



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
ECOLOGÍA

MONITOREO DE LA PRESENCIA DE TRANSGENES EN
***CARICA PAPAYA L.* SILVESTRE Y CULTIVADA EN**
MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Olmo Santiago Rosas Plaza

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ana L. Wegier Briuolo

Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Núñez Farfán

Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Ana E. Escalante Hernández

Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, Instituto de Ecología, UNAM

MÉXICO, CD. MX. MAYO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
ECOLOGÍA

MONITOREO DE LA PRESENCIA DE TRANSGENES EN
***CARICA PAPAYA* L. SILVESTRE Y CULTIVADA EN**
MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Olmo Santiago Rosas Plaza

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ana L. Wegier Briuolo

Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Núñez Farfán

Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Ana E. Escalante Hernández

Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, Instituto de Ecología, UNAM

MÉXICO, CD. MX. MAYO 2019

OFICIO CPCB/495/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de noviembre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ROSAS PLAZA OLMO SANTIAGO** con número de cuenta **517007662** con la tesis titulada **"MONITOREO DE LA PRESENCIA DE TRANSGENES EN *CARICA PAPAYA* L. SILVESTRE Y CULTIVADA EN MÉXICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA LAURA WEGIER BRIUOLO**:

Presidente: DRA. MARIANA BENÍTEZ KEINRAD
Vocal: M. EN C. ANDREA RUBÍ JIMÉNEZ MARÍN
Secretario: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
Suplente: DRA. MARIANA CHÁVEZ PESQUEIRA
Suplente: DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 24 de abril de 2019.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos institucionales

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación y apoyo recibido.

A CONACyT por otorgarme la beca que permitió realizar estos estudios (CVU 776199).

A la Dra. Ana Wegier y a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Juan Núñez Farfán y Dra. Ana Elena Escalante

Agradecimientos a título personal

A mi tutora la Dra. Ana Wegier y a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Juan Núñez Farfán y Dra. Ana Elena Escalante, por su apoyo durante el transcurso de la maestría y de quienes aprendí mucho

A los miembros del jurado y revisores de mi trabajo: Dra. Mariana Chávez Pesqueira, Dra. Mariana Benítez, Dra. Andrea Jiménez, Dr. Juan Núñez Farfán y Dr. Luis Davis Alcaraz, por las correcciones y comentarios que ayudaron a nutrir este proyecto.

A la Dra. Mariana Chávez por apoyarme y estar siempre presente en el transcurso de la maestría ¡Marianita, en verdad agradezco mucho el apoyo que me diste!

A todos los integrantes de mi laboratorio: Tans, Valerito, Chavivis, Mels, Pams, Repsa, Cris y Denisse, por hacer un ambiente agradable incluso en los días más estresantes.

A mi familia, por su apoyo incondicional y siempre estar en las buenas y en las malas

A Ale por ser la persona más paciente en mis momentos más estresantes y estar siempre que te necesité.

Al Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM, en especial al Dr. Juan Núñez Farfán y a la Dra. Rosalinda Tapia López por el acceso y uso de material biológico.

A Mariana Chávez Pesqueira del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por el acceso y uso de material biológico y la asesoría científica otorgada.

Al Área de Difusión del Instituto de Ecología y Biología de la UNAM por la difusión del proyecto.

Índice

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
1 Clasificación, origen y domesticación	5
1.1 Biología de la especie	6
1.2 Poblaciones silvestres	7
1.3 Variedades de papaya	10
1.3.1 Variedades de papaya en México	10
2 Producción de papaya	11
2.1 Producción a nivel mundial	11
2.2 Producción de papaya en México	13
3 Plagas y enfermedades	16
3.1 PRSV-P	16
4 Estrategias de mejoramiento genético – cruzas selectivas con parientes silvestres	16
5 Papaya genéticamente modificada	17
5.1 Protocolos de transferencia de genes	20
5.2 Promotores empleados en papaya transgénica	21
5.3 Genes utilizados como marcadores de selección y reporteros	22
5.4 Métodos de detección de papaya transgénica	23
6 Bioseguridad y papaya genéticamente modificada	25
7 Legislación de OGMs	28
Justificación	30
Objetivos	30
Material y métodos	31
1 Material biológico	31
1.1 Poblaciones silvestres	31

1.2 Muestras de cultivos y traspatio	31
1.3 Muestras de papaya de venta comercial	33
2 Extracción de DNA	34
3 Pools de DNA	35
4 Elección de cebadores para detección de transgenes	36
5 Detección de transgenes por PCR punto final	37
6 Estandarización del protocolo de detección en pools de DNA	38
7 Análisis de datos	39
7.1 Estimación del tamaño de muestra óptimo para el monitoreo de papaya genéticamente modificada	39 40
7.2 Determinación de tamaño de muestra óptimo en cultivos y plantas silvestres	40
7.3 Estimación del tamaño óptimo de muestra para el monitoreo de papaya GM considerando otros escenarios	41
Resultados	42
1 Material biológico	42
2 Extracción y pools de DNA	43
3 Estandarización del protocolo de detección en pools de DNA	44
3.1 Umbral de detección del control positivo de papaya transgénica	44
4 Secuenciación de productos de PCR	45
5 Detección de transgenes en pools de DNA	46
3 Estandarización del protocolo de detección en pools de DNA	
3.1 Umbral de detección del control positivo de papaya transgénica	
6 Estimación del tamaño de muestra óptimo para el monitoreo de papaya genéticamente modificada	49
7 Estimación del tamaño óptimo de muestra para el monitoreo de papaya genéticamente modificada – otros escenarios	49

7.1 Propuesta de escenarios hipotéticos en cultivos	49
7.2 Propuesta de escenarios hipotéticos en poblaciones silvestres	50
Discusión	51
1 Protocolo de detección de papaya GM en su centro de origen	52
1.1 Umbral de detección de los marcadores empleados en el monitoreo	53
1.2 Utilización de pools de DNA como parte del monitoreo de papaya GM	54
2 Tamaño de muestra para el monitoreo de papaya GM	54
3 Posibles causas de la ausencia de transgenes	57
4 Tamaño de muestra para el monitoreo de papaya GM – otros escenarios	59
5 Implicaciones del flujo de genes en cultivos de papaya	60
6 Propuesta de metodología para el monitoreo de papaya GM en México	63
7 Conclusiones	64
8 Literatura citada	65
Anexo 1	77
Anexo 2	82

Resumen

La papaya (*Carica papaya*) es una planta tropical originaria del continente americano. Pertenece a la familia Caricaceae y es el único representante del género *Carica*. Se ha sugerido que su distribución abarca desde el sur de Nicaragua hasta el límite tropical norteño de México, por lo que se considera esta área como el centro de origen, diversidad genética y domesticación. La conservación de la diversidad genética de *C. papaya* silvestre en México se ve afectada principalmente por la fragmentación del hábitat natural y el flujo génico entre variedades domesticadas y plantas silvestre. Aunado a lo anterior, en nuestro país la papaya domesticada es de gran importancia económica, pues México es el principal país exportador de papaya en el mundo. Diversas enfermedades entre las que se encuentra principalmente el Virus de la mancha Anular (PRSV por sus siglas en inglés) son las causantes de pérdidas a gran escala en la producción de papaya. Se han realizado diferentes estrategias para el manejo de la plaga y enfermedades en papaya, y en países como Estados Unidos y China se ha optado por el desarrollo y liberación al ambiente de papaya genéticamente modificada para combatir dichas problemáticas. Estas mismas modificaciones se han encontrado sin ser autorizadas en Tailandia, desconociendo las vías exactas de dispersión. Debido a lo anterior, es necesario analizar la presencia de transgenes en plantas de esta especie en nuestro país; tanto en poblaciones silvestres, variedades nativas y cultivos comerciales. Esto, para conocer el estado actual y realizar planes para monitorear y mitigar los efectos ambientales y económicos que pudieran presentarse. Por ello, el objetivo principal de este proyecto fue desarrollar una propuesta complementaria a las estrategias de conservación genética de las poblaciones silvestres y variedades nativas, que consiste en un plan de monitoreo de la presencia de transgenes de *C. papaya* en México. Para alcanzar dicho objetivo se estandarizaron los métodos de amplificación por PCR de marcadores moleculares indicativos de la modificación por ingeniería genética, como son el promotor P35S, Tnos y gen *PRSV-CP*. Se analizaron 320 papayas silvestres, 240 individuos de cultivos 135 individuos de traspatios y 240 muestras de semillas de venta comercial. Por último, se estimó el tamaño de muestra necesario para realizar adecuados análisis de monitoreo de cada grupo (silvestre y domesticada) de esta especie en el país. Los resultados de una muestra representativa de poblaciones silvestres y cultivos de papaya en México fueron negativos en la presencia de transgenes. Así mismo, se propone una

estrategia de análisis de la presencia de transgenes en papaya como punto de partida para su monitoreo, el cual podría ser aplicado a otras especies.

Abstract

Papaya (*Carica papaya*) is a tropical plant native to America. It belongs to the Caricaceae family and is the only species of the genus *Carica*. It has been suggested that the distribution range comprehends from Nicaragua to the tropical northern boundary of Mexico, therefore, this area is considered as the center of origin, genetic diversity and domestication of papaya. In Mexico it is considered a species of great economic importance. However, the conservation of the genetic diversity of wild papaya in the country is mainly affected by the fragmentation of natural habitat and gene flow between domesticated and wild populations. Diseases such as Papaya Ring Spot Virus are the cause of losses in papaya production around the world. Different strategies have been developed in order to control pest and diseases in papaya and in countries such as United States and China have opted in the development and release of genetically modified papaya. These modifications have been found in Thailand without authorization, ignoring the exact routes of dispersion. Consequently, it is necessary to analyze the presence of transgenes and their possible flow between wild populations, native varieties and commercial crops in their center of origin, as a key for the conservation of the species. The main goal of this research was to develop a monitoring strategy to analyze the presence of transgenes in wild and cultivated papaya in Mexico, as a complementary approach to the strategies of genetic conservation of the wild populations and native varieties from Mexico. To achieve this goal, the methods of amplification by PCR of the fragments inserted in the transgenic papayas, such as the P35S promoter, Tnos and *PRSV-CP* gene, was standardized. We analyzed 320 samples of wild papaya, 240 individuals from crops, 135 individuals from backyard and 240 commercial seed samples. Finally, the sample size needed to perform adequate monitoring of papaya in Mexico was estimated. The results of a representative sample of wild populations and papaya crops in Mexico were negative for the presence of transgenes. Likewise, a strategy for the analysis of the presence of transgenes in papaya is proposed as a starting point for its monitoring, which could be applied to other species.

Introducción

La papaya una especie de gran importancia económica en México, pues además de ser uno de los principales países productores de papaya, es considerado el principal exportador de papaya en el mundo (FAO, 2017) proporcionando un derrame económico de 92 millones de dólares anuales (SAGARPA, 2017c). Aunado a lo anterior México es considerado parte de la distribución natural de la especie, y es donde se ha reportado la mayor diversidad genética (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017). Sin embargo, la fragmentación del hábitat y el flujo de genes entre papaya silvestre y domesticada son las principales amenazas de la especie (Chávez-Pesqueira et al., 2014). Esto hace necesario la generación de estrategias para la conservación de la especie en nuestro país, pues la conservación de tales acervos genéticos es crucial para la conservación de la especie en todo el mundo (Chávez-Pesqueira et al., 2014).

Por otro lado, las problemáticas relacionadas a la producción y rendimiento de papaya en el mundo; principalmente plagas y enfermedades, han puesto en la mesa diferentes estrategias para combatirlas. Una de ellas se basa en el desarrollo de Papayas Genéticamente Modificadas (PGM). Esto ha resultado en la comercialización de cuatro eventos diseñados para combatir el Virus de la Mancha Anular (PRSV) (ISAAA, 2016). Aún cuando pocos estudios se han enfocado en el análisis de flujo de transgenes en papaya (Gonsalves et al., 2012; Manshardt et al., 2016, 2007), los resultados obtenidos en estos tres estudios realizados en Hawái han demostrado la existencia del flujo transgénico en cultivos y poblaciones ferales. Aunado a lo anterior, países pertenecientes a la Unión Europea han registrado en diversas ocasiones la presencia de transgenes sin autorización en importaciones provenientes de países donde la liberación al ambiente de papaya transgénica no está autorizada (European Commission, 2018).

A pesar de que en México se han negado las autorizaciones para la siembra y comercialización de papaya GM (CIBIOGEM, 2018), el monitoreo está justificado, pero los organismos gubernamentales continúan sin realizarlo. Considerando las experiencias en otros países y teniendo en cuenta que se ha registrado el flujo de transgenes en otras especies con centro de origen en el país (Dyer et al., 2009; Wegier et al., 2011), es necesario proponer una estrategia de monitoreo de papaya transgénica contemplando el

complejo silvestre-domesticado de la especie en México; esto como medida complementaria a las estrategias de conservación en la especie.

1 Clasificación, origen y domesticación

Carica papaya es considerado un árbol tropical semileñoso perenne y de vida relativamente corta. Perteneció a la familia Caricaceae, el cual está integrado por seis géneros (*Cylicomorpha*, *Carica*, *Vasconcellea*, *Jacartia*, *Horovitzia* y *Jarilla*) y 35 especies, siendo la papaya el único representante del género *Carica* (Badillo, 2000). Los géneros *Vasconcellea* y *Jacaratia* se distribuyen principalmente en Sudamérica, mientras que *Carica*, *Horovitzia* y *Jarilla* en México y Centroamérica. Por último, el género *Cylicomorpha* se distribuye en África (Aradhya et al., 1999; Carvalho & Renner, 2015).

La familia Caricaceae se originó en África (género *Cylicomorpha*) y se dispersó a Centroamérica hace 35 millones de años. Posteriormente, aproximadamente hace 25 millones de años *Carica papaya* divergió de sus parientes más cercanos; *Horovitzia* (endémica de México) y *Jarilla* (solo en distribuye en México y Guatemala) (Carvalho & Renner, 2015). En la actualidad, su distribución natural comprende desde el trópico norteño de México hasta el límite entre Nicaragua y Costa Rica (Aradhya et al., 1999; Carvalho & Renner, 2015), y los especímenes silvestres de herbarios en todo el mundo han sido colectados solamente en el Sur de México y Centroamérica (Fuentes & Santamaría, 2014; Núñez-Farfán, 2017). Por esto, aunque no se sabe con exactitud el lugar de origen, algunos autores han propuesto a Mesoamérica, ya que además de ser considerado uno de los centros de origen más importante en cultivos tropicales (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2004; Harlan, 1971), es el sitio en el que se han colectado los especímenes silvestres de la especie (Fuentes & Santamaría, 2014; Núñez-Farfán, 2017).

Aunado a lo anterior, estudios filogeográficos más recientes (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016) han demostrado una gran diversidad genética en las poblaciones silvestres del Sureste de México. La alta variabilidad genética encontrada en esa región ha puesto sobre la mesa el posible centro de origen en Mesoamérica, particularmente en México (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017)

Al igual que el origen de *Carica papaya*, el lugar y tiempo exacto de domesticación de la especie es difícil de inferir. Sin embargo, se han empleado diferentes enfoques como evidencia indirecta para inferir que la papaya fue domesticada en el sur de México o Centroamérica por las civilizaciones prehispánicas (Fuentes & Santamaría, 2014).

Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal (2004) han enlistado a la papaya como una de las plantas que fueron domesticadas por los mayas, ya que es probable que aprovecharan especies que crecían naturalmente en la región como es el caso de la papaya. Incluso se ha sugerido que la papaína era utilizada por las culturas Mesoamericanas con la finalidad de ablandar la carne (Larqué-Saavedra, 2016). De igual manera, el carácter hermafrodita coincide con el nacimiento de la civilización Maya hace aproximadamente 4000 años, lo que sugiere fuertemente que la papaya hermafrodita podría ser el resultado de la domesticación realizada por los Mayas (VanBuren et al., 2015).

Por último, es importante mencionar que a la llegada de los españoles en siglo XVI, las semillas fueron distribuidas a Sudamérica y a las regiones tropicales del mundo (Morton, 1984), lo que explica que actualmente se cultive alrededor de todo el mundo.

1.1 Biología de la especie

C. papaya es una planta tropical que puede alcanzar aproximadamente de 1 a 3 m de altura en el primer año bajo condiciones aptas para la especie. La planta puede vivir por más de 20 años. Sin embargo, debido a la altura a la que puede llegar, así como también diversas patologías entre las que destacan el Virus de la Mancha Anular PRSV (por sus siglas en inglés), el Virus del Mosaico (PapMV por sus siglas en inglés) y otras enfermedades causadas por hongos y bacterias, la vida comercial de la papaya oscila normalmente entre los 2 y 3 años (Jiménez et al., 2014).

Las primeras flores generalmente aparecen de 3 a 8 meses después de la germinación, y le toma aproximadamente un año al fruto completar el desarrollo (Paterson et al., 2008). Las plantas pueden ser dioicas o hermafroditas, y algunas raramente trióicas, es decir, que una sola planta puede presentar flores femeninas, masculinas y hermafroditas. Las flores hermafroditas están catalogadas en cuatro tipos: a) *pentadria* (5 estambres funcionales y un ovario redondo), b) *carpeloide* (6 a 9 estambres funcionales y un ovario

irregular), c) *elongada* (10 estambres funcionales y un ovario alargado), d) *estéril* (10 estambres estériles y un estigma vestigial) (Storey, 1941).

Dependiendo de la variedad de papaya, el tipo de floración y el entorno, las papayas pueden presentar eventos de autopolinización o polinización cruzada. En variedades comerciales como Maradol o Hawaiana, compuestas por poblaciones ginodioicas (cultivos conformados por plantas hermafroditas y femeninas), es menos frecuente pero está presente la polinización cruzada (Gonsalves et al 2012). Sin embargo, en poblaciones silvestres donde las plantas son estrictamente dioicas, así como también en otras variedades dioicas (poblaciones compuestas por individuos macho y hembra), es necesaria la polinización cruzada para su reproducción (Chávez-Pesqueira y Núñez-Farfán 2014).

Por otro lado, los principales agentes de dispersión de polen en papaya son el viento e insecto polinizadores. Se han descrito diversas especies responsables del intercambio de polen, principalmente del orden Himenóptera y Lepidóptera (Brown et al., 2012; Dey et al., 2016). Por otro lado, la dispersión de semillas es probable que se dé por pequeños mamíferos y aves que se alimentan de los frutos (Brown et al., 2012; Chávez-Pesqueira et al., 2014)

1.2 Poblaciones silvestres

La papaya silvestre es considerada una planta pionera de selva tropical y subtropical de rápido crecimiento, se establece y crece rápidamente en claros de vegetación y en zonas con algún grado de disturbio (Paz & Vázquez-Yanes, 1998). Las plantas silvestres son principalmente polinizadas por esfíngidos (Brown et al., 2012) y representa un elemento clave en la dinámica de regeneración de los bosques tropicales (Chávez-Pesqueira et al., 2014). Su distribución natural abarca desde el trópico norteño de México hasta el límite entre Nicaragua y Costa Rica (Núñez-Farfán, 2017) (Fig. 1). Sin embargo, todavía falta mucha información sobre su distribución y otros aspectos relacionados a la biología de la especie (Chávez-Pesqueira et al., 2014).

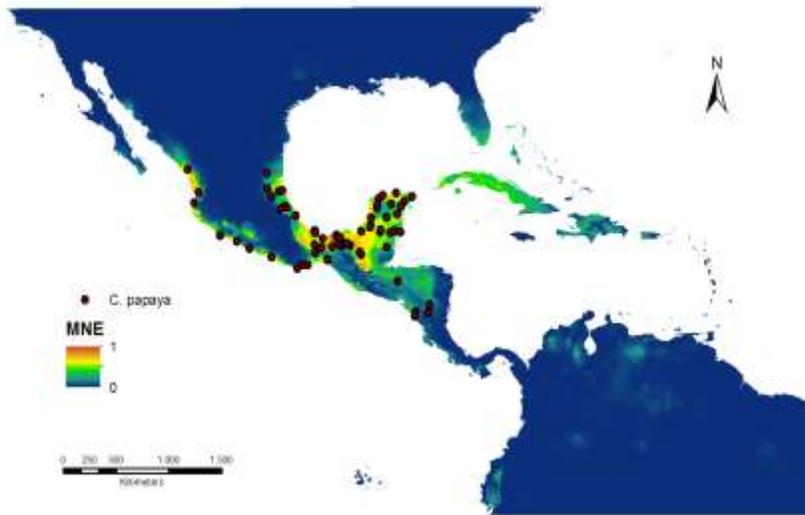


Figura 1. Mapa de distribución puntual de la especie *Carica papaya* en su forma silvestre. La distribución está basada en 81 registros (puntos rojos) de individuos silvestres. El color rojo muestra las zonas de mayor probabilidad para encontrar a la especie, mientras que el azul oscuro las zonas de nula probabilidad.

