et al.*, 2011; Ashraf *et al.* 2016).

The profiles reproduced by the primers changed because of this, manifested by the length or number of amplified fragments. On the other hand, clusters that are formed using molecular marker data refer to individuals that remain grouped together are due to similar genomic structures (Noormohammadi *et al.*, 2011; Ashraf *et al.*, 2016).

The AMOVA analysis determined that 15% of the total genetic variability was associated with between-group differentiation, while 85% was attributed to within-group variation. These results point to a similar genomic constitution between both clusters, with a fixation index of 0.154 and partitioning of variation could be attributed to within-group genotypes.

The principal coordinate analysis (Figure 5) generated two clusters, similar to those obtained with the UPGMA analysis (Figure 4). The first and second coordinates contributed respectively 25.6 and 13.1% of the total variation. This indicated genomic differences between genotypes. In this evaluation, genotypes in which no transgenesis elements were identified (genotypes 1, 3, 9, 10, 18 and 21) were scattered in the graph unlike their previous behavior

El análisis AMOVA determinó que 15% de la variabilidad genética total se asoció con la diferenciación entre grupos, mientras que 85% se atribuyó a la variación dentro de los grupos. Estos resultados apuntan a una constitución genómica similar entre ambos grupos, con un índice de fijación de 0.154 y la partición de la variación pudo atribuirse a los genotipos dentro de los grupos.

El análisis de coordenadas principales (Figura 5) generó dos grupos similares a los obtenidos con el análisis UPGMA (Figura 4). La primera y segunda coordenada contribuyeron respectivamente con 25.6 y 13.1% de la variación total. Lo anterior indicó diferencias genómicas entre los genotipos. En esta evaluación, los genotipos en los que no se identificaron elementos de transgénesis (genotipos 1, 3, 9, 10, 18 y 21) quedaron dispersos en la gráfica a diferencia de su comportamiento anterior (Figura 2), cuando se agruparon con base en la ausencia de estos elementos y se separaron de los genotipos GM.

En el análisis PCoA estos genotipos no GM, excepto el genotipo 21, se ubicaron en los grupos correspondientes de acuerdo con sus similitudes

(Figure 2), when they were grouped based on the absence of these elements and separated from the GM genotypes.

In the PCoA analysis these non-GM genotypes, except genotype 21, were placed in the corresponding clusters according to their genomic similarities. This indicates that both GM and non-GM materials corresponding to the same group were found in the sample lots. Sample 21 (NT) was isolated in all analyses since its wild state distinguishes it from the cultivated genotypes.

CONCLUSIONS

Seventy-five percent of the cotton samples collected in La Comarca Lagunera showed evidence of being genetically modified, most of them with the three evaluated transgenesis elements *CaMV35S*, *nptII* and *Tnos*. The genetically modified cotton analyzed in this study showed different transgenesis constructs.

ISSR-markers separated the collected cotton samples into two clusters. The screening method and