Tomado de: CONABIO (Núñez-Farfán, 2017)

El proceso de domesticación ha conllevado una serie de cambios tanto morfológicos como fisiológicos en las plantas cultivadas que las diferencia de sus parientes silvestres. Estos cambios son conocidos como síndrome de domesticación. En el caso de *C. papaya* la característica más contrastante se encuentra en el número y el tamaño de fruto, así como también la estructura floral. Las plantas de papaya comercial producen un promedio de 25 frutos ovalados por árbol con un peso mínimo de 1.5 kg por fruto y de 10-50 cm, mientras que la papaya silvestre es capaz de producir 70 frutos redondos por árbol con un peso promedio de 20 a 35 gramos y de 4 a 8cm (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016; Fuentes & Santamaría, 2014). Por otro lado, los frutos de los organismos silvestres presentan un mesocarpio delgado con una gran cantidad de semillas (entre 200-400 semillas) en comparación con las variedades cultivadas (entre 300-700 semillas) (CONABIO, 2015; Fuentes & Santamaría, 2014; ISAAA, 2016; Manshardt, 2012).

Otro rasgo importante seleccionado durante el proceso de domesticación de algunas variedades es la presencia de organismos hermafroditas en grandes proporciones en cultivos de papaya, mientras que las poblaciones silvestres son estrictamente dioicas (Chávez-Pesqueira et al., 2014; Manshardt, 2012; Niklas & Marler, 2007).

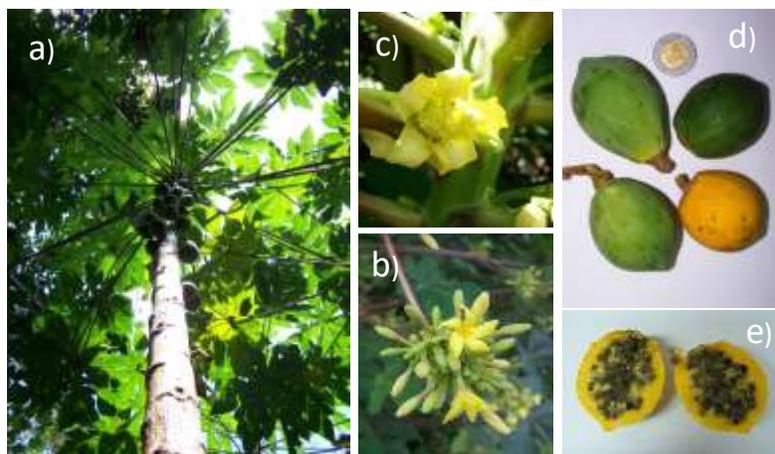


Figura 2. Características morfológicas de *Carica papaya silvestre*. (a) Planta femenina con frutos. (b) Inflorescencia masculina. (c) Flor femenina. (d) Fruto redondo. (e) Fruto abierto. Tomado de Chávez-Pesqueira et al; 2014

En cuanto a las semillas, aunque son similares en color y forma, las de papaya cultivada son un 25% más pesadas y grandes que las semillas de papaya silvestre. Aunado a esto, el comportamiento de germinación también difiere significativamente, ya que el número de semillas germinadas y tasa de germinación en semillas de papaya cultivada es significativamente mayor que la de su pariente silvestre. Asimismo, las semillas de papaya silvestre pueden mantenerse en estado de latencia por un largo periodo de tiempo cuando se encuentran enterradas, característica que parece haberse eliminado en las poblaciones de papaya cultivada durante el proceso de domesticación (Paz & Vázquez-Yanes, 1998).

De igual manera se han reportado diferencias en la altura y diámetro del vástago entre plantas cultivadas y silvestre de *C. papaya*. El proceso de domesticación ha resultado en una reducción de tres rasgos críticos funcionales: 1) la altura y diámetro basal del vástago, 2) la proporción de vástago en relación con el diámetro y 3) la altura de la primera floración (Niklas & Marler, 2007).

Actualmente existen pocos estudios relacionados con la diversidad genética de la papaya silvestre (Brown et al., 2012; Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016; Van Droogenbroeck et al., 2002). En México únicamente los estudios de Chávez-Pesqueira y Núñez-Farfán (2014, 2016) han tomado este enfoque. En dichas investigaciones, se analizaron 19 poblaciones silvestres de papaya distribuidas en el norte de Mesoamérica.

Con el empleo de marcadores nucleares y de cloroplastos se logró determinar una alta diversidad genética, así como también la delimitación de seis grupos en la región con base a su estructura genética. En estos estudios también se evidenció el movimiento de genes de papaya cultivada a silvestre (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016), lo que podría tener repercusiones en la diversidad genética de las poblaciones naturales. Aunado a lo anterior, la fragmentación del hábitat es considerada una de las principales amenazas de la especie en México, por lo que son necesarios más estudios para la elaboración de estrategias de conservación de la especie (Chávez-Pesqueira y Núñez-Farfán 2014).

1.3 Variedades de papaya

La papaya es una planta que se cultiva en prácticamente todas las regiones tropicales del mundo, lo que ha permitido el desarrollo de distintas variedades. Actualmente se han reportado más de 50 variedades (ITFNET, 2016). De éstas, la variedad Maradol, Solo, Tainung y Waimanalo tienen la mayor producción a nivel mundial.

1.3.1 Variedades de papaya en México

Además de las variedades *cera* y *mamey* que son consideradas nativas mexicanas (ITFNET, 2016), actualmente se han desarrollado nuevas variedades con la finalidad de satisfacer las necesidades y tendencias de mercado como son:

- Azteca: híbrido que proviene de una colecta de genotipos iniciada en 1993 en el Estado de Tabasco. Sus principales características son la resistencia a virosis, suavidad y aroma de la pulpa, así como el grosor del epicarpio. La fruta es ovalada con pulpa naranja, con un peso de 2 a 2.8 kg. La variedad fue desarrollada en el Campo Experimental Huimanguillo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Mirafuentes & Azpeitia, 2008).
- Chakput y Kanput: son híbridos entre papaya silvestre colectada en la región sureste de México y papaya Maradol, desarrollados en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Son caracterizadas por ser plantas hermafroditas que presentan resistencia a enfermedades como la antracnosis, tolerancia a estrés térmico y períodos de sequías. El fruto tiene un peso de 500 gr y 15 cm de largo (Santamaria, 2017).

- MSXJ: híbrido entre papaya criolla colectada en Tabasco y papaya comercial Maradol. La principal característica de esta variedad es que los frutos provenientes de las plantas hermafroditas no presentan carpeloide. En cuanto a tamaño, color y firmeza, son similares a los frutos de la variedad Maradol. La variedad fue desarrollada en el Campo Experimental Mocochedel del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Santamaría et al., 2014)

Por otro lado, instituciones privadas dedicadas a la producción y mejoramiento genético de papaya en México como Semillas del Caribe y Papaya Seed Legon también se han dedicado al desarrollo de nuevas variedades. Semillas del Caribe ha desarrollado las variedades *sensation*, *intenza*, *siluet* y *sweet sense*; mientras que Papaya Seed Legon ha desarrollado *lenia*, *carince heavy* y *guajira*. Variedades que ya han sido registradas en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2018)

2 Producción de papaya en el mundo

2.1 Producción a nivel mundial

El cultivo de papaya se ha extendido a todos los trópicos del mundo, en regiones con una altura entre 0 y 400 m, prosperando a temperaturas que oscilan entre 20 y 28°C. Su producción a nivel mundial ha aumentado de 2.5 millones de toneladas en 1980 a 13 millones de toneladas en 2016 (FAO, 2017). En la actualidad, el área total ocupada para producción de papaya abarca aproximadamente 441,964 ha, lo que equivale al 0.031% de la tierra destinada para cultivos. Antes de 1980, tan solo abarcaba 178,519 ha, es decir, ha aumentado más del doble el área de cultivos de papaya en 40 años (FAO, 2017) (Fig. 3 panel a).

De las 13 millones de toneladas de papaya producidas anualmente, el 75% de la producción de papaya de todo el mundo se concentra en solo 5 países, de los cuales la India es el principal productor de papaya contribuyendo con aproximadamente la mitad de la producción mundial de papaya (43%), seguido de Brasil, Indonesia, Nigeria y por último México (Fig. 3, panel b). Es importante destacar que la India ha aumentado drásticamente la producción de papaya, ya que pasó de 450 mil tn a 6 millones de tn en tan solo 18 años, a

diferencia de los otros países productores que han aumentado su producción de manera gradual (Fig. 3, panel b). En cuanto a área cultivada se refiere, India ocupa la mayor área de producción de papaya, lo que representa el 0.04% (133 mil ha) del área total del país (FAO, 2017) (Figura 3, panel b).

Por otro lado, los principales países exportadores de papaya en el mundo son México, Brasil, Malasia y Estados Unidos, India, Sri Lanka, siendo México el principal exportador de papaya a nivel mundial con 168 mil toneladas anuales, lo que equivale al 59% de las exportaciones de papaya a nivel mundial, seguido de Brasil con tan solo 39 mil toneladas anuales (United Nations, 2017). Es importante destacar que a pesar de que la India es el mayor productor de papaya, no figura dentro de los principales exportadores de papaya (Fig. 3, panel c).

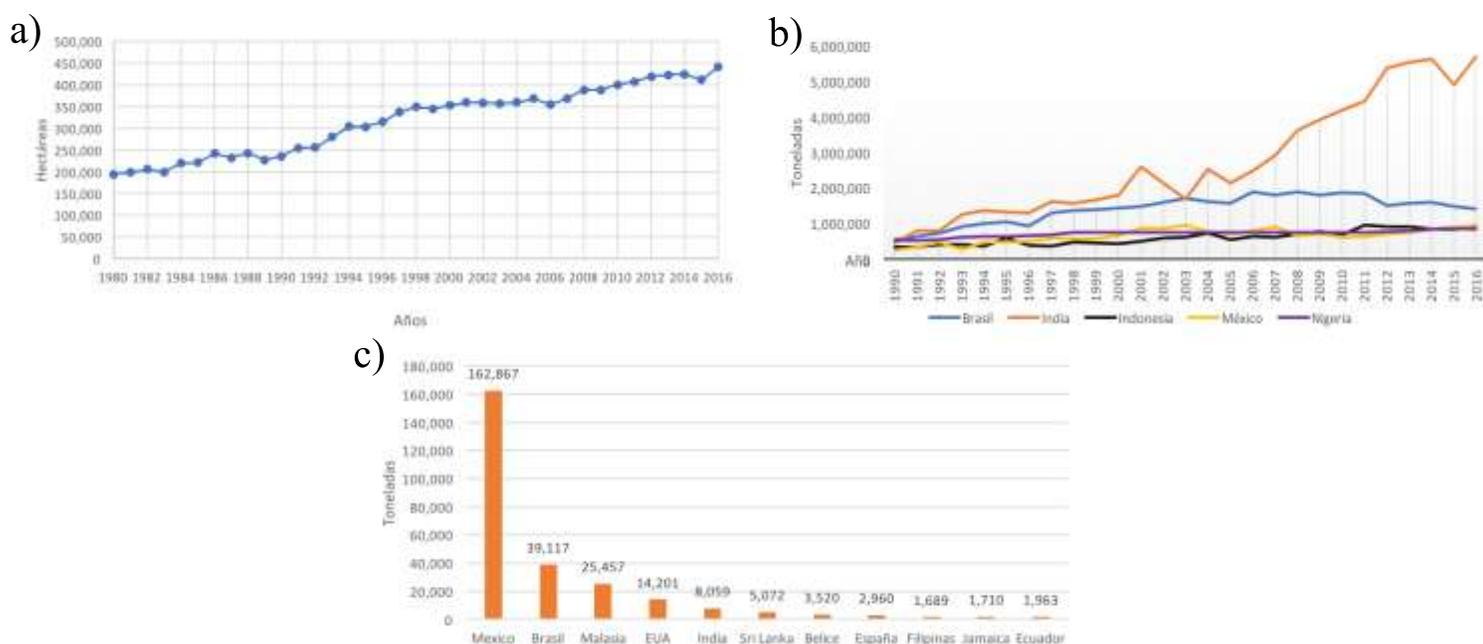


Figura 3. Producción de papaya a nivel mundial. Panel a) hectáreas destinadas a la producción de papaya a nivel mundial (1980-2016), panel b) principales productores de papaya a nivel mundial (1990-2016) y panel c) principales países exportadores de papaya. Fuente: FAO, 2017.

2.2 Producción de papaya en México

La papaya es considerada una fruta de importancia económica en México, su producción ha aumentado significativamente de 177 mil toneladas en 1990 a 961 mil toneladas anuales en el 2016 (SIAP, 2018) es decir, ha cuadruplicado su producción en los últimos 28 años (Fig. 4, panel a). Actualmente el área sembrada para la producción de papaya abarca el 0.009% del territorio nacional siendo una de las principales frutas tropicales que se cultiva en México (Fig. 4, panel b). Sin embargo, a pesar del aumento en la producción a lo largo de los años, el área cultivada de papaya no ha crecido drásticamente en la última década, la cual ha fluctuado entre las 18,000 ha a 23,000 ha de papaya cultivada.

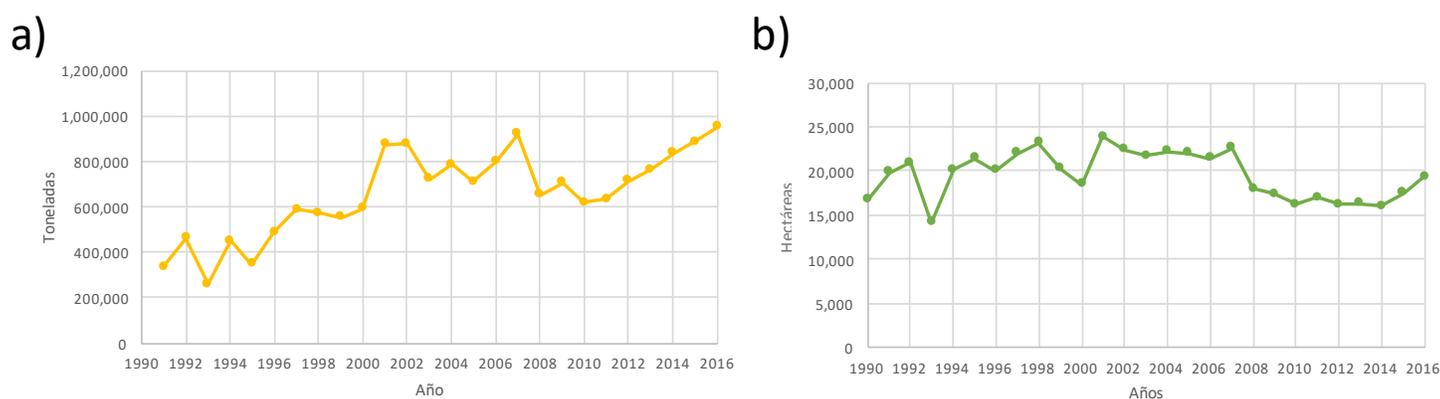


Figura 4. Producción de papaya en México. Panel a) toneladas de producción de papaya de 1990-2016, panel b) hectáreas destinadas a producción de papaya de 1990-2016. Fuente: SIAP, 2018.

Hoy en día 19 estados de los 32 se dedican a su producción (Fig. 5). Siendo Oaxaca el mayor productor de papaya, contribuyendo con el 30% de la producción anual nacional, seguido de Colima (17.5%), Chiapas (15%), Veracruz (11%), Michoacán (8.3%), Guerrero (4.5%), Campeche (2.8%), Jalisco (2.57%) y Yucatán (1.9%) (Fig.6 panel a). En cuanto al área de siembra, a pesar de que Oaxaca es considerado el mayor productor de papaya en México, los estados de Michoacán, Colima y Veracruz ocupan mayor parte de su territorio para la siembra de papaya, con 3,325 ha, 3,262 ha y 3208 ha respectivamente. (SIAP, 2018).

En las últimas décadas prácticamente la única variedad producida ha sido la variedad Maradol, la cual ha ocupado el 99% de la producción en los últimos años, desplazando a variedades como la papaya amarilla, roja o mamey y Criolla, que sumadas apenas representan el 1% de la producción nacional anual de papaya (Fig.6 panel b). Solo 5 estados de los 19 productores de papaya aun producen variedades distintas a la Maradol, siendo Veracruz el mayor productor de papaya amarilla y roja, seguido de Guerrero para papaya roja y Sinaloa para papaya amarilla (Fig. 6 panel c). Es importante destacar que el único estado productor de papaya hawaiana en la actualidad es Nayarit (Fig. 6 panel c).

México, como principal país exportador de papaya en el mundo contribuyen con el 59% de la exportación total. De las 162, 867 ton de papaya exportada, el 99.9% va dirigida a los Estado Unidos y menos del 1% a Canadá, Reino Unido, Alemania, Países Bajos, España, Colombia, Cuba y Francia (Secretaría de Economía, 2018) (Gráfica 1). El estado de Colima es el principal contribuyente, con el 60% de las exportaciones de papaya (SAGARPA, 2014).



Figura 5. Estados productores de papaya en México 2017. El color representa la cantidad de toneladas producidas por cada estado anualmente, siendo el rojo el número máximo. Fuente: (SIAP, 2018).

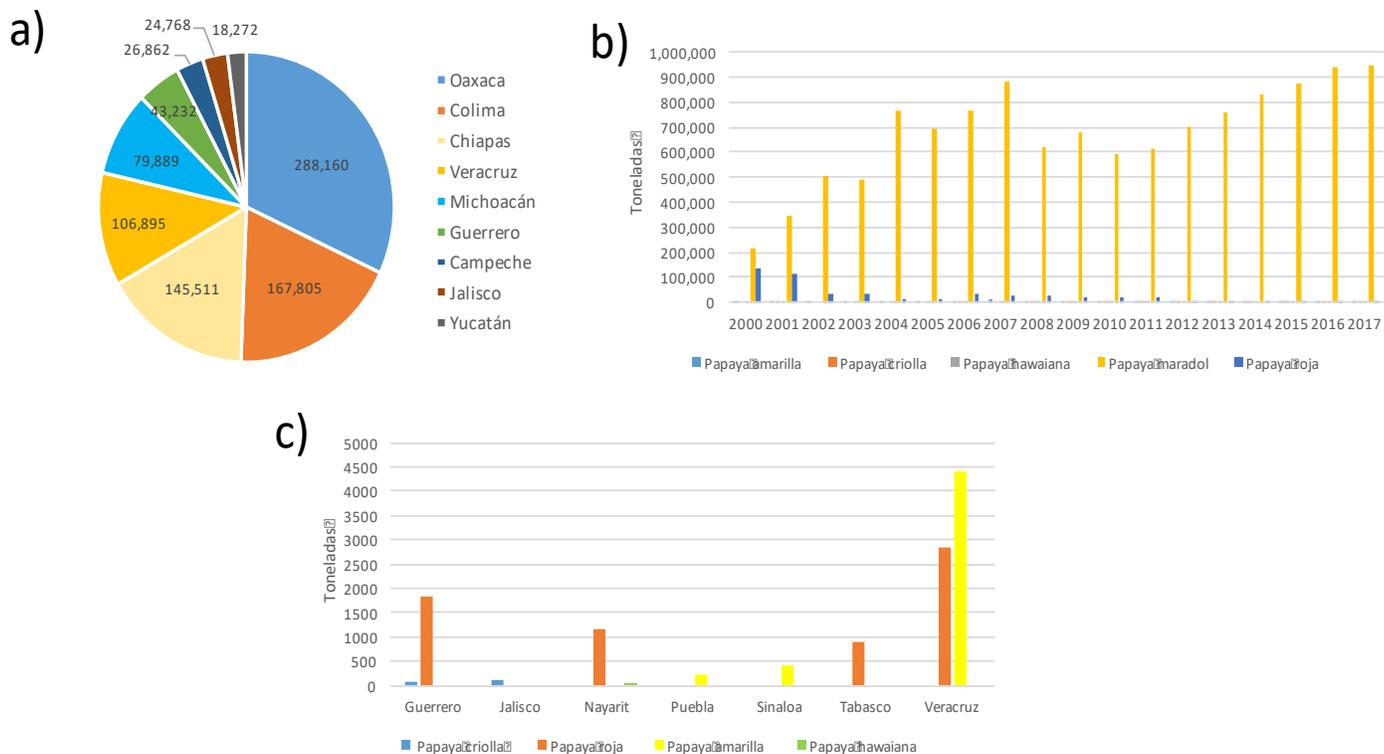
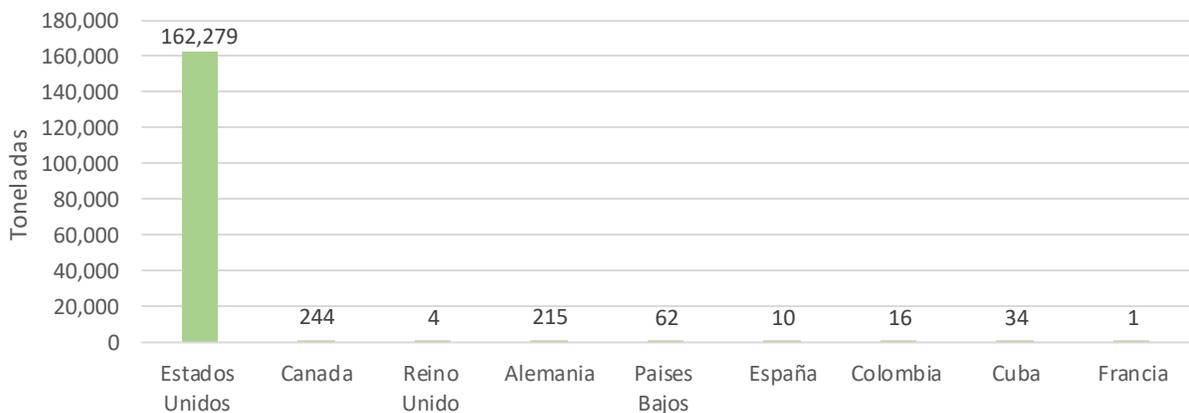


Figura 6. Producción general y de variedades nativas de papaya a nivel estatal. Panel a) toneladas producidas por los principales estados productores en 2017 , panel b) distintas variedades de papaya producidas de 2000-2017 y panel c) estados productores de las distintas variedades de papaya. Fuente: SIAP, 2018.