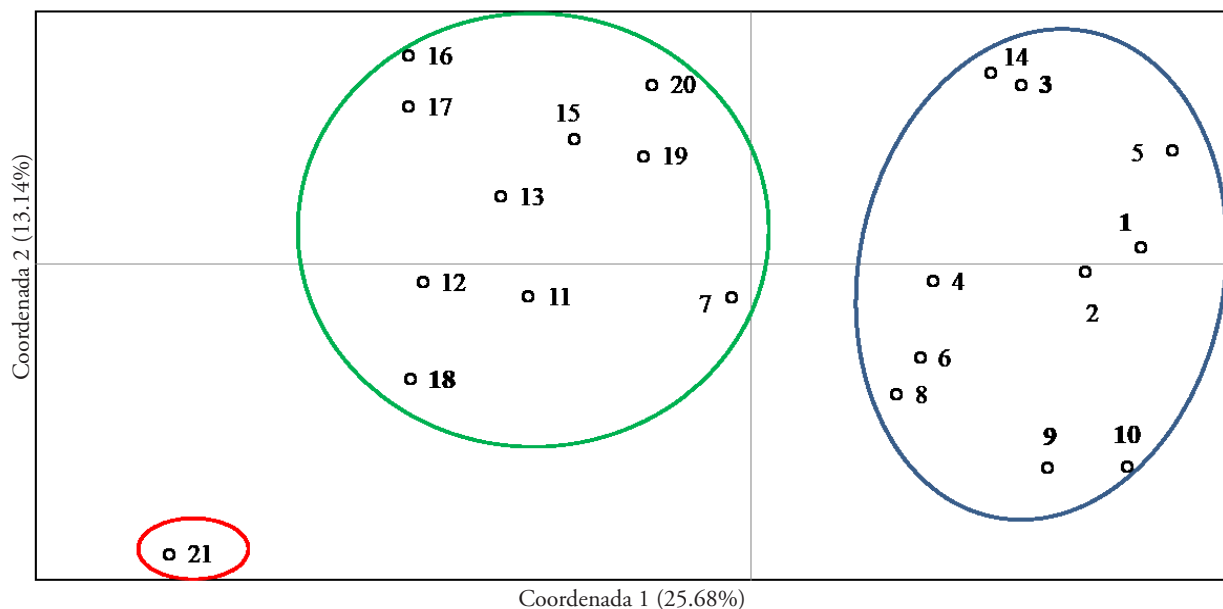


Figura 5. Análisis de coordenadas principales en genotipos de algodón analizados con iniciadores tipo ISSR. Los genotipos contenidos en los círculos hacen referencia a tres grupos conformados; el genotipo 21 es la muestra de algodón silvestre. Los genotipos resaltados en negrita representan a las muestras convencionales.

Figure 5. Principal coordinate analysis of cotton genotypes analyzed with ISSR primers. Genotypes contained in the circles refer to three forming clusters; genotype 21 is the wild cotton sample. Genotypes highlighted in bold represent the conventional samples.

genómicas. Esto indica que en los lotes muestra se encontraban tanto materiales GM como no GM correspondientes al mismo grupo. La muestra 21 (NT) quedó aislada en todos los análisis ya que su estado silvestre la distingue de los genotipos cultivados.

CONCLUSIONES

El 75% de las muestras de algodón recolectadas en la Comarca Lagunera presentaron evidencia de estar genéticamente modificados, la mayoría con los tres elementos de transgénesis *CaMV35S*, *nptII* y *Tnos* evaluados. El algodón genéticamente modificado analizado en este estudio presentó construcciones transgénicas distintas.

Los marcadores ISSR separaron en dos grupos a las muestras de algodón recolectadas. El método de cribado y el análisis con marcadores moleculares ISSR fueron técnicas útiles para identificar tipos de elementos de transgénesis, y permitieron conocer los grupos a los cuales pertenecían las muestras ciegas de algodón.