Gráfica 1. Destino de exportaciones de papaya mexicana para el 2017. En el eje x: principales países importadores a nivel mundial. En el eje y: toneladas importadas. Fuente: Secretaría de Economía, 2018.

3 Plagas y enfermedades

Diversas plagas y enfermedades son causantes de importantes pérdidas en la producción comercial de papaya en el mundo. Los áfidos (*Mysus persicae*, y *Aphis gossypii*), ácaros (*Tetranychus cinabarinus* y *Polyphagotarsonemus latus*), hongos (*Phytophthora palmivora* y *Pythium aphanidermatum*) y bacterias (*Rickettsia sp*), son plagas frecuentemente asociadas a cultivos de papaya (Calderon Rivera & Cepeda Vergara, 1996). No obstante, la mayor pérdida en la producción a nivel mundial se encuentra relacionada con el Virus de la Mancha Anular de la Papaya (PRSV-P, por sus siglas en inglés) (Cabrera et al., 2010).

3.1 PRSV- P

El PRSV es un virus perteneciente al género *Potyvirus* que es transmitido por áfidos. Cuando las plantas se encuentran infectadas, se produce la deformación y reducción de la lámina foliar. En la parte superior del tallo y en los pecíolos se forman manchas aceitosas y en la superficie de los frutos afectados se producen manchas en forma de anillos concéntricos que provocan la deformación y reducción del tamaño de los frutos (Cabrera et al., 2010). En México se encuentra distribuido prácticamente en todas las regiones productoras de papaya, siendo una de las principales amenazas en la producción nacional (Noa-Carranza et al., 2006).

4 Estrategias de mejoramiento genético - cruzas selectivas con parientes silvestres

Los desarrollos de mejoramiento genético de *C. papaya* se han hecho con el objetivo principal de combatir el PRSV- P. Se han realizado cruzas selectivas utilizando parientes silvestres de *C. papaya*, principalmente del género *Vasconcelle*. Estos intentos por mejorar genéticamente los cultivos de papaya han tenido resultados variados. Por ejemplo, se ha logrado hibridar con éxito a *Vasconcellea cauliflora* x *C. papaya* y *Vasconcellea cundinamarcensis* x *C. papaya*, sin embargo, la mayoría de los híbridos no alcanzan a vivir hasta la floración y los pocos sobrevivientes son infértiles (Horovitz & Jiménez, 1967; Magdalita et al., 1997; Manshardt & Wenslaff, 1989). En algunos otros casos, a pesar de

encontrar un aumento en la vida media de los híbridos, estos presentaban una tasa muy baja de viabilidad de polen, impidiendo su éxito reproductivo (*Vasconcellea quercifolia* x *C. papaya* y *Vasconcellea parviflora* x *C. papaya*) (Drew et al., 2006; O'Brien & Drew, 2009).

Actualmente se ha revelado que existe distancia filogenética entre el género *Vasconcellea* y *Carica* (Carvalho & Renner, 2015), lo que podría dificultar y obstaculizar estos intentos de mejoramiento. Por ello, Carvalho y Renner (2012) han sugerido que los géneros *Horovitzia* y *Jarilla* son mejores candidatos para el mejoramiento de papaya debido a la cercanía entre estos géneros, pero en la actualidad no hay trabajos relacionados con estas especies.

Finalmente, en México se han realizado intentos por cruzar *Carica papaya* silvestre x *Carica papaya* cultivada con el objetivo de obtener híbridos de poca altura como las variedades comerciales, pero más productivos, como es el caso de los organismos silvestres. Este mejoramiento resultó ser el más prometedor y actualmente se sigue intentando lograr su exitoso cruzamiento (Vázquez Calderón et al., 2014)

5 Papaya genéticamente modificada

Un Organismo Genéticamente Modificado (OGM) es aquel que ha adquirido una combinación genética novedosa y que ha sido generado a través del uso de técnicas de la biotecnología moderna. Estas técnicas incluyen el uso de ácido desoxirribonucleico (DNA y ARN) recombinante, la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que supera las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional (LBOGM, 2005).

Los OGMs, también conocidos como transgénicos u OVMs (Organismos Vivos Modificados), han sido desarrollados con la finalidad de presentar características novedosas que antes no estaban presentes en la especie, tales como resistencia a insectos o plagas (proteína *Cry* de la bacteria *Bacillus thuringiensis*) (Höfte & Whiteley, 1989), la tolerancia a herbicidas (e.g. glifosato) (Shah et al., 1986) y resistencia a virus entre otras características (Beachy et al., 1990) (COFEPRIS, 2017).

En el caso de la papaya es a finales de los 80s cuando la Universidad de Hawái desarrolla la primera papaya transgénica con la finalidad de otorgarle resistencia al PRSV, lo que resultó en dos variedades: *SunUp* y *Rainbow*, las cuales se comercializaron a partir de 1990. El vector empleado para la transformación de estas variedades fue un plásmido binario pGA482GG/cpPRSV-4 de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación contenía tres genes expresables en plantas, los genes *CP/PRSV*, *nptII* y *Gus*. La expresión del gen *CP/PRSV* se controló incluyendo el promotor y la terminación de la transcripción y las secuencias de señal de poliadenilación derivadas del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). La expresión del gen *nptII* estaba bajo el control de las secuencias promotora y terminadora del gen de nopalina sintasa (*nos*) de *A. tumefaciens*. El gen marcador *Gus*, se modificó para la expresión de la planta mediante la adición de la región promotora 35S de CaMV y la región de terminación 3' de *nos* (Tripathi et al., 2007).

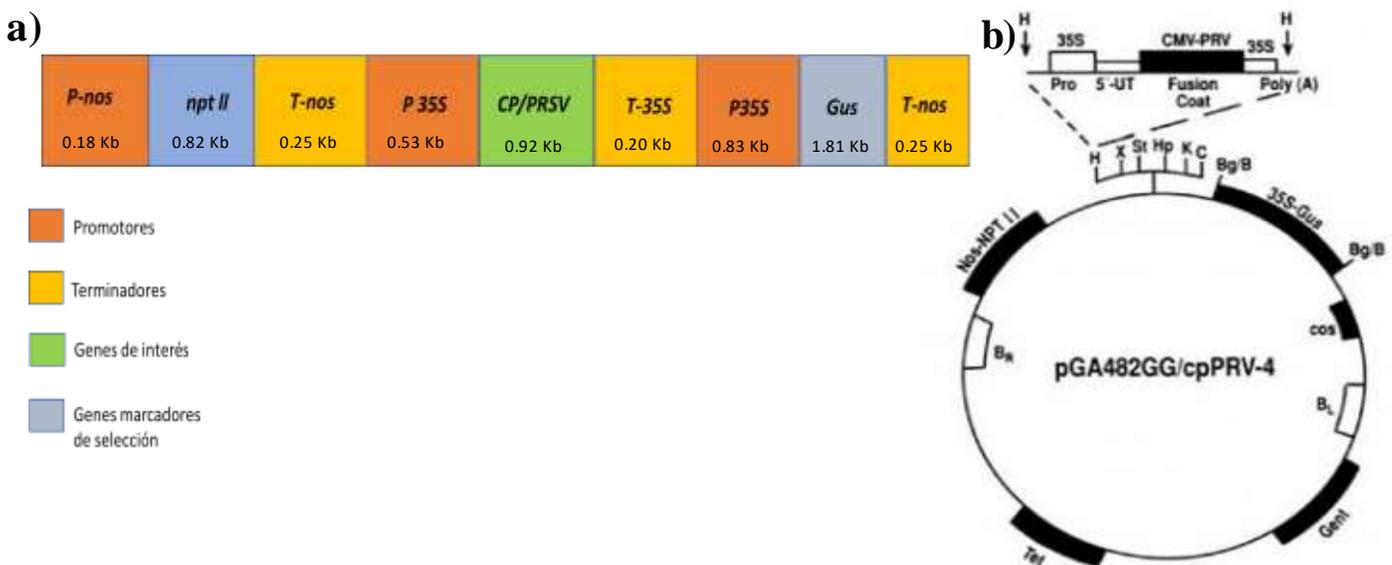


Figura 7. Construcción de la papaya transgénica Rainbow y SunUp (evento 55-1). (a) Genes insertados en papaya resistente al PRSV con sus respectivos pesos moleculares. En color naranja se presentan los promotores empleados en la construcción, en amarillo los terminadores, en verde el gen específico de interés y en morado, los genes marcadores de selección y genes reporteros. (b) Mapa de los genes funcionales del vector de transformación de *Agrobacterium* pGA482GG/cpPRV-4 utilizado para papaya resistente a PRSV. El casete del gen *CP/PRSV* consiste en el gen estructural CP del PRSV flanqueado por genes marcadores seleccionables y visibles, *nptII* y *Gus*, respectivamente. BR y BL son los bordes izquierdo y derecho de la secuencia de T-DNA del vector de transformación. Tomado de Tripathi et al (2007).

Cabe destacar que la papaya transgénica resistente al PRSV es considerada la primera fruta cultivada que se modificó genéticamente, así como también el primer árbol obtenido mediante ingeniería genética y el primer transgénico desarrollado por una institución pública (Gonsalves, 1998).

El desarrollo de papaya transgénica resistente al PRSV fue un parte aguas para el empleo de la ingeniería genética en este cultivo, con la finalidad de abordar otras problemáticas relacionadas a su producción, entre las que se encuentran la corta vida anaquel (López-Gómez et al., 2009), la toxicidad debida al alto contenido de aluminio en suelos ácidos (de la Fuente et al., 1997), la tolerancia a herbicidas (Cabrera-Ponce et al., 1995), la infestación de insectos y hongos (McCafferty et al., 2006), y la tolerancia a bajas temperaturas (Dhekney et al., 2007), tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Rasgos introducidos en *Carica papaya* mediante ingeniería genética

Rasgo	Transformación	Producto	Función	Referencia
Aumento de la vida de anaquel	Bloqueo de ACC sintasa y ACC oxidasa	ND	Inhibición del proceso de producción de etileno	López-Gómez et al., 2009
Tolerancia al frío	Inserción de los genes <i>CBF1</i> y <i>CBF3</i>	Factor transcripcional de la familia DREB	Aumento en la tolerancia a la congelación	Dhekney et al., 2007
Resistencia a fitóforos	Inserción del gen <i>DmAMP1</i>	Proteína defensora 1 (DmAMP1)	Induce un aumento en la secreción de K ⁺ , mayor absorción de Ca ²⁺ y cambios en el potencial de membrana	Zhu et al., 2007
Tolerancia a ácaros	Inserción del gen de la quitinasa (<i>msh</i>)	Enzima quitinasa	Interviene en el metabolismo de la quitina en insectos	McCafferty et al., 2006

Tolerancia al aluminio	Inserción del gen Citrato sintetasa (<i>cs</i>)	Enzima citrato sintetasa	Extracción del aluminio fuera de la membrana plasmática impidiendo su captación	de la Fuente et al., 1997
Tolerancia a herbicidas	Inserción del gen <i>bar</i>	Fosfinotricina-acetil transferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato	Cabrera-Ponce et al., 1995
Vacuna contra tuberculosis	Inserción del gen <i>esat-6</i>	Proteína ESAT	Induce inmunidad a la tuberculosis	Zhang et al., 2003
Vacuna contra cisticercosis	Inserción de Secuencias de KETc	Expresión de péptidos KETc	Induce inmunidad a cisticercosis	Hernández et al., 2007

Las transformaciones genéticas en papaya han sido realizadas mediante diferentes técnicas, tales como la transferencia por *Agrobacterium tumefaciens* y el bombardeo de partículas. Los principales métodos de transformación, así como sus promotores y marcadores de selección son resumidos a continuación (Dhekney et al., 2016).

5.1 Protocolos de transferencia de genes

La mayor parte de las transformaciones que se han realizado en papaya han sido desarrolladas en embriones somáticos y cultivos embriogénicos, utilizando principalmente dos métodos: 1) Bombardeo de partículas y 2) *Agrobacterium tumefaciens* (Fitch et al., 1990, 1993; Pang & Sanford, 1988). El bombardeo de partículas es un método directo de transformación que se basa en el disparo de partículas de oro o tungsteno que contienen el DNA foráneo sobre células, tejidos u órganos vegetales. Esta técnica fue descrita por primera vez en papaya por Fitch y colaboradores en 1990 y actualmente es la técnica más utilizada en la transformación de este cultivo. El otro tipo de método de transformación es el mediado por *A. tumefaciens*, que es una bacteria gram-negativa fitopatógena del suelo que causa tumoración en las plantas infectadas, esto resulta en la capacidad de infectar una célula hospedera y transferir fragmentos de DNA de manera estable. El primer protocolo de

transformación de papaya mediado por *A. tumefaciens* fue desarrollada por Pang & Sanford (1988) y es considerado el inicio en el desarrollo de papaya transgénica en la historia.

5.2 Promotores empleados en papaya transgénica

Los promotores son regiones de DNA que controlan el inicio de la transcripción de una porción del mismo, que permiten la expresión de genes de interés en todas las células (Gonsalves, 1998). Existe una gran diversidad de secuencias de origen viral que son utilizadas como promotores de expresión consecutiva en la transformación de plantas transgénicas, tales como el CsVMV (proveniente del Virus del Mosaico de la Vena de la Yuca), BSV (proveniente del Virus de la Raya del Plátano) y CaMV (proveniente del Virus del Mosaico de la Coliflor) (De Guglielmo & Da Silva, 2016). En el caso de *C. papaya*, el promotor CaMV es el que se ha empleado la transformación de plantas. Esta generalidad en el uso de este promotor se debe a que es el único que ha permitido conducir altos niveles de expresión de los rasgos insertados en esta fruta (Gonsalves, 1998). En la Tabla 2 se muestra los rasgos que se han logrado introducir con el empleo de dicho promotor.

Tabla 2. Uso del promotor 35S del Virus de la Mancha de la Coliflor para la expresión de distintos rasgos en papaya

Rasgo introducido	Referencia
Resistencia al PRSV	Pang y Stanford; 1988 Fitch et al., 1990 Lines, 2002 Fermin et al., 2004
Resistencia a fitóforos	Zhu et al; 2007
Tolerancia a artrópodos	McCafferty; 2006
Tolerancia al frío	Dhekney et al; 2007
Tolerancia a herbicidas	Cabrera-Ponce et al; 1995
Vacuna contra cisticercosis	Hernández et al; 2007

5.3 Genes utilizados como marcadores de selección y reporteros

Los genes marcadores de selección y genes reporteros son usados en ingeniería genética para determinar si la inserción de DNA ha sido exitosamente integrada en el genoma del organismo. Además, funcionan como herramientas para monitorear su presencia en caso de que sean liberados en el ambiente (Miki & McHugh, 2004). La viabilidad de un marcador es una parte esencial en la transformación genética en plantas. En el caso de la papaya, el marcador más utilizado ha sido neomicina fototransferasa II (*npt II*), el cual además de ser empleado como marcador, confiere tolerancia a la kanamicina. La kanamicina es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, de amplio espectro bactericida que actúa sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y Mycobacterium. Aunque este marcador ha sido usado principalmente en papaya transgénica resistente al PRSV (Bau et al., 2003; Fitch et al., 1990, 1993; Gonsalves, 1998; Souza Júnior et al., 2005) otras modificaciones relacionadas a tolerancia al frío (Dhekney et al., 2007), resistencia a hongos (Zhu et al., 2007) y vacunas contra la cisticercosis (Hernández et al., 2007) han integrado el *npt II* como marcador (Tabla 3).

Tabla 3. Gen marcador *nptII* utilizados en la expresión de distintos rasgos en papaya

Rasgo introducido	Gen marcador	Referencia
Resistencia al PRSV	<i>nptII</i>	Fitch et al., 1990, 1993 Souza Júnior et al., 2005 Gonsalves, 1998 Bau et al., 2003
Tolerancia a insectos	<i>nptII</i>	McCafferty, 2006
Resistencia a fitóforos	<i>nptII</i>	Zhu et al; 2007
Tolerancia a bajas temperaturas	<i>nptII</i>	Dhekney et al, 2007
Vacuna contra cisticercosis	<i>nptII</i> ,	Hernández et al; 2007
Resistencia a herbicidas	<i>nptII</i>	Cabrera-Ponce et al; 1995

Otros genes marcadores en papaya que se han utilizado son los genes *bar* y *Gus*. El primero es un gen marcador de selección (gen *bar*) que codifica para la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT), que confiere tolerancia a herbicidas eliminando la actividad herbicida del glufosinato por medio de la acetilación (Cabrera-Ponce et al., 1995). El segundo es un gen reportero que codifica para la enzima β -glucoronidasa. La actividad de esta enzima se detecta fácilmente utilizando sustratos con presencia de glucurónicos, y a diferencia de los marcadores de selección, los productos derivados de la reacción de los genes reporteros pueden ser cuantificados por métodos colorimétricos, espectrofotométricos o fluorimétricos (Jefferson et al., 1987).

5.5 Métodos de detección de papaya transgénica

Existen diferentes métodos para la detección de OGMs, pero actualmente los métodos aceptados y validados por las instancias regulatorias internacionales están basados en la detección de secuencias de DNA, como es el caso del análisis por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Rosa et al., 2016; Somma & Querci, 2009). Esta técnica permite la amplificación de fragmentos específicos de DNA presentes en baja frecuencia, lo que la hace una técnica específica y sensible.

La identificación mediante PCR se divide en cuatro categorías. La primera categoría se caracteriza por el método de cribado, el cual consiste en la detección de fragmentos comunes ampliamente utilizados para la inserción del DNA-t, tales como el promotor 35S CaMV, el terminador *nos*, los genes marcadores de selección como *npt II* y el gen *Gus*. La segunda categoría es la detección específica, la cual se refiere a la detección del gen de interés insertado, tal como el caso de la cubierta proteica de un virus (CP), genes de resistencia a insectos o de tolerancia a herbicidas. La tercera categoría es la detección del fragmento de unión entre el promotor y el transgen específico. La última categoría, consiste en la detección específica de eventos, que tienen como blanco las regiones fronterizas del DNA-t insertado y las secuencias flanqueantes correspondientes al DNA genómico de la planta (Holst-Jensen et al, 2003). La Comisión Europea considera que estas categorías deben ser utilizadas como una serie de pasos a seguir para la detección de OGM (Rosa et al; 2016; Somma & Querci 2009).

En el caso de la papaya, los desarrollos de resistencia al PRSV iniciaron en 1987 y culminaron en 1998 con la liberación comercial de dos cultivares: *Rainbow* y *SunUp* en Hawái (Gonsalves, 1998). Sin embargo, es hasta el 2001 cuando Goda y colaboradores establecen el primer protocolo de detección de papaya transgénica para la línea 55-1. Este protocolo de detección consistía en el análisis de PCR punto final para detectar los genes selectivos *nptII* y *Gus*.

El trabajo de Goda y colaboradores (2001), sirvió como guía para el desarrollo de futuros protocolos de detección para las diferentes líneas de papaya transgénica autorizada y no autorizada. Esto permitió explorar nuevas técnicas de PCR para su monitoreo, tales como PCR múltiples y tiempo real. La primera consiste en la amplificación de diferentes fragmentos de DNA simultáneamente (Wall et al., 2004), mientras que el segundo consiste en la amplificación y cuantificación simultánea del producto de la reacción (Kim et al., 2010). Aunado a esto, es importante destacar que se han utilizado una amplia gama de marcadores para la detección de papaya transgénica, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Métodos de detección empleados para cada una de las líneas de papaya transgénica

Línea transgénica	Método	Blanco	Referencia
Línea 55-1	PCR punto final	<i>nptII</i>	Goda et al; 2001
		<i>Gus</i>	Ovesná & Hodek, 2009
		P35S	
	PCR múltiple	<i>nptII</i>	Wall et al; 2004
		<i>Gus</i>	Matsumoto et al., 2010
		P35S	Kim et al; 2010
		<i>PRSV (CP)</i>	
	PCR tiempo real	<i>PRSV (CP)</i>	Nageswara-Rao et al, 2011
Huanong 1	PCR punto final	<i>PRSV (CP)</i>	Wei et al., 2016
	PCR tiempo real	<i>PRSV (CP)</i>	Xu et al., 2008
			Wei et al; 2016
PRSV-YK	PCR tiempo real	P35S/ <i>PRSV (CP)</i>	Nakamura et al., 2011
16-10-1	PCR punto final	<i>nptII</i>	Fan et al., 2009
17-10-5		<i>Gus</i>	
18-2-4		P35S	
		<i>P35S/PRSV</i>	

6 Bioseguridad y papaya GM

La papaya resistente al PRSV (eventos 55-1 y 63-1) fue desarrollada por la Universidad de Cornell (EUA) en colaboración con la Universidad de Hawái en 1997, y fue autorizada para su comercialización en los Estados Unidos en 1998. En 2002, Canadá autorizó el comercio de papaya GM (evento 55-1) proveniente de Hawái. El Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca de Japón le otorgó la aprobación japonesa y la anunció oficialmente

con el etiquetado de calidad de alimentos procesados GM en 2012. Así mismo, China en el 2010 autorizó la producción y comercialización de papaya GM resistente a PRSV (evento Huanong No. 1), desarrollada por la Universidad de Agricultura del Sur de China, la cual actualmente abarca 6000 ha de cultivo. En el 2008, un evento más (evento X17-2) se aprobó para su producción y comercialización en los Estados Unidos, el cual fue desarrollado por la Universidad de Florida (ISAAA, 2016).

Hoy en día solamente Estados Unidos, Japón, Canadá y China han permitido la comercialización de papaya GM, sin embargo, 12 países pertenecientes a la Unión Europea han reportado la presencia de papaya transgénica no autorizada importada de diferentes países. De 2005 a 2017 se han registrado 66 casos de presencia de papaya transgénica por parte de la Unión Europea, de los cuales 46 de ellos fueron papayas importadas provenientes de Tailandia, ocho importadas de Estados Unidos, y cuatro provenientes de China, Camboya, India y Vietnam. Es importante destacar que de los países de donde provenían las papayas transgénicas, únicamente Estados Unidos es el país que ha autorizado la comercialización y producción de papaya transgénica (European Commission, 2018)

No obstante, solo tres estudios se han enfocado en el flujo de transgenes en papaya. Manshardt y colaboradores (2007) realizaron el primer trabajo en Puna, Hawaii, utilizando el gen reportero *Gus* para analizar el flujo de transgenes en semillas. Este análisis consistió en el rastreo del movimiento del polen de una parcela central de 0.5 ha de plantas ginodíicas transgénicas hacia plantas de papaya no transgénica ubicadas en el borde circundante. La presencia del gen *Gus* se detectó en un 34% de las muestras analizadas, de las cuales, 70% fueron plantas femeninas (43% de las semillas analizadas), y 13% plantas hermafroditas (7% de las semillas), que se encontraban segregadas en el borde circundante a las plantas de papaya transgénica.

Posteriormente, Gonsalves y colaboradores en el 2012, llevaron a cabo un experimento similar, en el cual rodearon plantas no transgénicas con plantas transgénicas en parcelas de campo. Se registró la presencia del gen *Gus* en 1.3% de los embriones analizados de los árboles hermafroditas no transgénicos que se encontraban rodeados de plantas de papaya transgénicas. Sin embargo, los resultados fueron drásticamente diferentes

cuando los árboles femeninos de plantas no transgénicas fueron rodeados por plantas de papaya hermafrodita transgénica, observando que el 67.4% de los embriones de las plantas femeninas fueron positivos para el gen buscado.

Por último, Mandshardt y colaboradores en el 2016, llevaron a cabo un enfoque diferente para analizar el flujo de transgenes más allá de las parcelas experimentales. La finalidad de esta investigación fue analizar la presencia de transgenes en poblaciones ferales de papaya una década después del primer lanzamiento de la papaya transgénica en las islas de Oahu y Hawái. De las 623 plantas muestreadas, 22% fueron positivas para el gen *Gus*, 16% de las cuales fueron femeninas. La incidencia de plantas ferales con la presencia del transgen fue estrechamente relacionada a las regiones donde existe una mayor producción y comercialización de papaya GM. En Oahu, los campos de producción de papaya GM son pequeños, pero ampliamente distribuidos en la Isla, lo que dio como resultado un mayor flujo de genes y por ende una mayor presencia del transgen (el 26% de las plantas ferales fue GM), en comparación con Hawái (19% de las plantas ferales), donde el área de producción de papayas GM es mucho mayor en comparación con la isla de Oahu, pero el área de producción de papaya GM se restringe a una región geográfica relativamente pequeña de la isla.

Estos experimentos demuestran claramente los diferentes sistemas de apareamiento que operan en sexos femeninos y hermafroditas de papayas ginodióicas. Por un lado, las hembras están obligadas a la polinización cruzada, y, en consecuencia, los genotipos de la progenie son reflejo de la población presente en el ambiente, por lo que la presencia de plantas transgénicas con plantas no transgénicas de naturaleza dioica podría promover la transferencia de transgenes entre poblaciones. Por otro lado, las plantas hermafroditas son, en gran parte, auto-polinizadas y relativamente poco afectadas por el polen en el ambiente externo, lo que puede reducir el riesgo de flujo de transgenes en regiones donde solo coexisten plantas de carácter ginodióico.

Actualmente en México la papaya GM no se encuentra autorizada para su producción y comercialización. Solamente dos autorizaciones para parcelas experimentales se han otorgado y ambas fueron canceladas por los solicitantes. En 1997 se otorgó en Chiapas una autorización para sembrar papaya transgénica (evento 55-1) en una parcela

experimental, que poco después de su primera siembra desapareció debido al huracán Paulina y posteriormente no se le dio seguimiento. La segunda autorización de siembra de papaya GM fue dada por el Directorio General de Sanidad Vegetal (DGSV) pero fueron canceladas por los aplicantes antes de la primera siembra (Silva-Rosales et al., 2010). A pesar de lo anterior, en el país se han llevado a cabo investigaciones para el desarrollo de papaya transgénica resistente al PRSV (Silva-Rosales et al., 2010), tolerancia al Aluminio (de la Fuente et al; 1997) y tolerancia a herbicidas (Cabrera- Ponce et al, 1995). También se han realizado colaboraciones entre la Universidad de Colima y el Cinvestav-Unidad Irapuato para desarrollos de papaya transgénica (Silva-Rosales, et al. 2010).

Por otro lado, la presencia de transgenes se ha analizado y reportado en cultivos de gran importancia económica y considerados centros de origen como el maíz y el algodón, sin embargo, escasos estudios de esta índole existen en papaya. La aproximación más cercana referente al análisis de transgenes en papaya en México se ha realizado por Huerta Olguín (2016), en donde se analizaron 18 muestras de papaya provenientes de diferentes comercios en México y de las cuales ninguna resultó positiva para el transgén. Mas allá de este análisis, poco se sabe de la condición actual de las poblaciones silvestres y teniendo en consideración la importancia del complejo de especie de la papaya en nuestro país es importante evaluar el posible flujo de transgenes en papaya.

7 Legislación de OGMs

Una vez entendida la vital importancia de los recursos biológicos para el desarrollo económico y social de la humanidad, así como también el reconocimiento creciente de la diversidad biológica como un activo global de gran valor para las generaciones presentes y futuras; organizaciones a nivel mundial convocaron a la creación de tratados y convenios que protegieran la diversidad biológica y se encargaran de evitar y/o mitigar el potencial daño causado por OGMs. Tomando en cuenta la rápida expansión de las tecnologías y la creciente preocupación sobre los posibles efectos adversos tanto para la diversidad biológica, como para la salud humana, surge por primera vez en 1988 una convención destinada al tratado de estos temas. A partir de entonces, diversas cumbres y reuniones fueron realizadas, teniendo como productos los Protocolos de Seguridad de Biotecnología (1995), Protocolo de Cartagena (2000), Conferencia de las partes del Protocolo de

Cartagena-Kuala Lumpur (2004), hasta el Protocolo de Nagoya (2010) (Fig. 7). En estos trabajos de legislación se abordan no solo tópicos de conservación de diversidad biológica sino también se incluyen la necesidad de realizar monitoreos de OGMs en sitios donde estos conviven con parientes silvestres (CIBIOGEM, 2015).

En el caso de México, es hasta el 2000 cuando se integran estos tratados en la legislación; misma que da lugar a la formulación de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), la cual fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de marzo de 2005 y tiene por objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (CIBIOGEM, 2015; LBOGM, 2005).

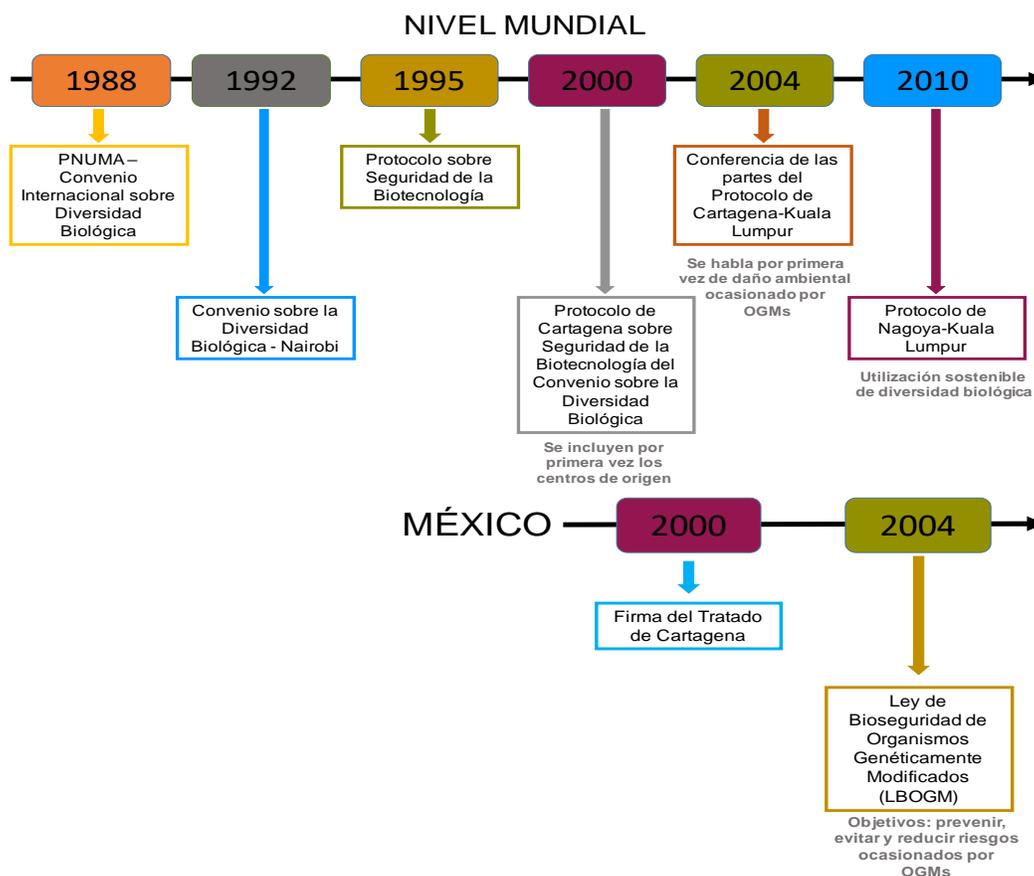


Figura 7. Línea del tiempo de los tratados y convenios realizados en materia de legislación de OGM

Justificación

México es considerado uno de los principales centros de origen y domesticación de muchas plantas (Harlan, 1971) y podría serlo para *C. papaya* (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017). Los centros de origen y diversidad de especies cultivadas poseen el reservorio genético necesario para futuros planes de mejoramiento de los cultivos (Kole, 2011). El problema estriba en que con la pérdida de poblaciones silvestres y variedades locales, se elimina de forma irreversible la diversidad genética que naturalmente incluye genes de adaptación a la zona en la que evolucionó (Esquinas-Alcázar, 1993). Bajo este contexto y considerando evidencias de la presencia de transgenes en cultivos de papaya en países en donde no está permitida su producción y consumo (European Commission, 2018), surge la necesidad de conocer la situación actual de la frecuencia de transgenes en poblaciones silvestres y cultivos en México como medida complementaria a las estrategias de conservación en la especie.

Objetivos

General

Monitorear la presencia de transgenes en *C. papaya* silvestre y domesticada en México

Particulares

- Analizar la presencia de transgenes en las diferentes variedades domesticadas de *C. papaya* cultivada en México, tanto en traspatio como de venta comercial
- Analizar la presencia de transgenes en poblaciones silvestres de *C. papaya* en México
- Proponer una estrategia para el monitoreo de papaya GM en México

Material y métodos

1 Material biológico

1.1 Poblaciones silvestres

Se analizaron 324 muestras de organismos silvestres que se distribuyen a lo largo de México, las cuales se encuentran representadas en la Figura 8.

Para la colecta de individuos se realizó una salida a campo para la colecta de muestras de papaya silvestre en el estado de Tabasco. Sin embargo, el mayor número de muestras de poblaciones silvestres fue proporcionado por el Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, UNAM, quienes previamente habían colectado muestras de 24 poblaciones de papaya silvestre distribuidas desde el trópico Norteño hasta el sur de México (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016). De estas muestras se analizaron de 10 a 15 individuos pertenecientes a 22 poblaciones. Es importante mencionar que las muestras colectadas fueron de individuos alejados de asentamientos humanos, estrictamente dioicos y con frutos pequeños con la finalidad de cerciorarse de que las colectas fueran de individuos silvestres. Aunado a lo anterior, la Dra. Andraca del Instituto de Ecología de la UNAM, proporcionó muestras de la localidad de Troncones, Guerrero.

1.2 Muestras de cultivos y traspatio

Se obtuvieron un total de 240 muestras de cultivos de papaya y 135 muestras de traspatio que se encuentran representadas en la Figura 8.

Las muestras de tejido de cultivos se colectaron en los estados de Oaxaca, Veracruz y Yucatán, que además de figurar entre los estados productores de papaya (SIAP, 2018), forman parte de la distribución natural de la especie.

Con la finalidad de obtener una muestra aleatoria de cada una de las parcelas muestreadas, se realizó un transecto en “W”. Este método es usado ampliamente en monitoreo de OGMs (Lübeck, 2002), ya que este tipo de transectos pueden cubrir una mayor heterogeneidad de la muestra (Wheater et al., 2011). En cada parcela se colectó una

hoja de 15 individuos que fueron colocadas en bolsas con sílica para su preservación. Posteriormente fueron integradas en el análisis muestras de cultivos de Guerrero, Jalisco, Campeche y Colima, que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, UNAM.

Las muestras de traspatio fueron colectadas en las mismas regiones donde se colectaron las muestras de cultivos, siendo Oaxaca, Veracruz, Yucatán, Guerrero y Tabasco, los estados en los que se obtuvieron dichas muestras. Se tomaron muestras de todos los organismos presentes en cada uno de los traspacios, y de igual manera fueron colocadas en bolsas con sílica para su preservación. Adicionalmente, se integraron muestras de traspacios de Quintana Roo y Yucatán proporcionadas por la Dra. Chávez-Pesqueira de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

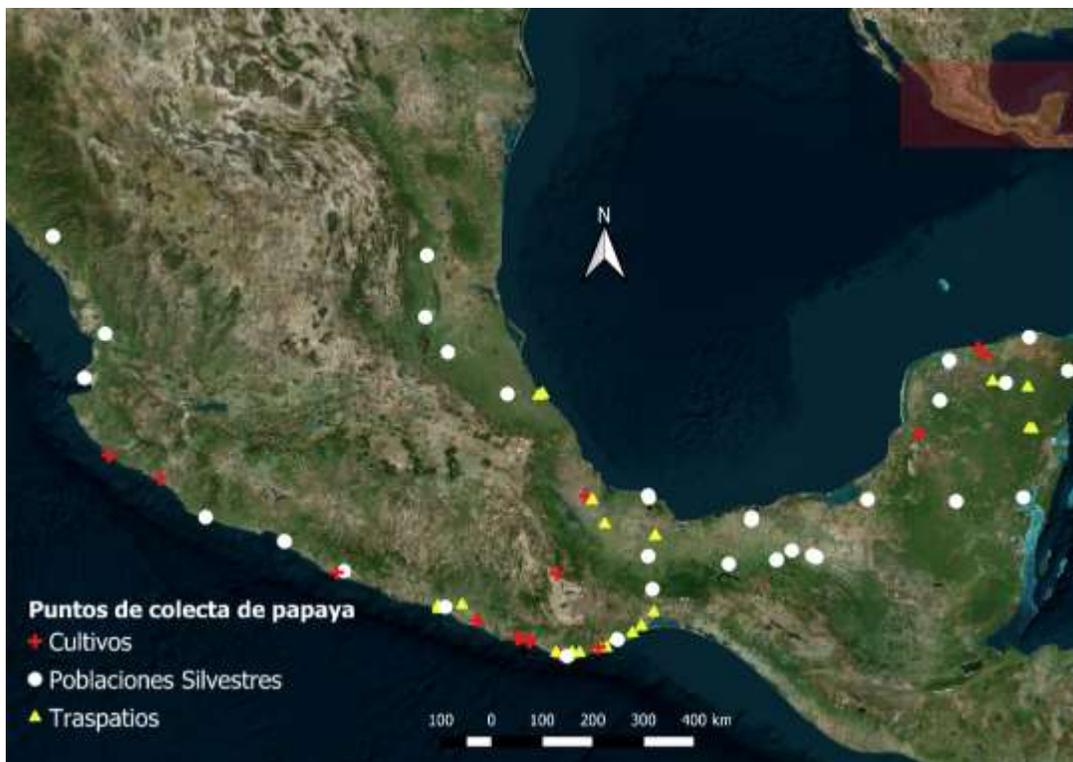


Figura 8. Puntos de colecta de las muestras utilizadas en el monitoreo de transgenes en *Carica papaya*.

Las cruces rojas representan los cultivos, los círculos blancos las poblaciones silvestres y los triángulos las muestras de traspatio. Las coordenadas geográficas de todas las colectas y las variedades colectadas por

localidad se encuentran en el Anexo 1.

1.3 Muestras de papaya de venta comercial

Además del tejido colectado en los cultivos y poblaciones silvestres, también se colectaron muestras de papaya en diferentes establecimientos comerciales, como mercados tradicionales y cadenas comerciales de distintas partes del país. Con la finalidad de abarcar un mayor número de muestras de distintos comercios provenientes de diferentes regiones del país, se realizó un programa de difusión para la obtención de semillas. Mediante carteles ubicados en el Instituto de Ecología y el Instituto de Biología de la UNAM (Figura 9), así como también en redes sociales, se invitó a la comunidad estudiantil a participar en dicha colecta. En el contenido de los carteles estaban presentes los pasos para el correcto procesamiento y etiquetado de las muestras, así como también los puntos estratégicos de recepción de semillas. El programa inició el 25 de septiembre del 2016 y finalizó el 10 de marzo del 2018, obteniendo un total de 240 muestras.

Las semillas colectadas se germinaron en el Jardín Botánico Faustino Miranda, UNAM, mediante el protocolo establecido por Nishina y colaboradores (2004), para la posterior extracción de DNA.



Figura 9. Carteles de difusión para la colecta de semillas de venta comercial

2 Extracción de DNA

Con el fin de contar con material genético para la detección de transgenes, se realizó la extracción de DNA de cada una de las muestras de papaya colectadas. Para las muestras de tejido foliar, la extracción se realizó siguiendo el protocolo CTAB modificado propuesto por (Doyle & Doyle, 1987). En cuanto a las muestras obtenidas mediante el programa de difusión, se procedió a la germinación de las semillas con el fin de obtener tejido foliar. Sin embargo, debido a la baja tasa de germinación, se optó por realizar la extracción de DNA directamente de las muestras de semillas. Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo de Nageswara-Rao y colaboradores (2013).

Tabla 5. Muestras obtenidas en el programa de difusión de colecta de semillas de papaya

Estado	N
Ciudad de México	189
Morelos	10
Estado de México	10
Chiapas	5
Guerrero	6
Oaxaca	6
Veracruz	3
Michoacán	3
Puebla	3
Tabasco	3
Sinaloa	2
Quintana Roo	1
Baja California	1

Previo a los protocolos de extracción, tanto las muestras de tejido foliar como las de semilla, fueron colocadas en nitrógeno y posteriormente pulverizadas en el TissueLyserII® (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) a una frecuencia de 40 hz durante 48 segundos. La

integridad del DNA se evaluó mediante geles de electroforesis al 1%, y su concentración se cuantificó por fluorimetría utilizando el Qubit 3.0® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

3 Pools de DNA

Los pools de DNA son una estrategia utilizada cuando se trata de detectar genes en grandes cantidades de muestras, pues al integrar material de distintos individuos en una misma muestra, permite disminuir el número de reacciones de PCR necesarias la detección. Por esto, se ha utilizado ampliamente en los monitoreos de transgenes en distintas especies (Montesinos-López, Osva Montesinos-López et al., 2011).

Por esto, en el presente trabajo se estandarizó la técnica de pools de DNA de muestras de papaya para la detección de transgenes. Cada pool fue conformado por 1 μ l de DNA proveniente de 5 individuos distintos, con un volumen total de 5 μ l por pool de DNA. A pesar de que el número de muestras en pools de DNA puede ser mayor a 200 individuos (Montesinos-López et al., 2012) en este trabajo se emplearon únicamente 5 muestras por pool, ya que en el supuesto de encontrar un pool de DNA positivo para el transgén, el siguiente paso es realizar una segunda PCR de los individuos de manera independiente para determinar que individuo o individuos dentro del pool de ADN son los portador del transgén.