LITERATURA CITADA

- Ashraf, J., W. Malik, M. Z. Iqbal, A. Ali Khan, A. Qayyum, E. Noor, M. A. Abid, H. M. Naseer Cheema, and M. Q. Ahmad. 2016. Comparative analysis of genetic diversity among Bt cotton genotypes using EST-SSR, ISSR and morphological markers. *J. Agric. Sci. Tech.* 18: 517-531.
- Bajwa, K. S., A. A. Shahid, A. Q. Rao, A. A. Dahab, A. Muzaffar, H. Ur Rehman, M. Ahmad, M. S. Shaukat, A. Gul, A. Ahad, and T. Hussain. 2014. Stable genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using marker genes. *Advanced Crop Sci.* 4: 1-11.
- Breyer, D., L. Kopertekh, and D. Reheul. 2014. Alternatives to antibiotic resistance marker genes for invitro selection of genetically modified plants—scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33: 286-330.
- Centro Nacional de Metrología. 2017. Métodos de referencia validados para análisis de organismos genéticamente modificados, por PCR digital, y secuenciación paralela masiva. *Iniciadora Edición.* 49 p
- Chandrashekar, R., B. Prasad, N. Vankudothu, J. Chaitanya P., L. Bhavani N., R. Reddy Y., and K. Rao K. 2015. A comparative genetic diversity study among elite Bt and Non-Bt cotton varieties of Andhra Pradesh by RAPD markers. *Discovery Biotechnol.* 6: 30-37.
- Chen, P.Y., C. K. Wang, S. C. Soong, and K. Y. To. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol. Breed.* 11: 287-293.
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados). 2018. Registro Nacional de Bioseguridad de OGMs. <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/sistema-nacional-deinformacion/registro-nacional-bioseguridad-ogms>. (Consulta: enero 2020).
- Cid-Contreras, R. C., J. O. Mascorro-Gallardo, and E. Valadez-Moctezuma. 2019. Genotyping and molecular analysis of transgenic sequences in chrysanthemum (*Chrysanthemum X morifolium* Ramat). *Crop Breed. Applied Biotechnol.* 19: 285-290.
- De Guglielmo, Z., and R. Fernández Da Silva. 2016. Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18: 119-128.
- Díaz, L., y I. Galindo. 2014. Detección e identificación de eventos asociados a organismos vivos modificados en semillas de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela empleando métodos de inmunoensayo y análisis por PCR. *Rev. Fac. Agron.* 40: 37-49.
- Dongre, A., V. Parkhi, and S. Gahukar. 2004. Characterization of cotton (*Gossypium hirsutum*) germplasm by ISSR, RAPD markers and agronomic values. *Indian J. Biotechnol.* 3: 388-393.
- Fernández, A. H. 2001. Panorama económico del algodón en México - Evolución de la siembra y la problemática del TLC en la comercialización. *Rev. Mex. Agroneg.* V: 189-201.
- Ghanem, S. 2011. Cloning of the *nptII* gene of *Escherichia coli* and construction of a recombinant strain harboring functional *recA* and *nptII* antibiotic resistance. *Gen. Mol. Res.* 10: 1445-1454.
- Lamdoy, W. F. 1994. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR methods Appl.* 4: 31-37.
- Lipp, M., P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels, E. Anklam. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybean and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* 82: 923-928.
- Noormohammadi, Z., F. Shojaei-Jesvaghani, M. Sheidai, F. Farahani, and O. Alishah. 2011. Inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Mehr cotton cultivar and its crossing progenies. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 11839-11847.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pérez-Urquiza, M., J. Rivera-Mellado, y E. Matus-Cundapi. 2013. Manual de Protocolos de Medición de Organismos Genéticamente Modificados. Centro Nacional de Metrología, México. 78 p.

—End of the English version—



- Purcell, J. P., C. Rubinstein, y T. Vaughn. 2008. El futuro de la biotecnología en Latinoamérica. *In*: Blanco, C. A. (ed). Cultivos transgénicos para la agricultura latinoamericana. Fondo de Cultura Económica. pp: 131–162.
- Rocha-Munive, M. G., M. Soberón, S. Castañeda, E. Niaves, E. Scheinvar, L. E. Eguiarte, D. Mota-Sánchez, E. Rosales-Robles, U. Nava-Camberos, J. L. Martínez-Carrillo, C. A. Blanco, A. Bravo, and V. Souza. 2018. Evaluation of the impact of genetically modified cotton after 20 years of cultivation in Mexico. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6: 82.
- Rohlf, F. J. 2002. NTSYS-PC, numerical taxonomy system for the PC, ExeterSoftware, Ver. 2.2. Exeter Software, Setauket.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, and M. De Loose. 2000. AFLP Markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.* 6: 125-135.
- Sambrook, J. E., and D. W. Russell. 2001. Gel electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed., Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. ISBN 978-087969577-4.
- Shao Z., H. Zhao and H. Zhao. 2009. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res.* 37: 2-10. doi:10.1093/nar/gkn991
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil.* 15: 134-154.
- Trejo-Saavedra, D. L., E. A Rodríguez-Negrete, and R. F. Rivera-Bustamante. 2015. Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria.* 25 (NE-3): 24-39. DOI: 10.15174/au.2015.906
- Tyagi, P., M. A. Gore, D. T. Bowman, B. T. Campbell, J. A. Udall, and V. Kuraparthi. 2014. Genetic diversity and population structure in the US Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 283-295.
- Ullah, I., A. Iram, M. Z. Iqbal, M. Nawaz, S. M. Hasni, and S. Jamil. 2012. Genetic diversity analysis of Bt cotton genotypes in Pakistan using simple sequence repeat markers. *Genet. Mol. Res.* 11: 597-605.
- Weising, K., H. Nybom, M. Pfenninger, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. Second edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton. 472 p.