A excepción de las semillas, los pools de DNA fueron formados con individuos pertenecientes de la misma población. Es importante mencionar que antes de realizar los pools, cada muestra de DNA se diluyó a una concentración de 10 ng/ μ l con la finalidad de que las muestras en los pools fueran homogéneas. La integridad del DNA se evaluó mediante geles de electroforesis al 1%, y su concentración se cuantificó por fluorimetría utilizando el Qubit 3.0® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

4 Elección de cebadores para detección de transgenes

Con el fin de realizar la detección de los posibles eventos transgénicos realizados en papaya en México, se procedió a la selección de cebadores específicos para tales eventos. Para esto, se generó una matriz con el programa JRC GMO MATRIX de la Comisión Europea (European Commission, 2014). Este programa realiza múltiples comparaciones *in silico* de secuencias de DNA de diferentes organismos genéticamente modificados que se encuentran registrados en su base de datos, y con base en los resultados, el programa propone diferentes protocolos para su detección (Angers-Loustau et al., 2014). Esta herramienta, al realizar múltiples comparaciones entre secuencias, puede ser utilizada para determinar qué regiones son similares entre las distintas líneas de papaya transgénica, y de esta manera tener la capacidad de detectar distintas transformaciones empleando un menor número de protocolos y cebadores. Es importante mencionar que todos los protocolos que propone el programa JRC GMO MATRIX han sido validados de acuerdo con la norma internacional ISO 5725 (Organización internacional para la Estandarización, por sus siglas en inglés) y el protocolo IUPAC (Unión de Química Pura y Aplicada, por sus siglas en inglés) (Petrillo et al., 2015)

Con base en lo anterior se eligieron los cebadores que amplifican las regiones reguladoras P35S (protocolo QL-ELE-00-001) (European Commission, 2010a) y Tnos (protocolo QL-ELE-00-006) (European Commission, 2010b) propuestos por la Comisión Europea (Tabla 6). Esto debido a que tienen la capacidad de detectar todas las líneas de papaya transgénica que han sido registradas en la base de datos de la Comisión Europea, tales como el evento 55-1, Huanong No.1, X17-2, 16-0-1 y 18-2-4.

Además, se eligieron cebadores para detectar el gen específico de la cubierta protéica del PRSV introducido particularmente en el evento 55-1 (protocolo QL-CON-00-012) (European Commission, 2013), con la finalidad de identificar dicho evento en el caso de que previamente salieran positivos el P35S y Tnos en alguna de las muestras analizadas.

Aunado a lo anterior y como parte del protocolo de monitoreo, se seleccionaron los cebadores propuestos por Wei y colaboradores (2013) para amplificar el gen de la quimopapaina, (CHY) (Tabla 6) el cual es un gen endógeno de la papaya que es utilizado para la validación de las muestras de DNA de papaya.

Tabla 6. Cebadores empelados para la detección de papaya transgénica

Blanco	Secuencia	Pares de bases	Referencia
P35S	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	195 pb	European Commission, 2010a
Tnos	5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3' 5'-TTATCCTAGTTTGC GCGCTA-3'	180 pb	European Commission, 2010b
<i>PRSV-CP</i>	5'-CACGTAAGGGATGACGCA CAA-3' 5'-TCATTCTTGGACTGACGACGT-3'	220pb	European Commission, 2013
<i>CHY</i>	5'-ATCTACAATCTTGCTAACCCCTA-3' 5'- AGTCATCTTGAGAATAACCCAC3'	282pb	Wei et al, 2013

5 Detección de transgenes por PCR punto final

La detección de transgenes en las muestras de papaya se realizó mediante PCR punto final. Como control positivo en las reacciones de PCR se utilizó DNA de papaya transgénica evento 55-1 (100 copias/ μ l) proveniente de Eurofins Scientific (Luxemburgo). Como se mencionó anteriormente, se utilizaron dos cebadores para detectar regiones reguladoras (P35S y Tnos), y un cebador más para detectar la construcción específica del *PRSV-CP*, así como también cebadores para amplificar el gen de la quimopapaina (*CHY*, por sus siglas en ingles). En concreto, se utilizaron un total de cuatro juegos de cebadores para la detección de transgenes en papaya.

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystemtm 2720 (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos) para 96 muestras. Cada reacción fue compuesta por: buffer 1x, 1.5 mM de MgCl₂, 0.6 mM de dNTPs, 1 μ M de cebador (F y R), 1U de taq polimerasa (Promega Gotaq® Flexi DNA) y 5 μ l de DNA a una concentración de 5-10 ng/ μ l. El volumen final de cada reaccion fue de 20

μ l. Las condiciones de reacción para los cebadores P35S y Tnos fueron: 94°C - 3 min (desnaturalización inicial) 35 ciclos de 94°C - 30 s (desnaturalización), 55°C por 40 s (alineamiento) y 72°C por 40 s (extensión), por último, una extensión final de 72°C por 10 min. Mientras que las condiciones de reacción para los cebadores *PRSV-CP* y *CHY* fueron: 95°C por 10 min (desnaturalización inicial) 35 ciclos de 95°C durante 30 s (desnaturalización), 60°C durante 30 s (alineamiento), 72°C durante 30 s (extensión) y una extensión final de 72°C durante 3 min.

6 Estandarización del protocolo de detección en pools de DNA

Con el fin de realizar la detección de transgenes en pools de DNA de muestras de papaya se llevaron a cabo distintos procesos para su estandarización. En primer lugar, con el objetivo de determinar el umbral de detección del control positivo (evento 55-1, 100 copias/ μ l) se realizaron factores de dilución 1:10, 1:20 y 1:100. Además, se realizaron reacciones de PCR individuales a un total de 20 individuos, con el objetivo de tener material libre de transgenes para realizar la estandarización.

Para el paso de la estandarización se realizaron pools utilizando 1 μ l de DNA de cuatro individuos negativos para todos los transgenes analizados individualmente y 1 μ l de DNA del control positivo diluido, teniendo un volumen final de 5 μ l por pool de DNA. Lo anterior se hizo para cada uno de los factores de diluciones del control positivo antes mencionados: 1:10, 1:20 y 1:100. Con esto, se logró probar el nivel de detección del control positivo en cada dilución y para las cuatro construcciones buscadas (*P35S*, *Tnos*, *PRSV-CP* y *CHY*).

Posteriormente, los pools de DNA con las distintas diluciones del control positivo fueron utilizados para la detección de transgenes mediante PCR en un volumen final de reacción de 25 μ l y con las condiciones de reacción antes mencionadas para cada uno de los cebadores. Los productos de PCR amplificados se observaron en geles de agarosa al 1,7%, con buffer TBE 1X y teñidos con GelRed® (Biotium, Fermont California) en una cámara de electroforesis Easy Cast™ B1 (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, Estados

Unidos). La visualización de los amplicones en geles de agarosa se realizó en un fotodocumentador MultiDoc-It™ (UVP, California Estados Unidos).

Es importante destacar que, como parte de la estandarización del protocolo de detección de los pools de DNA, se mandaron a secuenciar todos los productos de PCR obtenidos con los diferentes cebadores (P35S, Tnos, *PRSV-CP* y *CHY*). Esto con el objetivo de confirmar que se estuvieran amplificando los genes buscados. La secuenciación Sanger se realizó en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM. Una vez establecido lo anterior y determinado el umbral de detección de cada uno de los cebadores, se procedió a la detección de transgenes de todas las muestras en pools de DNA.

7 Análisis de datos

7.1 Estimación del tamaño óptimo de muestra para el monitoreo de papaya genéticamente modificada

La determinación del número de muestras adecuado para este análisis se hizo mediante la ecuación establecida por Montesinos-López y colaboradores (2012). Esta ecuación basada en el Intervalo de Confianza (IC) para realizar inferencias, constituye un método analítico para determinar el tamaño de muestra (pools de DNA) requeridos bajo el marco del modelo que permite estimar la proporción de plantas transgénicas y garantizar un IC reducido, tomando además en consideración la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de laboratorio.

Para esta ecuación se requieren distintos parámetros: n : tamaño del pool de DNA, refiriéndose al número de individuos introducidos en cada pool, Se : sensibilidad de las pruebas de laboratorio, es decir, la probabilidad de que la prueba de laboratorio resulte positiva cuando la planta es transgénica, Sp : especificidad de las pruebas de laboratorio, refiriéndose a la probabilidad de que la prueba de laboratorio resulte negativa cuando la

planta no es transgénica, p : proporción de plantas transgénicas en la población basándose en estudios previos, ω : error absoluto o amplitud del intervalo de confianza deseado, γ representa el grado deseado de seguridad (probabilidad requerida) para lograr una amplitud del IC que no supera al valor deseado (ω). La ecuación completa se representa como:

$$g_m = \left(\frac{Z_{1-\alpha/2}^2 p(1-p)}{\omega^2} \left[1 + \frac{\sqrt{\omega|-2p|Z_\gamma}}{Z_{1-\alpha/2} p(1-p)} \right]^2 \right) \times \left(\frac{(Se - P^*)^{\left(\frac{2}{k}-2\right)} P^*(1-P^*)}{p(1-p)k^2(Se + Sp - 1)^{\frac{2}{k}}} \right)$$

ω = valor esperado del intervalo de confianza o error absoluto

p = prevalencia del transgén en la población

γ = aseguramiento

k = tamaño del pool de DNA

Se = Sensibilidad de las pruebas de laboratorio

Sp = Especificidad de las pruebas de laboratorio

g_m = número de pools de ADN requeridos

7.2 Determinación de tamaño de muestra óptimo en cultivos y plantas silvestres

Debido al distinto origen de las muestras que componen nuestro estudio se decidió realizar la determinación de tamaño de muestra para cultivos y plantas silvestres de manera independiente. En el caso de cultivos; se integraron las muestras colectadas en cultivos, las de semillas de venta comercial y las muestras de traspatio. Para el análisis de plantas silvestres, únicamente se incluyeron las muestras proporcionadas por el Laboratorio de Genética Ecológica del Instituto de Ecología de la UNAM.

Cultivos

Para lograr la determinación del número de muestras requeridas para el análisis fue necesario establecer valores de prevalencia (p) en la ecuación basados en literatura disponible. Dado que no existe un monitoreo de papaya transgénica en el mundo que pudiera funcionar como referencia directa, se utilizaron los valores de prevalencia reportados en maíz por Dyer y colaboradores (2009) (= 1.8).

Plantas silvestres

Al igual que en el caso de cultivos, no existe literatura disponible en la que se evalúen poblaciones de papaya silvestre. Por esto, y dado las condiciones biológicas específicas de las poblaciones silvestres (Chávez-Pesqueira et al., 2014), se decidió utilizar valores de prevalencia más bajos que los establecidos en cultivos ($\alpha = 0.005$). Es importante mencionar que, tanto en papaya cultivada como en silvestre, se utilizaron valores de amplitud deseada o error absoluto (β) de 0.030 con un aseguramiento (γ) del 90%, esto significa que el noventa por ciento de las veces nuestros valores van a caer dentro de la amplitud deseada del IC ($= 0.030$). En el caso de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de laboratorio, a pesar de que en los cebadores seleccionados ambos parámetros se reportan del 100%, para ambos análisis se establecieron del 98%, considerando el posible error humano. Finalmente, el número de muestras por pools de DNA (n) para ambos tipos de muestras fue de 5.

7.3 Estimación del tamaño óptimo de muestra para el monitoreo de papaya GM considerando otros escenarios

Aunque no existen estudios en los que se evalúe la presencia de transgenes bajo condiciones naturales en poblaciones de papaya, a partir de otros modelos es posible conocer las consecuencias de la coexistencia de poblaciones silvestres y cultivos genéticamente modificados de una especie. Por esto, como una aproximación analítica, utilizando la información disponible de flujo de transgenes en otras especies, planteamos distintos escenarios que nos brindan un panorama de cómo tendrían que realizarse los esfuerzos de muestreo bajo esas características específicas. Bajo este esquema, se utilizó la misma fórmula empleada anteriormente para la determinación de número de pools bajo distintos escenarios, y se usaron como referencia estudios de caso que fueron desarrollados en condiciones ambientales donde coexisten cultivos convencionales y comerciales de plantas transgénicas.

En el análisis de cultivos se utilizaron como valores máximos de prevalencia los reportados por Manshardt y colaboradores (2007) en cultivos de papaya de Hawái. A partir

de estas prevalencias, se establecieron gradiente de valores hipotéticos de prevalencia de 28%, 18% y 10%.

Para el caso de las poblaciones silvestres se plantearon tres escenarios: 1) basado en los valores del estudio de poblaciones ferales de papaya en Hawái (Manshardt et al., 2007), 2) utilizando los valores de prevalencia del caso de presencia de transgenes en algodón silvestre en México (Wegier et al., 2011) y 3) utilizando los valores de flujo de transgenes en poblaciones de arroz silvestre en China (Wang et al., 2006). Cabe mencionar que los últimos dos estudios fueron realizados en lo que es considerado parte del centro de origen de la especie.

Finalmente, los parámetros restantes de la ecuación se mantuvieron constantes para todos los escenarios; tamaño del pool de DNA = 5, Intervalo de Confianza (IC = 95%), especificidad y sensibilidad de las pruebas de laboratorio ($\gamma = 98\%$), error absoluto (= 0.030) y nivel de aseguramiento ($\alpha = 10\%$).

Resultados

1 Material biológico

Como resultado de la colecta de muestras de cultivos y traspatios, así como del programa de difusión de colecta de semillas, se obtuvieron un total de 935 individuos. De estos, 240 pertenecientes a cultivos, 135 individuos de traspatio, 320 individuos silvestres y 240 muestras de semillas de venta comercial. Las muestras de cultivos corresponden a colectas realizadas en Oaxaca, Veracruz, Yucatán, Guerrero, Jalisco, Campeche y Colima (Fig. 9 panel a)). Las muestras de traspatio son provenientes de Oaxaca, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, Guerrero y Yucatán (Fig. 9 panel b)). Las muestras de poblaciones silvestres corresponden a 24 poblaciones distribuidas a lo largo de Sinaloa, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Campeche y Quintana Roo (Fig. 10 panel c)). Mientras que las muestras de semillas de venta comercial se obtuvieron de la Ciudad de México, Estado de México, Morelos,

Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Tabasco, Sinaloa, Quintana Roo, Baja California (Fig. 9 panel d).

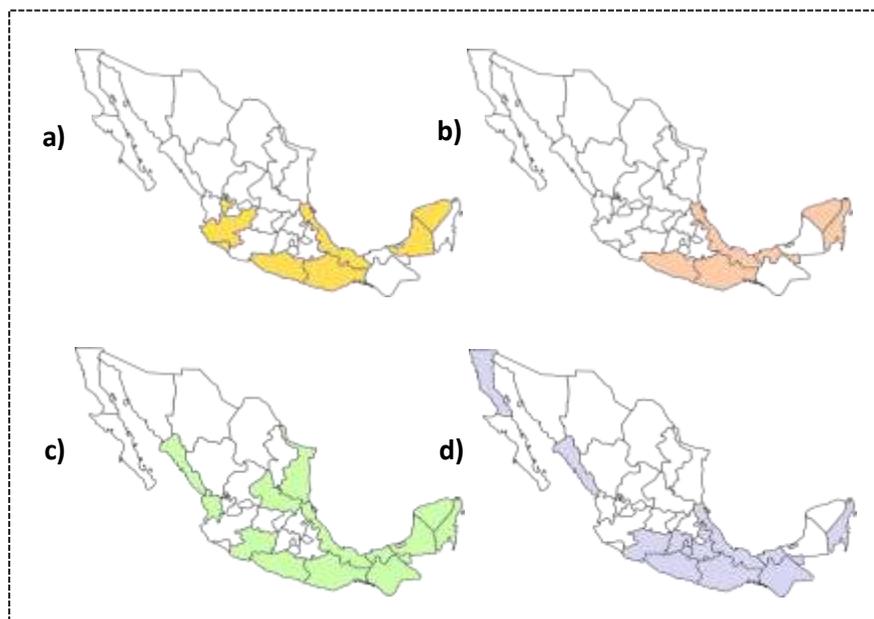


Figura 10. Estados de la república mexicana donde se obtuvieron los diferentes tipos de muestras de *Carica papaya*: a) muestras de cultivos en color amarillo, b) muestras de traspatio en color rosa, c) muestras de poblaciones silvestres en color verde, d) muestras de semillas de venta comercial en color azul.

Todas las muestras colectadas en cultivos corresponden a individuos de la variedad Maradol, a excepción de 39 muestras de Yucatán, correspondientes a individuos de la variedad Tainung. Por otro lado, de las muestras de traspatios colectadas, además de los individuos de las variedades comerciales, se colectaron individuos de diferentes variedades nativas mexicanas, tales como Amarilla, Amameyada y Criolla, principalmente de Oaxaca y Veracruz (Anexo 3). De igual manera, en las muestras de semillas de venta comercial, se obtuvieron variedades como Amarilla, Criolla y Maradol.

2 Extracción y pools de DNA

Con el objetivo de disminuir el número de reacciones de PCR necesarias para el análisis de las muestras de papaya del presente estudio, se realizaron pools de DNA de las muestras individuales. Del total de 935 muestras de DNA extraídas de manera individual, se

realizaron 187 pools de DNA conformados por 5 muestras distintas. En total, se analizaron 64 pools de individuos silvestres, 48 de muestras de cultivos, 48 de individuos de semillas de venta comercial, y 27 de individuos de traspatio.

3 Estandarización del protocolo de detección en pools de DNA

3.1 Umbral de detección del control positivo de papaya transgénica

Con el fin de conocer la viabilidad de la técnica de detección de transgenes en pools de DNA de papaya, se realizaron distintas estrategias de estandarización. En primer lugar, con el objetivo de que todos los pools tuvieran concentraciones homogéneas, todas las muestras utilizadas se estandarizaron en su concentración. Finalmente, la concentración de los 189 pools de DNA se encontró en un rango de concentración de 10 - 14 μl .

Adicionalmente, con el objetivo de determinar que todos los pools realizados efectivamente contenían DNA de papaya, se realizó la validación de la presencia del gen endógeno de la Quimopapaina (CHY) mediante PCR punto final. Todos los pools de DNA analizados fueron positivos para la presencia del gen CHY, tal como se puede observar en la Figura 11.

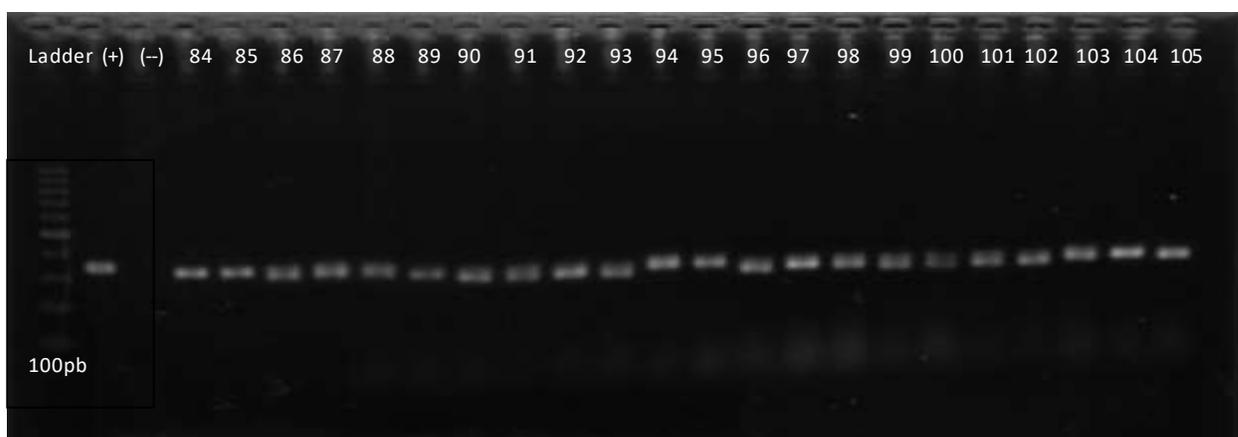


Figura 11. Amplicones del gen endógeno (CHY) en los pools de DNA. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2: control positivo del gen de la quimopapaina (282pb), Carril 3: control negativo, Carril 4-25: pools de DNA analizados (84-105).

Con el objetivo de determinar el umbral de detección del control positivo se realizaron factores de dilución a 1:10, 1:20 y 1:100, lo que permitió determinar este umbral para cada uno de los cebadores utilizados en la detección. En la Figura 12, se puede observar que tanto el P35S como el gen endógeno (*CHY*) amplificaron en todas las diluciones antes establecidas, teniendo un umbral de detección en una dilución de hasta 1:100 del control positivo, mientras que en los marcadores Tnos y *PRSV-CP* el umbral de detección fue de una dilución 1:20.

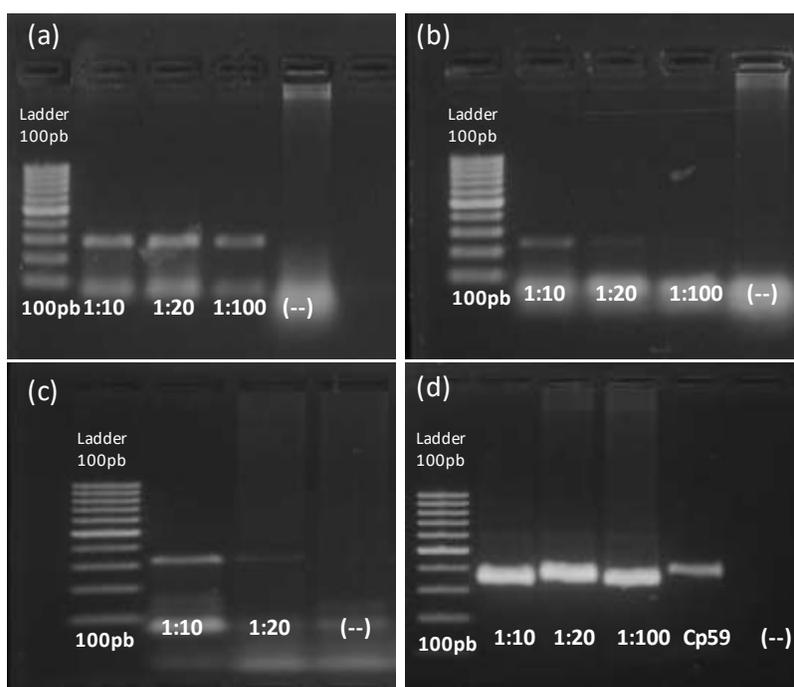


Figura 12. Amplificación de los cebadores en los pools de DNA a distintas diluciones del control positivo. En cada panel, carril 1: marcador de pares de bases 100 pb, carril 2-4: pools de DNA, último carril: control negativo. Panel a): P35s (190pb), panel b) Tnos (180pb), panel c) PRSV-CP (220 pb) y panel d) CHY (282 pb).

4 Secuenciación de productos de PCR

Como parte final de la estandarización del método de detección de papaya transgénica en pools de DNA, se secuenciaron los productos de PCR obtenidos del P35S, Tnos, *PRSV-CP* y *CHY*. La secuenciación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó en el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esta herramienta busca regiones de similitud entre secuencias biológicas que se encuentran en la base de datos del NCBI (Johnson et al., 2008; NCBI, 2018), lo que permite obtener valores de identidad (similitud) de las secuencia de interés con las depositadas en la base de datos. De la información arrojada por el BLAST, se tomaron los parámetros de “identidad” y “bit score” para determinar la identidad de nuestras secuencias. La “identidad” se refiere al porcentaje en el que dos secuencias presentan los mismos residuos en la misma posición en un alineamiento, mientras que el “bit score”, se refiere a una puntuación normalizada expresado en bits, la cual es una versión escalada de la puntuación de alineación sin procesar que es independiente de la tamaño del espacio de búsqueda. (Johnson et al., 2008; NCBI, 2018).

A partir del análisis de BLAST de las secuencias de los genes buscados, se pudo corroborar que todos los amplicones encontrados correspondían a los genes que se buscaba amplificar. Para la secuencia del P35S hubo una similitud de la región con la papaya transgénica evento 55-1 (identidad del 99% bit score= 226) y con la línea transgénica *PRSV-YK* (identidad del 98% bit score= 226). Por otro lado, las secuencias obtenidas del *PRSV-CP*, presentaron una similitud con la papaya transgénica evento 55-1 (identidad 100% bit score= 296), así como también con la línea *PRSV-YK* (identidad del 98 % bit score= 152) y con la línea transgénica 16-0-1 (identidad del 95% y bit score= 69.4). En cuanto al gen *Tnos*, el análisis de la secuencia nos arrojó una identidad del 100% con el evento 55-1 de papaya transgénica (bit score= 195). Por último, la secuencia obtenida del gen endógeno de la papaya (*CHY*) presento una similitud del 99% con un bit score= 246.

5 Detección de transgenes en pools de DNA

Una vez que se estandarizó el protocolo de detección en pools de DNA, se procedió al análisis de las muestras. La detección de transgenes se realizó en los 189 pools de DNA conformados por muestras de individuos silvestres, de cultivos, de traspatio y de venta

comercial. Se emplearon cebadores para amplificar las regiones P35S, *PRSV-CP* y Tnos, que previamente se habían probado en la estandarización del protocolo.

De las muestras en pools de DNA que fueron analizadas, ninguna amplificó para alguna de las regiones del transgen, como se muestra de manera simplificada en la Tabla 7, y como se aprecia en los geles de agarosa de los amplicones obtenidos en las reacciones de PCR (Fig. 13-15). Aunado a lo anterior, con el objetivo de realizar una doble corroboración, se escogieron muestras individuales de cada pool de DNA y se analizó la región P35S. De igual manera, en esta segunda corroboración no se encontró ninguna muestra positiva.

Tabla 7. Pools de DNA analizados y número de muestras positivas para los tres *genes* analizados

Tipo de muestra	N pools	Individuos	P35S (+)	Tnos (+)	PRSV-CP (+)
Silvestres	64	320	0	0	0
Cultivos	48	240	0	0	0
Traspatio	27	135	0	0	0
Venta comercial	48	240	0	0	0

N pools: número total de pools analizados por tipo de muestra. En todas las columnas, (+)= muestras positivas.



Figura 13. Gel de agarosa al 2% de los amplicones del gen P35S en pools de DNA. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: control positivo del gen P35S (195pb) de papaya transgénica evento 55-1. Carril 3: control negativo. Carriles 4-25: muestras en pools de DNA analizadas (116-137).

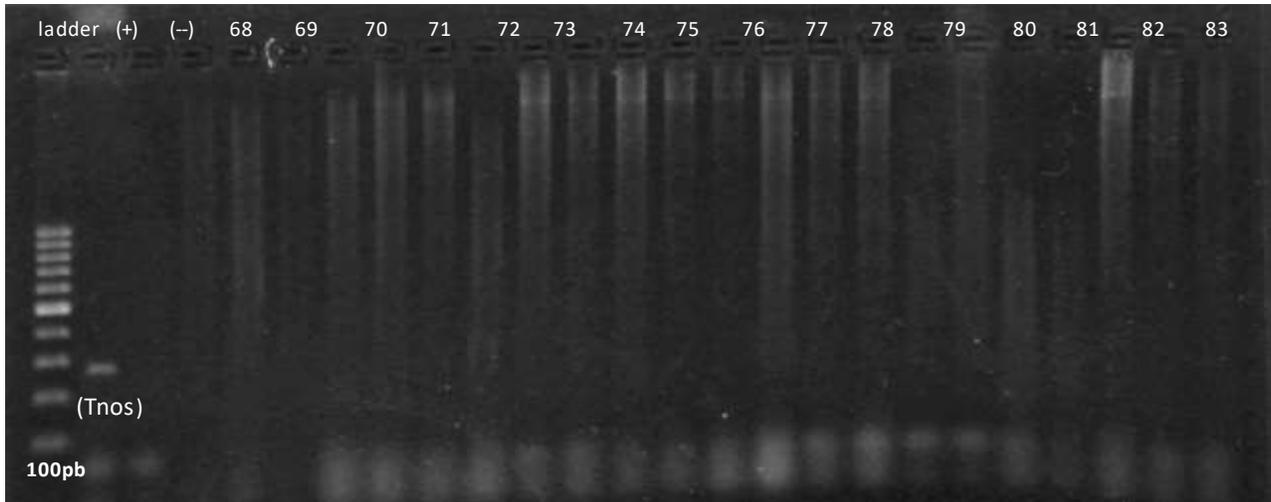


Figura 14. Gel de agarosa al 2% con los amplicones del gen Tnos en pools de DNA. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: control positivo del gen de *t-nos*(180pb) de papaya transgénica evento 55-1. Carril 3: control negativo. Carriles 4-25: muestras analizadas (131-152)

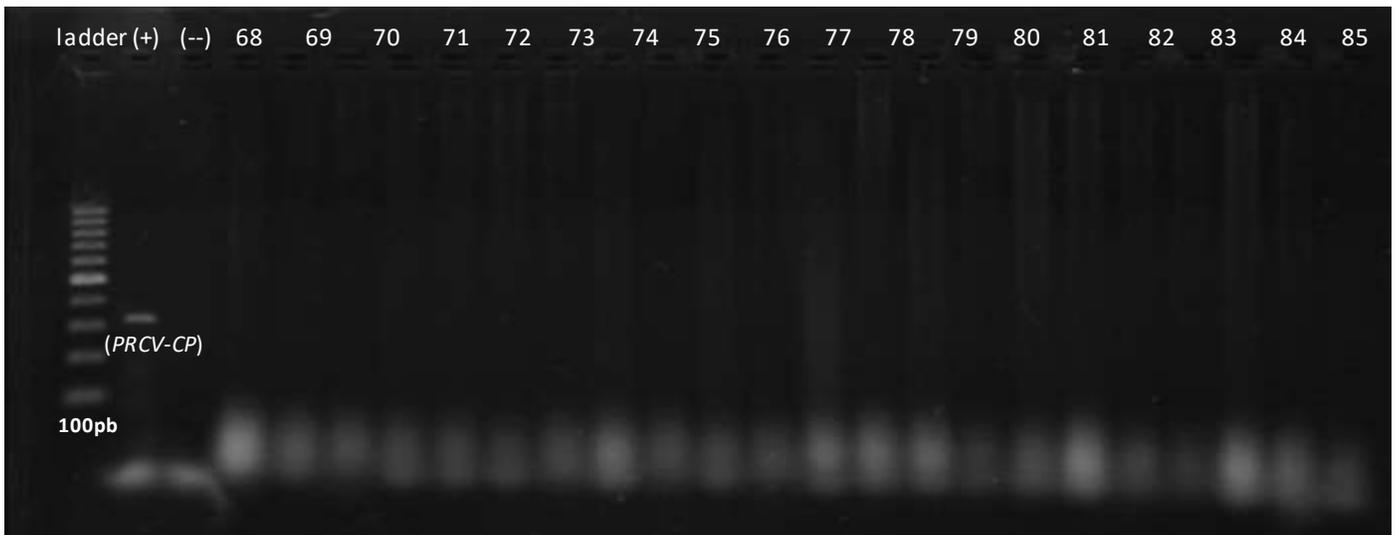


Figura 15. Gel de agarosa al 2% con los amplicones del gen *PRSV-CP* en pools de DNA Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: control positivo del gen del *PRSV-CP*(220 pb) de papaya transgénica evento 55-1. Carril 3: control negativo. Carriles 4-25: muestras analizadas (131-152).

6 Estimación del tamaño óptimo de muestra para el monitoreo de papaya genéticamente modificada

Con el objetivo de determinar el tamaño óptimo de muestreo para el monitoreo de papaya transgénica, se realizó un análisis bajo distintos escenarios utilizando la ecuación propuesta por Montesinos-López y colaboradores (2012). Como resultado de este análisis, se encontró que, para el monitoreo de papaya transgénica en cultivos, bajo un esquema en donde la prevalencia de transgén es de 1.8%, sería necesario analizar 119 pools de DNA integrados por 5 individuos distintos. Esto se encuentra dentro del rango de pools de DNA de muestras de cultivos analizados en este proyecto, como se muestra en la Tabla 8. Es importante destacar que al realizar la detección de transgenes con 119 pools se tendría una amplitud del IC de 0.030, con un nivel de aseguramiento del 90%.

Por otro lado, en el caso de las poblaciones silvestres, si dichas poblaciones presentaran una prevalencia del transgen similar a 0.5%, se requeriría analizar 84 pools de DNA igualmente compuestos por 5 individuos, lo cual se aproxima al número de pools de poblaciones silvestres analizados, como se muestra en la Tabla 8.

7 Estimación del tamaño óptimo de muestra para el monitoreo de papaya GM - otros escenarios

7.1 Propuesta de escenarios hipotéticos en cultivos

Empleando la fórmula utilizada previamente en la determinación del número de pools de DNA para el monitoreo de plantas transgénicas, se establecieron diferentes escenarios con distintos valores de prevalencia del transgén, con la finalidad de ver los distintos posibles resultados (número de pools requeridos) y así tener un panorama más amplio de cómo se tendría que realizar un monitoreo de papaya transgénica si se tuvieran escenarios en donde

la prevalencia del transgén fuera mayor debido a la coexistencia de cultivos transgénicos y no transgénicos en el país.

En el caso de las muestras de cultivos de papaya, se tomaron como referencia los valores de prevalencia de estudios que se han hecho para evaluar el flujo de transgenes en cultivos experimentales de papaya transgénicos y no transgénicos, en Hawái por Manshardt y colaboradores (2007) ($p=38\%$), así como también valores hipotéticos en donde la prevalencia fuese del 28 %, 18%, 8%, 2.5% y 1.5% en la población.

Como resultado se obtuvo que el número de pools necesarios bajo un escenario donde la coexistencia de plantas de papaya transgénica y no transgénica permiten el flujo de transgenes con una prevalencia del 38%, sería necesario analizar 3302 pools de DNA compuestos de 5 individuos cada uno. Mientras que en casos donde la prevalencia fuese de 28 %, 18% y 8% se requerirían “1713”, “887”, “364”, 144 y 109 pools de DNA respectivamente.

7.2 Propuesta de escenarios hipotéticos en poblaciones silvestres

Por otro lado, en las poblaciones silvestres, se tomaron como valores de prevalencia los establecidos por el Manshardt y colaboradores (2016) en poblaciones ferales de papaya de Hawái. Adicionalmente, como un primer acercamiento a las posibles condiciones de poblaciones silvestres en presencia de transgenes, se tomaron los valores de estudios realizados en otras especies. Como ejemplo de flujo de genes de cultivos a parientes silvestres en su centro de origen, se tomaron los valores reportados por Wegier y colaboradores (2011) de poblaciones de algodón silvestre en México. Además, se tomaron también los valores arrojados por el estudio de Wang y colaboradores (2006) de arroz silvestre en China (11%).

Como resultado se obtuvo que, en el caso de la coexistencia de poblaciones silvestres con cultivos de papaya transgénica donde la prevalencia del transgén es similar a las reportadas en poblaciones ferales de Hawái ($p =16\%$), sería necesario analizar 765 pools de DNA. En un contexto similar se encuentra el algodón en México, en el que los resultados sugieren analizar 1329 pools de DNA igualmente compuestos por 5 individuos. Tomando

en cuenta el contexto del arroz silvestre, en donde se reportó una prevalencia del 11%, sería necesario el análisis de 501 pools de DNA.

Discusión

En México la papaya es una planta de gran importancia económica, pues el país es considerado uno de los principales productores de papaya en el mundo y el principal país exportador de papaya a nivel mundial (Secretaría de Economía, 2018; SIAP, 2018). Además, la presencia de poblaciones silvestres y su posible centro de origen en el país hace necesaria la conservación de la especie en su ambiente natural, no solo como reservorio de genes para futuros mejoramientos en papaya, sino por que aunado a lo anterior es considerada una planta con un papel importante en la dinámica de los ecosistemas de selva alta, media y baja (Chávez-Pesqueira et al., 2014; Fuentes & Santamaría, 2014). Para el correcto establecimiento de estrategias de conservación es necesario conocer más a fondo el estado actual de las poblaciones silvestres; es decir tener un mayor conocimiento sobre su diversidad genética, su distribución natural entre otros aspectos (Chávez-Pesqueira et al 2014).

Actualmente, la introducción de cultivos genéticamente modificados de papaya en otros países ha provocado eventos de flujo de genes entre los cultivos y poblaciones ferales de la especie. Esta presencia de transgenes se ha encontrado incluso en países como Tailandia donde la comercialización y producción de papaya no está permitida, provocado posiblemente por eventos de transformación no autorizados que han tenido contacto con otros cultivos y/o poblaciones ferales. Ante este panorama, se hace necesario realizar protocolos de monitoreo de detección de transgenes en papaya en su posible centro de origen, con un enfoque donde se integre el complejo de especie y en el cual se tomen en cuenta las interacciones entre poblaciones silvestres, cultivos, y poblaciones ferales ya que actualmente existen evidencias del flujo de genes entre estos (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016).

1 Protocolo de detección de papaya GM en su centro de origen

Para el monitoreo de papaya transgénica en México se realizó la estandarización del protocolo de detección de papaya GM utilizando como método de detección elementos específicos comúnmente encontrados en la construcción de OGMs. El CaMV 35S (P35S) y el terminador del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos) fueron elegidos, ya que son empleados en los laboratorios de control de OGMs como paso inicial en el análisis de detección. Esto se debe a que el 90 % de las plantas transgénicas que han sido liberadas para cultivo presentan el P35S y 70 % de ellas presenta el Tnos (CERA, 2015). En el caso de papaya GM se han registrado un gran número de eventos empleando el P35s y Tnos, por lo que son marcadores que pueden utilizarse para la detección de un gran número de eventos de transformación.

Aunado a lo anterior, se debe tener en consideración que actualmente existen eventos de OGMs que presentan promotores y terminadores diferentes a los comúnmente usados (De Guglielmo & Da Silva, 2016). Estas líneas transgénicas no pueden ser detectadas utilizando el protocolo propuesto en esta investigación. Debido a lo anterior es importante mencionar que en este trabajo no se encontró la presencia de papaya transgénica que estuviese conformada por el P35S y Tnos; como es el caso de todos los eventos que han sido liberados comercialmente en otros países y los que se encuentran registrados en las bases de datos de OGM (European Commission, 2014; ISAAA, 2016).

Siguiendo los protocolos internacionales de detección de OGMS (Rosa et al., 2016; Somma & Querci, 2009), se realizó la detección de eventos específicos. Este es considerado el segundo paso para la detección de OGMs. Una vez que se ha encontrado la presencia de elementos específicos tales como P35S se procede a identificar el evento transgénico. En el monitoreo de papaya realizado, ninguna muestra amplificó para Tnos y P35S. Sin embargo, se procedió a la detección de la cubierta protéica de los eventos específicos 55-1 y 63-1 en todas las muestras como parte de la estandarización del protocolo de detección en papaya.

Estos eventos de transformación específicos se seleccionaron debido a la cercanía regional y económica con el país productor, EUA (Cuevas et al., 2003). Además, todas las solicitudes realizadas para la siembra de papaya GM en México han sido para estos eventos

de transformación (Silva-Rosales et al., 2010). Por otro lado, las bases de datos de OGMs de la Comisión Europea cuentan con protocolos de detección de eventos específicos de otras líneas de papaya transgénicas comercializadas en otros países (European Commission, 2014), por lo que se podría ampliar el monitoreo para analizar otros eventos. Tal es el caso de la línea Huanong. 1 y otros eventos no autorizados de China (ISAAA,2016). Aunque, actualmente no hay registros de importación de papaya proveniente de ese país (SIVAI, 2018). Esto probablemente debido a la corta vida de anaquel que caracteriza el cultivo de papaya, y que a su vez, impide su transporte a largas distancias (Paull, 1993).

A pesar de lo anterior, en México no está autorizado el cultivo de papaya de ningún evento GM (CIBIOGEM, 2018). Esto es una ventaja debido a que con el empleo de marcadores como el P35S y Tnos se puede realizar el monitoreo de diferentes líneas de papaya transgénica. A diferencia de otros países donde hay eventos autorizados y por lo tanto se requieren otros protocolos como la detección de eventos específicos para encontrar eventos no autorizados.

1.1 Umbral de detección de los marcadores empleados en el monitoreo

Como parte de la estandarización del protocolo de detección de papaya, se determinó el umbral de detección de los marcadores empleados para el monitoreo. Esto es importante debido a que, al emplear pools de DNA en el análisis, era necesario determinar si los marcadores elegidos podrían amplificar correctamente en dichos pools. Con esto se pudo determinar que el P35S es un marcador que además de detectar varias líneas transgénicas, es muy sensible a las técnicas de PCR, llegando a amplificar en concentraciones de hasta 1 copia/ del transgén. Incluso Griffiths y colaboradores (2002) han reportan una sensibilidad de estos marcadores de hasta el 0.01%, por lo que puede ser utilizado en el análisis de una gran cantidad de muestras. Esto contrasta con los resultados obtenidos con el marcador Tnos y PRSV-CP, pues su umbral de detección se encontró por debajo de las 5 copias. Sin embargo, Nageswara-Rao y colaboradores (2013) utilizando otros cebadores para detectar el *PRSV-CP* en la línea 55-1, reportaron un umbral de detección de 0.01%, por lo que este cebador puede ser considerado en un futuro para el monitoreo de papaya GM. Otros marcadores como el gen *Gus* se han utilizado exitosamente para en el análisis de flujo de transgenes en papaya, sin embargo, no todas las líneas transgénicas de papaya presentan

este marcador de selección en su construcción, por lo que su uso podría sesgar los resultados en los monitoreos (Azad et al., 2014; Gonsalves et al., 2012; Manshardt et al., 2016, 2007).

1.2 Utilización de pools de DNA como parte del monitoreo de papaya GM

Así mismo, el uso de pools de DNA para la detección de transgenes fue una estrategia que permitió analizar una gran cantidad de muestras, reduciendo los costos y el tiempo invertido. Existen diversos estudios que han reportado el uso de hasta 50 muestras por pool de DNA (Montesinos-López et al., 2012). En el presente estudio se utilizaron únicamente 5 muestras por pool de AND ya que como parte de protocolo de estandarización, se pretendía analizar cada una de las muestras por separado en el caso de que alguno de los pools de DNA resultara positivo para alguno de los marcadores empleados. Sin embargo, sería necesario realizar pruebas de laboratorio para determinar si los marcadores utilizados tienen la capacidad de amplificar con un mayor número de muestras y de esta manera eficientizar el protocolo de monitoreo de papaya GM. Es probable que se pueda aumentar el número de Individuos, ya que trabajos como el de Nageswara-Rao y colaboradores (2013) han empleado exitosamente hasta 45 muestras de semillas para la detección de papaya GM.

2 Tamaño de muestra para el monitoreo de papaya GM

Con el objetivo de determinar un número de muestra robusto que nos permitiera realizar el monitoreo de papaya transgénica, se empleó la ecuación propuesta por Montesinos-López y colaboradores (2012). Esta ecuación determina el tamaño de muestra necesario para estimar la proporción de plantas transgénicas basándose en el Intervalo de Confianza (IC). Se empleó este enfoque debido a que actualmente ha crecido el interés en el diseño de métodos para calcular el tamaño de muestra apropiado para un IC, ya que, al estar basados en este, son relativamente cercanos a los datos y se expresan en la misma escala de medida (Kelley, 2007; Montesinos-López et al., 2012).

Este enfoque para determinar el tamaño de muestra se denomina “Aseguramiento de Precisión en la Estimación de Parámetros (APEP)”, ya que permite

disminuir el ancho IC para aumentar la exactitud del análisis (Kelley, 2007; Kelley & Rausch, 2006; Montesinos-López, Osva Montesinos-López et al., 2011). En el caso de papaya cultivada y silvestre se estableció una reducción del IC del 0.030 con un nivel de aseguramiento que permitiera que el 90% de las veces los datos obtenidos cayeran en el IC ya reducido, y de esta manera tener mayor precisión en la determinación del número de pools de DNA para estimar la proporción de plantas transgénicas.

Se utilizaron los valores de prevalencia del transgén registrados en maíz reportados por Dyer y colaboradores (2009) para la determinación del tamaño de muestra en papaya domesticada, con el cual se determinó que el número adecuado de muestras en el monitoreo de papaya GM era de 119 pools, lo cual es similar al número de muestras analizadas en el monitoreo realizado (123 pools de DNA). Es claro que el contexto tanto biológico e histórico de ambas especies es diferente (Buckler y Stevens 2006 y Chavez-Pesqueira et al 2014). Por un lado, el maíz es un cultivo anual, monoico, principalmente polinizado por el viento y adaptado a una gran diversidad de ambientes, por lo que se encuentra en prácticamente todas las regiones del país. Además, es de gran importancia cultural en México y en donde está presente un intercambio tradicional de semillas, lo que ha resultado en la diversificación de 64 razas de maíz (Buckler & Stevens, 2006; CONABIO, 2011). Por otro lado, la papaya es una especie perenne con una vida útil en cultivos de 3 años (en estado silvestre puede vivir por más de 20 años), es una especie dioica o hermafrodita, polinizada por insectos y viento, y adaptada a regiones tropicales (Chávez-Pesqueira et al., 2014; CONABIO, 2015; Jiménez et al., 2014; Ming & Moore, 2014). Sin embargo, se tomaron estos valores de prevalencia como punto de partida para este análisis, ya que el monitoreo de OGMs de maíz ha sido ampliamente estudiado en México, y además de ser considerado su centro de origen y tener la capacidad de hibridación con sus parientes silvestres (Baltazar et al., 2005; Dyer et al., 2009; Piñeyro-Nelson et al., 2009), al igual que en papaya, su siembra comercial no se encuentra autorizada actualmente (ISAAA, 2016)

Por otro lado, en nuestro país solo se ha realizado un estudio de detección de papaya GM, en el cual, de las 18 muestras analizadas, se reportó 0% de prevalencia del transgén (Huerta-Olguín 2016), por lo que no podía ser utilizado como referencia para este análisis. Sin embargo, es importante mencionar que los resultados obtenidos fueron los mismos que

los obtenidos en este. Otros estudios realizados en Hawái han evaluado el flujo de transgenes en papaya; no obstante, las prevalencias reportadas en estos estudios no fueron integradas en este análisis, ya que fueron llevados a cabo en regiones donde está permitida la siembra de papaya GM, dando como resultado un alto flujo de transgenes (Gonsalves et al., 2012; Manshardt et al., 2016, 2007). Este contraste en las condiciones de cultivo evita que puedan ser integrados a análisis de monitoreo realizados en un contexto donde actualmente no coexisten los cultivos transgénicos con cultivos convencionales de papaya.

En cuanto a las poblaciones silvestres de papaya, siguiendo este enfoque se determinó un total de 84 pools de DNA para realizar el monitoreo. En el presente estudio, se analizaron un total de 64 pools de DNA de papaya silvestre. Es importante mencionar que en este análisis se asumió una prevalencia del transgén del 0.05%. Esto debido a que no hay ningún estudio del flujo de transgenes en donde se involucre a la papaya silvestre y aunado a esto, los monitoreos de transgenes con parientes silvestres de otras especies se han realizado en regiones donde coexisten los cultivos transgénicos con sus parientes (Reichman et al., 2006; Wang et al., 2006; Warwick et al., 2003; Wegier et al., 2011), dando como resultado una alta prevalencia de transgenes.

Sin embargo, el hecho de que existan evidencias del flujo de genes entre papaya silvestre y cultivada (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016) y que se han realizado cruces exitosas entre estos componentes del complejo de especie (Vázquez Calderón et al., 2014), hace necesario evaluar los riesgos que conlleva el escape de un gen de resistencia al PRSV a las poblaciones silvestres. El destino de estas poblaciones receptoras depende de diversos procesos tales como la adecuación de los híbridos, la progenie del retrocruzamiento, además del establecimiento, dispersión y prevalencia del transgén en las poblaciones silvestres (Hoofman et al., 2008). En parientes silvestres del género *Cucurbita* se ha logrado transferir transgenes mediante cruzamientos en invernaderos, dando como resultados híbridos fértiles. Esto nos ayuda a tener un panorama de lo que podría significar la introgresión y dispersión del transgén en poblaciones silvestres (Cruz-Reyes et al., 2015). Además, las investigaciones realizadas por Manshardt (2016) y Gonsalves (2010) han demostrado que la presencia de transgenes de resistencia al PRSV sí confiere una ventaja clara en condiciones donde se encuentra el virus de manera latente, lo que podría promover

la dispersión del transgén a lo largo de los cultivos. Esto es importante destacarlo debido a que en México el PRSV representa un factor delimitante en la producción de papaya y está presente a lo largo de las regiones productoras (Noa-Carranza et al., 2006), que su vez coinciden con la distribución de las poblaciones silvestres (Núñez-Farfán, 2017). En consecuencia, la introducción de papaya transgénica a estas regiones podría causar la rápida dispersión del transgén tanto en cultivos como en poblaciones silvestres.

Debido a lo anterior, es necesario integrar un enfoque similar para los análisis de riesgo de GM de *C. papaya* silvestre, en donde se evalúe la adecuación de los híbridos entre papaya GM y papaya silvestre en su posible centro de origen. Además de que, para la conservación de la especie, es crucial comprender cómo los hábitats naturales pueden favorecer el establecimiento de híbridos transgénicos de plantas silvestres y así determinar si la construcción del transgén resulta en el desarrollo de malezas, o de lo contrario, el transgén pudiera aumentar la transmisibilidad o la virulencia del patógeno en *C. papaya* silvestre (Pilson & Prendeville, 2004).

3 Posibles causas de la ausencia de transgenes en poblaciones de papaya en México

Bajo el monitoreo de papaya GM realizado en este estudio se encontró que actualmente en México no hay presencia de transgenes en poblaciones silvestres y domesticadas. Esta ausencia de transgenes puede ser debido a diferentes causas que tienen que ver con la producción y demanda del cultivo, las cuales se desarrollan a continuación.

Los principales factores de la ausencia de transgenes podrían deberse al poco interés de los productores mexicanos por introducir papaya GM en sus cultivos, además de la nula importación de papaya de otros países. Por un lado, en nuestro país solo se han otorgado dos permisos de liberación experimental, de los cuales ninguno pasó a la fase de liberación comercial (Silva-Rosales et al., 2010). Por otro lado, no se ha registrado la importación de papaya en los últimos 4 años (Secretaría de Economía, 2018), lo que implica un menor flujo de semillas provenientes de otros países productores de papayas GM que pudieran contribuir al flujo accidental de transgenes. Esto contrasta con otras especies cultivadas en

México como son los casos de maíz y algodón, donde además de haberse otorgado permisos de liberación (320 para algodón y 202 para maíz) (CIBIOGEM, 2018) existe un flujo constante de semillas provenientes de países productores de cultivos GM (ISAAA, 2016) (12 millones de toneladas para maíz proveniente de EUA y 0.20 millones de toneladas provenientes de Argentina Brasil y Canadá en el año 2017 (SAGARPA, 2017b)). Por su parte, para algodón en el 2017, se importaron 126 mil toneladas de fibra sin despepitar proveniente de los EUA (SAGARPA, 2017a). Estos constantes eventos de importación de países productores de cultivos GM ha provocado que actualmente exista la presencia de transgenes en poblaciones silvestres de maíz y algodón (Piñeyro-Nelson et al., 2009; Wegier et al., 2011).

Es claro que, el no existir permisos de producción en México no asegura que no exista la posibilidad de presencia de transgenes en *C. papaya*. Como ejemplos se encuentran Tailandia, en donde el no estar autorizada la producción de papaya GM, no ha significado que las papayas de dicho país se encuentren libres de transgenes (European Commission, 2018). La Comisión Europea ha reportado 44 casos de papaya GM importada de Tailandia, siendo el último reporte en el año 2017. Esto remarca, por un lado, la necesidad de realizar monitoreos de papaya GM en México para determinar la condición actual de *C. papaya*, pero, por otro lado, los reportes de la Unión Europea destacan de la importancia de la regulación de OGMs en los productos que se importan en esta región.

A diferencia del maíz, en México no se importa una cantidad significativa de papaya, sin embargo, es importante tener estandarizado un protocolo de detección previendo que, en un futuro, el cambio en las tendencias de mercado haga necesario una estrategia que garantice la entrada de papaya libre de transgenes. Además, se debe tener en cuenta que en México no hay registro de la importación de papaya proveniente de Tailandia (Secretaría de Economía, 2018); país en el que se ha registrado en múltiples ocasiones la exportación de papaya GM (European Commission, 2018). Debido a lo anterior se debería tener en consideración el historial de cada país para establecer medidas precautorias relacionadas a las importaciones de alimentos frescos, enfocándose principalmente en especies con centro de origen en el país, que además son de gran importancia económica.

4 Tamaño de muestra óptimo para monitoreo de papaya GM – otros escenarios

Como se menciona anteriormente, en el presente monitoreo no encontramos presencia de transgenes en las muestras analizadas. Sin embargo, siguiendo la experiencia de otros países y tomando en cuenta el contexto ecológico específico de la papaya en México planteamos una serie de escenarios hipotéticos para saber, bajo condiciones específicas, el número de muestras que sería necesario para realizar un monitoreo de papaya transgénica. Para estas proyecciones se utilizaron diferentes escenarios donde la prevalencia del transgén fuese similar a casos existentes en papaya y otras especies.

Los resultados obtenidos muestran que el muestreo para estimar la proporción de plantas transgénicas con una prevalencia mayor al 10% requiere de un esfuerzo de muestreo muy grande. Si se tuviera registros de prevalencia del transgén similares a los reportados en poblaciones ferales de papayas en Hawái ($p=16\%$) (Manshardt et al., 2016), sería necesario analizar 765 pools de DNA compuestos por 5 individuos. Probablemente en casos similares al anterior sería necesario aumentar el número de individuos en los pools de DNA como lo ha reportado Nageswara-Rao y colaboradores (2013). Por otro lado, en los casos donde la prevalencia del transgén ha sido reportada con un 24% (Wegier et al., 2011) el número de muestras a analizar se torna considerablemente grande, llegando hasta los 1329 pools de DNA. El gran número de pools que surge cuando existen valores altos de prevalencia sugiere que podría ser complicado utilizar el enfoque actual cuando se tiene un constante flujo de trasgenes entre poblaciones. Aunado a lo anterior, Montesinos-Lopez y colaboradores 2012 han sugerido que la ecuación utilizada en esta investigación disminuye su exactitud con valores de prevalencia por encima del 10%, por lo que es necesario otro enfoque diferente para la determinación del tamaño de muestra cuando existe un constante flujo entre plantas transgénicas y no transgénicas.

En el caso de que se liberara comercialmente la papaya transgénica resistente al PRSV, estos resultados sirven como una base para el monitoreo de papaya transgénica, dado que actualmente no se ha propuesto otro método ya establecido para determinar el número de muestras a analizar en monitoreos de OGM. Sin embargo, es importante

considerar aspectos de la biología de la especie y su papel en el país al momento de proponer una ecuación similar, ya que características como el tipo de floración, polinización, producción y tipos de cultivos, son aspectos importantes que no se pueden ignorar, que como se ha visto, influyen en el flujo de genes (Ellstrand, 2018; Ellstrand et al., 2003; Gonsalves et al., 2012; Manshardt et al., 2016, 2007). La papaya es una especie colonizadora y perenne con distintas estrategias de polinización (polinización cruzada y autopolinización), dispersión de polen (viento, insectos) y semillas (mamíferos y aves). Esto permite el éxito reproductivo y el flujo continuo de genes entre distintas variedades domesticadas y poblaciones silvestres. Incluso se ha reportado flujo de genes entre poblaciones separadas por la fragmentación del hábitat, sugiriendo que estas podrían ser consideradas metapoblaciones (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2016). Las características antes mencionadas son de suma importancia para el análisis de transgenes, ya que son factores determinantes en la dispersión del transgén, tanto intra como interpoblacional. Como ejemplo se pueden observar los casos de *Brassica napus* y *Gossypium hirsutum*, en los cuales la polinización cruzada y dispersión de polen por insectos fueron factores determinantes en el flujo de transgenes hacia las poblaciones silvestres (Busi & Powles, 2016; Wegier et al., 2011).

5 Implicaciones del flujo de genes en cultivos de papaya

Tomando en cuenta que *C. papaya* es una especie con muchas vías de dispersión de polen producto de la gran diversidad de especies polinizadoras (Chávez-Pesqueira et al., 2014), además de la experiencia de otros países como Tailandia en donde a pesar de no haber permisos de liberación de papaya GM se ha encontrado presencia de transgenes en sus cultivos; es importante considerar las implicaciones que tendría el flujo génico, de presentarse, entre los componentes del complejo de especie de papaya en su centro de origen. Por esta razón, se desarrollan a continuación, tomando en cuenta casos de estudio en otras especies, las implicaciones que podría tener el flujo de transgenes en México.

La papaya ha sido una planta modelo desde el comienzo de los mejoramientos por ingeniería genética, en la que se han realizado un alto número de desarrollos transgénico

con el fin de enfrentar problemas relacionados a la productividad, entre otros. En el caso de Hawái, la adopción de papaya resistente al PRSV tuvo beneficios para los productores al aumentar la producción del cultivo (Gonsalves, 1998). Sin embargo, dado que los cultivos GM de papaya conviven en el ambiente con cultivos orgánicos, se han encontrado en los últimos años la presencia de transgenes en cultivos orgánicos en Hawái (Manshardt et al., 2007), lo refleja que estos cultivos de papaya presentan constante intercambio de material genético.

Así mismo, se ha sugerido que el flujo de transgenes de papayas en Hawái es relativamente bajo debido al alto porcentaje de papayas hermafrodita dentro los cultivos, lo que permite la autofecundación de los individuos. Sin embargo, autores han reportado un alto porcentaje de flujo de transgenes en plantas hembra de papaya (Gonsalves et al., 2012; Manshardt et al., 2007), ya que al no tener sistema de autopolinización, estas requieren polen de otro individuo como fuente de fecundación. Estos resultados destacan la importancia de la biología de la especie, así como también el contexto en donde se cultiva la papaya transgénica. En este sentido, se ha reportado que en regiones donde coexisten cultivos ginodióicos (poblaciones hermafrofitas) y dióicos (poblaciones de machos y hembras) existe mayor probabilidad del flujo de transgenes. Tal es el caso de las regiones tropicales de América en donde en países como México, además de la presencia de cultivos con distintos sistemas de reproducción, la existencia de poblaciones silvestres a lo largo de las regiones productoras de papaya en el país podría propiciar el flujo de transgenes en las poblaciones silvestres. Estos organismos que han presentado flujo de genes desde los cultivos podrían posteriormente funcionar como puentes genéticos transfiriendo los transgenes a otras variedades nativas o parientes silvestres (Ellstrand et al., 2003).

Es claro que al asumir que un cultivo transgénico, por el simple hecho de ser transgénico va a terminar en poblaciones ferales o en poblaciones silvestres causando efectos adversos en el ambiente es como lo menciona Ellstrand (2018), una “certeza virtual”, y por lo tanto no se puede predecir. En diversos cultivos en los cuales los atributos insertados mediante ingeniería genética no se han traducido en la introgresión del transgén en poblaciones ferales o poblaciones silvestres (Ellstrand, 2018). Esto puede ser explicado debido a que en los ambientes donde se encuentran dichos organismos transgénicos, los

rasgos insertados no aumentan la adecuación de los organismos que lo presentan y por ende no aumenta su frecuencia en la población, o que la biología reproductiva de la especie no propicia el flujo del transgenes (Manasse, 1992). Tal es el caso de los cultivos de espiguilla (*Proa patensis*), álamo negro (*Populus nigra*) y berenjena (*Solanum melogena*), en los cuales los cultivos transgénicos coexisten con poblaciones silvestres y ferales. No obstante, no se ha reportado presencia de transgenes en ninguna de estas poblaciones (Ellstrand, 2018). Por el contrario, existen especies como la canola (*Brassica napus*) en que la hibridación de cultivos transgénicos y poblaciones silvestres o ferales, ha resultado en la aparición de malezas resistentes a herbicidas en Canadá (Knispel et al., 2008).

En el caso de la papaya, hasta antes de la introducción de cultivos GM la productividad de la especie se encontraba en condiciones críticas debido a los efectos del Virus de la Mancha Anular (Gonsalves, 1998). Sin embargo, con la introducción de los cultivos resistentes se logró acabar casi al 100% con la incidencia del virus. Actualmente, a casi 10 años de la introducción y comercialización de papaya GM en Hawái, se sigue encontrado la presencia de transgenes en poblaciones ferales (Manshardt et al., 2016). Esto podría deberse a que los rasgos insertados por ingeniería genética si otorgan una ventaja adaptativa a los organismos que los presentan, haciendo que estos se fijen en las poblaciones.

Esto hace evidente la existencia del flujo de transgenes en papaya y, por otro lado, la permanencia del transgén de resistencia al virus en poblaciones ferales podría sugerir que el transgén es un atributo que podría estar aumentando la adecuación de los organismos portadores. En distintas especies silvestres como calabaza (*Cucurbita pepo*) y especies del género *Eupatorium*, se ha demostrado que los virus como el MV (Virus del Mosaico) juegan un papel importante en el crecimiento poblacional de las poblaciones infectadas (Prendeville et al., 2012), por lo que la resistencia a un virus que interviene en la dinámica poblacional podría ser un factor que altere dicha dinámica. Ante estos escenarios, es necesario seguir con los esfuerzos de monitoreo de papaya GM en su centro de origen, mismos que deben realizarse periódicamente y deben abarcar no solo el complejo de especie presente en México, sino también aquellos organismos que forman parte de la cadena productiva.

6 Propuesta de metodología para el monitoreo de papaya GM en México

En el presente estudio, desarrollamos una propuesta de monitoreo para determinar la presencia de transgenes en *C. papaya* en México. Este monitoreo propone un enfoque que además de integrar el estudio del complejo silvestre-domesticado, permite hacer un monitoreo desde una perspectiva que involucra toda la cadena de comercialización. Desde la pre-comercialización, entendida como las muestras colectadas directamente en cultivos; hasta la post-comercialización, representada como las muestras de semillas de papaya compradas en los distintos comercios. Esto con el objetivo de analizar la presencia de transgenes a lo largo de toda la cadena comercial.

Esta propuesta integra también un escaneo rápido conformado por la búsqueda de marcadores moleculares que están presentes en un gran número de transformaciones genéticas, seguido por la búsqueda específica de los eventos de transformación. Además, incluye también la estandarización de la utilización de pools de DNA, lo cual permite analizar un gran número de muestras reduciendo a su vez, el tiempo y recursos invertidos en este proceso. Utilizando un método robusto de determinación del número de muestra en relación a condiciones específicas, se plantea además una serie de escenarios hipotéticos que podrían ser utilizados para futuros esfuerzos de monitoreo. En concreto, el monitoreo propuesto en el presente trabajo representa una herramienta útil para la detección de transgenes de cultivos que puede ser utilizada no solo en papaya, sino en otras especies en las que las condiciones ambientales y de producción, promuevan el flujo de genes entre organismos de distintas poblaciones.

Conclusiones

- Actualmente no hay presencia de transgenes en poblaciones silvestres, variedades nativas y cultivos comerciales de papaya en México. Sin embargo, al ser el posible centro de origen de la especie es necesario seguir generando estrategias de monitoreo de papaya GM para garantizar la conservación de la especie en estado silvestre.
- El poco interés de los productores por papaya GM y la escasa importación de papaya de otras partes del mundo han evitado de manera indirecta el flujo de transgenes en papaya.
- El método propuesto para la determinación del tamaño de muestras necesario para el monitoreo de papaya GM puede ser utilizado de manera eficiente siempre y cuando la prevalencia del transgen sea menor al 10%.
- La estrategia de monitoreo de papaya GM propuesta en este trabajo puede ser empleada de manera eficiente y como punto de partida para futuros monitores no solamente para papaya GM, sino para otras especies que han sido modificadas genéticamente y que tienen consideradas con centro de origen en México.

Literatura citada

- Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Bonfini, L., Gatto, F., Rosa, S., Patak, A., & Kreysa, J. (2014). JRC GMO-Matrix: A web application to support Genetically Modified Organisms detection strategies. *BMC Bioinformatics*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0417-8>
- Aradhya, M., Manshardt, R., Zee, F., & Morden, C. W. (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L.(Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genetic Resources and ...*, *46*, 579–586. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1008786531609>
- Azad, M. A. K., Amin, L., & Sidik, N. M. (2014). Gene technology for papaya ringspot virus disease management. *TheScientificWorldJournal*, *2014*, 768038. <https://doi.org/10.1155/2014/768038>
- Badillo, V. M. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil.(Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, *10*(2), 74–79. <https://doi.org/10.2307/3393173>
- Baltazar, B. M., Sánchez-Gonzalez, J. D. J., De La Cruz-Larios, L., & Schoper, J. B. (2005). Pollination between maize and teosinte: An important determinant of gene flow in Mexico. *Theoretical and Applied Genetics*, *110*(3), 519–526. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1859-6>
- Bau, H.-J., Cheng, Y.-H., Yu, T.-A., Yang, J.-S., & Yeh, S.-D. (2003). Broad spectrum resistance to different geographic strains of Papaya ringspot virus in Coat Protein gene transgenic Papaya. *Phytopathology*, *93*(1), 112–120. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.1.112>
- Beachy, R. N., Loesch-Fries, S., & Tumer, N. E. (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, *28*, 451–472. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002315>
- Brown, J. E., Bauman, J. M., Lawrie, J. F., Rocha, O. J., & Moore, R. C. (2012). The structure of morphological and genetic diversity in natural populations of *Carica papaya* (Caricaceae) in Costa Rica. *Biotropica*, *44*(2), 179–188. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00779.x>
- Buckler, E. S., & Stevens, N. M. (2006). Maize origins, domestication, and selection. In and H. C. Timothy J. Motley, Nyree Zerega (Ed.), *Darwin's harvest: New approaches to the origins, evolution, and conservation of crops* (1st ed., pp. 67–90). Columbia University Press. <https://doi.org/DOI:10.7312/mot113316>
- Busi, R., & Powles, S. B. (2016). Transgenic glyphosate-resistant canola (*Brassica napus*) can persist outside agricultural fields in Australia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *220*, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.12.028>
- Cabrera-Ponce, J. L., Vegas-García, A., & Herrera-Estrella, L. (1995). Herbicide resistant transgenic papaya

- plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports*, *15*, 1–7.
- Cabrera, D., García, D., Portal, O., & Potyviridae, F. (2010). Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-p): Biología, epifitología y diversidad genética como base para el manejo mediante técnicas biotecnológicas. *Biotecnología Vegetal*, *10*(2), 67–77.
- Calderon Rivera, G., & Cepeda Vergara, R. (1996). *Control de plagas y enfermedades en papaya y melon.pdf*. (I. Instituto Colombiano Agropecuario, Ed.) (1st ed.). Bogota, Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.
- Carvalho, F. A., & Renner, S. S. (2015). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogeny, Biogeography and an e-Monograph of the Papaya Family (Caricaceae) as an Example of Taxonomy in the Electronic Age*, *65*(1), 49–81. https://doi.org/10.1007/978-3-658-10267-8_4
- Chávez-Pesqueira, M., & Núñez-Farfán, J. (2016). Genetic diversity and structure of wild populations of *Carica papaya* in Northern Mesoamerica inferred by nuclear microsatellites and chloroplast markers. *Annals of Botany*, *118*(7), 1293–1306. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw183>
- Chávez-Pesqueira, M., & Núñez-Farfán, J. (2017). Domestication and Genetics of Papaya: A Review. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *5*(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00155>
- Chávez-Pesqueira, M., Suárez-Montes, P., Castillo, G., & Núñez-Farfán, J. (2014). Habitat fragmentation threatens wild populations of *Carica papaya* (Caricaceae) in a lowland rainforest. *American Journal of Botany*, *101*(7), 1092–1101. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400051>
- CIBIOGEM. (2015). *Orden jurídico nacional e internacional en materia de bioseguridad de organismos genéticamente modificados*. México.
- CIBIOGEM. (2018). Permisos de liberación de OGMs. Retrieved October 8, 2018, from <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion>
- COFEPRIS. (2017). Organismos Genéticamente Modificados. Retrieved October 10, 2018, from <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/organismos-geneticamente-modificados>
- Colunga-GarcíaMarín, P., & Zizumbo-Villarreal, D. (2004). Domestications of plants in Maya lowlands. *Economic Botany*, *58*(2004), 101–110. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)58](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)58)
- CONABIO. (2011). Razas de maíz en México. Retrieved April 4, 2019, from <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/razas2012.html>
- CONABIO. (2015). *Carica papaya*. Retrieved February 21, 2019, from http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/23-caric1m.pdf

- Cruz-Reyes, R., Ávila-Sakar, G., Sánchez-Montoya, G., & Quesada, A. M. (2015). Experimental assessment of gene flow between transgenic squash and a wild relative in the center of origin of cucurbits. *Ecosphere*, *6*(12), 1–13. <https://doi.org/10.1890/ES15-00304.1>
- Cuevas, A., Messmacher, M., & Werner, A. (2003). Sincronización Macroeconómica entre México y sus Socios Comerciales del TLCAN. *Dirección General de Investigación Económica*, *1*, 1–123. Retrieved from <http://www.banxico.org.mx/publicaciones-y-discursos/publicaciones/documentos-de-investigacion/banxico/%7B461043D9-4987-6B4A-D48A-519FF68AA898%7D.pdf>
- De Guglielmo, Z. M., & Da Silva, R. F. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *18*(2), 119. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61529>
- de la Fuente, J. M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J. L., & Herrera-Estrella, L. (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *SCIENCE*, *276*, 1–4. <https://doi.org/10.1126/science.276.5318.1566>
- Dey, K., Mondal, S., & Mandal, S. (2016). Flower-visitor diversity with reference to pollen dispersal and pollination of *Carica papaya* L. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, *3*(2), 65–71. Retrieved from <http://www.ijarbs.com/pdfcopy/feb2016/ijarbs12.pdf>
- Dhekney, S. A., Kandel, R., Bergey, D. R., Sittler, V., Soorianathasundaram, K., & Litz, R. E. (2016). Advances in papaya biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *5*, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.004>
- Dhekney, S. A., Litz, R. E., Moraga Amador, D. A., & Yadav, A. K. (2007). Potential for introducing cold tolerance into papaya by transformation with C-repeat binding factor (CBF) genes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *43*(3), 195–202. <https://doi.org/10.1007/s11627-006-9020-7>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). CTAB DNA extraction in plants. *Phytochemical Bulletin*, *19*, 11–15. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10003365693/>
- Drew, R. A., Siar, S. V., O'Brien, C. M., Magdalita, P. M., & Sajise, A. G. C. (2006). Breeding for Papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* via hybridisation with *Vasconcellea quercifolia*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *46*(3), 413–418. <https://doi.org/10.1071/EA04247>
- Dyer, G. A., Serratos-Hernández, J. A., Perales, H. R., Gepts, P., Piñeyro-Nelson, A., Chávez, A., ... Alvarez-Buylla, E. R. (2009). Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. *PLoS ONE*, *4*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005734>
- Ellstrand, N. C. (2018). “Born to Run”? Not Necessarily: Species and Trait Bias in Persistent Free-Living Transgenic Plants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00088>

- Ellstrand, N. C., Barrett, S. C. H., Linington, S., Stephenson, A. G., & Comai, L. (2003). Current knowledge of gene flow in plants: Implications for transgene flow. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1434), 1163–1170. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1299>
- Esquinas-Alcázar, J. T. (1993). Diversidad genética para el desarrollo en la agricultura del Siglo XXI. In J. . Cubero & M. T. Moreno (Eds.), *La agricultura del siglo XXI* (1st ed., pp. 79–101). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- European Commission. (2010a). Qualitative PCR method for detection of Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. Retrieved October 8, 2018, from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=q1-ele-00-001&rq=QL-ELE-00-001>
- European Commission. (2010b). Qualitative PCR method for detection of nopaline synthase terminator. Retrieved October 8, 2018, from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=q1-ele-00-006&rq=QL-ELE-00-006>
- European Commission. (2013). Qualitative PCR method for detection of the junction between the CaMV35S promoter and the chimeric CMV/PRSV coat protein (ISO/FDIS 21569:2005/Amd.1:2013). Retrieved October 8, 2018, from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=q1-con-00-012&rq=QL-CON-00-012>
- European Commission. (2014). JRC GMO-Matrix - Joint Research Centre. Retrieved October 10, 2016, from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/full>
- European Commission. (2018). Notification of papaya GMO. Retrieved October 8, 2018, from <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchForm&cleanSearch=1>
- Fan, M. J., Chen, S., Kung, Y. J., Cheng, Y. H., Bau, H. J., Su, T. T., & Yeh, S. D. (2009). Transgene-specific and event-specific molecular markers for characterization of transgenic papaya lines resistant to Papaya ringspot virus. *Transgenic Research*, 18(6), 971–986. <https://doi.org/10.1007/s11248-009-9287-7>
- FAO. (2017). FAOSTAT, papaya production. Retrieved October 9, 2018, from <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>
- Fermin, G., Inglessis, V., & Garboza, C. (2004). Engineered resistance against Papaya ringspot virus in Venezuelan transgenic papayas. *Plant Disease*, 88(5), 516–522. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.516>
- Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L., & Sanford, J. C. (1990). Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 9(4), 189–194. <https://doi.org/10.1007/BF00232177>
- Fitch, M. M. M., Mashardts, R. M., Gonsalves, D., & Slightom, J. L. (1993). Transgenic papaya plants from

- Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell*, *12*, 245–249.
<https://doi.org/10.1007/BF00269295>
- Fuentes, G., & Santamaría, J. M. (2014). Papaya (*Carica papaya* L.): origin, domestication, and production. In R. Ming & P. H. Moore (Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya* (1st ed., pp. 1–15). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7>
- Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A., & Toyoda, M. (2001). Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, *42*(4), 231–236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11817137>
- Gonsalves, D. (1998). Control of Papaya Ringspot Virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology*, *36*(1), 415–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.415>
- Gonsalves, D., Gonsalves, C., Carr, J., Tripathi, S., Matsumoto, T., Suzuki, J., ... Pitz, K. (2012). Assaying for Pollen Drift from Transgenic “Rainbow” to Nontransgenic “Kapoho” Papaya under Commercial and Experimental Field Conditions in Hawaii. *Tropical Plant Biology*, *5*(2), 153–160.
<https://doi.org/10.1007/s12042-011-9090-5>
- Gonsalves, D., Gonsalves, C., Ferreira, C., & Fitch, M. (2010). Transgenic Virus-Resistant Papaya: From Hope to Reality in Controlling Papaya Ringspot Virus in Hawaii. *APSnet Feature Articles*, (July).
<https://doi.org/10.1094/apsnetfeature-2004-0704>
- Griffiths, K., Partis, M. L., & Croan, D. (2002). *Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food*. Australia.
- Harlan, J. R. (1971). Agricultural origins: centres and noncenters. *Science*, *174*, 468–474.
- Hernández, M., Cabrera-Ponce, J. L., Fragoso, G., López-Casillas, F., Guevara-García, A., Rosas, G., ... Scitutto, E. (2007). A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*, *25*(21), 4252–4260. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.080>
- Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, *53*(2), 242–255. <https://doi.org/10.1016/j.ipm.2005.03.026>
- Hooftman, D. A. P., Oostermeijer, J. G. B., Marquard, E., & Den Nijs, H. C. M. (2008). Modelling the consequences of crop-wild relative gene flow: A sensitivity analysis of the effects of outcrossing rates and hybrid vigour breakdown in *Lactuca*. *Journal of Applied Ecology*, *45*(4), 1094–1103.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01508.x>
- Horovitz, S., & Jiménez, H. (1967). Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en Caricáceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agronomía Tropical*, *17*(4), 323–343.
- Huerta Olguin, A. (2016). *Detección de frutos de papaya (Carica papaya L.) Genéticamente Modificados*,

comercializados en México por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Universidad Nacional Autónoma de México.

- ISAAA. (2016). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Briefs* (Vol. 52). <https://doi.org/10.1017/S0014479706343797>
- ITFNET. (2016). PAPA YA-Common varieties. Retrieved October 9, 2018, from <http://www.itfnet.org/v1/2016/05/papaya-common-varieties/>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411926112>
- Jiménez, V. M., Mora-Newcomer, E., & Gutiérrez-Soto, M. V. (2014). Biology of the papaya plant. In R. Ming & P. H. Moore (Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya* (1st ed., pp. 17–33). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), W5–W9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Kelley, K. (2007). Confidence intervals for standardized effect sizes: Theory, application, and implementation. *Journal of Statistical Software*, 20(8), 1–24. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18637/jss.v020.i08>
- Kelley, K., & Rausch, J. R. (2006). Sample size planning for the standardized mean difference: Accuracy in parameter estimation via narrow confidence intervals. *Psychological Methods*, 11(4), 363–385. <https://doi.org/10.1037/1082-989X.11.4.363>
- Kim, S. A., Lee, M., Yoo, S. J., Kim, J. H., Lee, H., Park, K. S., ... Kim, H. Y. (2010). Detection of GM papaya event 55-1 in fresh and processed papaya using duplex PCR. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 53(2), 237–242. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.037>
- Knispel, A. L., McLachlan, S. M., Van Acker, R. C., & Friesen, L. F. (2008). Gene Flow and Multiple Herbicide Resistance in Escaped Canola Populations. *Weed Science*, 56(1), 72–80. <https://doi.org/10.1614/WS-07-097.1>
- Kole, C. (2011). *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: tropical and subtropical fruits*. (K. Chittaranjan, Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits* (1st ed.). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8>
- Larqué-Saavedra, A. (2016). Biotecnología prehispánica en mesoamérica. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(2), 107–115.

- LBOGM. (2005). *Ley de bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados*. México.
- López-Gómez, R., Cabrera-Ponce, J. L., Saucedo-Arias, L. J., Carreto-Montoya, L., Villanueva-Arce, R., Díaz-Perez, J. C., ... Herrera-Estrella, L. (2009). Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression. *Transgenic Research*, 18(1), 89–97. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9197-0>
- Lübeck, M. (2002). *Detection of genetically modified plants – methods to sample and analyze GMO content in plants and plant products*. Denmark. Retrieved from <http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm>
- Magdalita, P. ., Drew, R. A., Adkins, S. W., & Godwin, I. D. (1997). Morphological , molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 224–229.
- Manasse, R. S. (1992). Ecological risks of transgenic plants :effects of spatial dispersion on gene flow. *Ecological Applications*, 2(4), 431–438.
- Manshardt, R. M. (2012). The Papaya in Hawaii. *HortScience*, 47(10), 1399–1404.
- Manshardt, R. M., Bishaw, D., Pitz, K., & Stewart, C. N. (2016). Gene flow from commercial transgenic papaya fields into feral populations in Hawaii. *Acta Horticulturae*, 1124, 33–40. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1124.5>
- Manshardt, R. M., Mello, C. L., Lum, S. D., & Ta, L. (2007). Tracking papaya pollen movement with the GUS transgene marker. *Acta Horticulturae*, 740, 183–188.
- Manshardt, R. M., & Wenslaff, T. F. (1989). Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*, 114(4), 689–694. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8933375>
- Matsumoto, T. K., Zee, F. T. P., Suzuki, J. Y., Tripathi, S., Carr, J., & Mackey, B. (2010). Determining sex and screening for the adventitious presence of transgenic material in *Carica papaya* L. seed germplasm. *HortScience*, 45(1), 161–164.
- McCafferty, H. R. K., Moore, P. H., & Zhu, Y. J. (2006). Improved *Carica papaya* tolerance to carmine spider mite by the expression of *Manduca sexta* chitinase transgene. *Transgenic Research*, 15(3), 337–347. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-0005-4>
- Miki, B., & McHugh, S. (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107(3), 193–232. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.011>
- Ming, R., & Moore, P. H. (2014). *Genetics and genomics of papaya*. (R. Ming & P. H. Moore, Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya* (1st ed.). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7>
- Mirafuentes, F., & Azpeitia, A. (2008). Azteca, Primer híbrido de papaya para el trópico de México. *Revista*

de Fitotecnia, 31(3), 291–293.

Montesinos-López, O. A., Montesinos-López, A., Crossa, J., Eskridge, K., & Sáenz, R. A. (2011). Optimal sample size for estimating the proportion of transgenic plants using the Dorfman model with a random confidence interval. *Seed Science Research*, 21(3), 235–245.

<https://doi.org/10.1017/S0960258511000055>

Montesinos-López, O. A., Gaytán Lugo, L. S., & López, A. M. (2012). Fórmula para estimar la proporción de plantas genéticamente modificadas mediante pruebas de grupo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(3), 209–219.

Morton, J. F. (1984). Carica papaya. In J. F. Morton (Ed.), *Fruits of Warm Climates* (1st ed., pp. 1993–1512). Miami: Creative Resource Systems.

Nageswara-Rao, M., Kwit, C., Agarwal, S., Patton, M. T., Skeen, J. A., Yuan, J. S., ... Stewart, C. N. (2013). Sensitivity of a real-time PCR method for the detection of transgenes in a mixture of transgenic and non-transgenic seeds of papaya (*Carica papaya* L.). *BMC Biotechnology*, 13(1), 1.

<https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-69>

Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., ... Teshima, R. (2011). Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(10), 1648–1651.

<https://doi.org/JST.JSTAGE/bpb/34.1648> [pii]

NCBI. (2018). BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Retrieved October 11, 2018, from

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Niklas, K. J., & Marler, T. E. (2007). Carica papaya (Caricaceae): A case study into the effects of domestication on plant vegetative growth and reproduction. *American Journal of Botany*, 94(6), 999–1002. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.6.999>

Nishina, M., Nagao, M., & Furutani, S. (2004). *Optimizing Germination of Papaya Seeds*. Hawaii.

Noa-Carranza, J. C., González-de-León, D., Piñero, D., & Silva-Rosales, L. (2006). Distribution of papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in papaya plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease*, 90(8), 1004–1011.

Núñez-Farfán, J. (2017). *Análisis para la determinación de los centros de origen y diversidad genética de Carica papaya (Caricaceae)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología.

Informe final CONABIO, Proyecto WQ003. Ciudad de México. Retrieved from

<http://www.conabio.gob.mx/institucion/cgi-bin/datos2.cgi?Letras=WQ&Numero=3>

O'Brien, C. M., & Drew, R. A. (2009). Potential for using *Vasconcellea parviflora* as a bridging species in

- intergeneric hybridisation between *V. pubescens* and *Carica papaya*. *Australian Journal of Botany*, 57(7), 592–601. <https://doi.org/10.1071/BT09111>
- Ovesná, J., & Hodek, J. (2009). Detection of transgenic papaya lines: Extraction protocol optimisation and verification of DNA quality by PCR assay. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(SPECIAL ISSUE 2), 75–81.
- Pang, S. Z., & Sanford, J. C. (1988). Agrobacterium-mediated gene transfer in papaya. *J Amer Soc Hort Sci*, 113, 287–291. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US882751788>
- Paterson, A. H., Felker, P., Hubbell, S. P., & Ming, R. (2008). The Fruits of Tropical Plant Genomics. *Tropical Plant Biology*, 1, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s12042-007-9004-8>
- Paull, R. E. (1993). Pineapple and papaya. In G. B. Seymour, J. E. Taylor, & G. A. Tucker (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening* (1st ed., pp. 291–323). Dordrecht, Netherlands: Springer . https://doi.org/10.1007/978-94-011-1584-1_10
- Paz, L., & Vázquez-Yanes, C. (1998). Comparative seed ecophysiology of wild and cultivated *Carica papaya* trees from a tropical rain forest region in Mexico. *Tree Physiology*, 277–280. Retrieved from <http://treephys.oxfordjournals.org/content/18/4/277.short>
- Petrillo, M., Angers-Loustau, A., Henriksson, P., Bonfini, L., Patak, A., & Kreysa, J. (2015). JRC GMO-Amplicons: A collection of nucleic acid sequences related to genetically modified organisms. *Database*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1093/database/bav101>
- Pilson, D., & Prendeville, H. R. (2004). Ecological effects of transgenic crops and the escape of transgenes into wild populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35(1), 149–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132406>
- Piñeyro-Nelson, A., Van Heerwaarden, J., Perales, H. R., Serratos-Hernández, J. A., Rangel, A., Hufford, M. B., ... Álvarez-Buylla, E. R. (2009). Transgenes in Mexican maize: Molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*, 18(4), 750–761. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03993.x>
- Prendeville, H. R., Ye, X., Jack Morris, T., & Pilson, D. (2012). Virus infections in wild plant populations are both frequent and often unapparent. *American Journal of Botany*, 99(6), 1033–1042. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100509>
- Reichman, J. R., Watrud, L. S., Lee, E. H., Burdick, C. A., Bollman, M. A., Storm, M. J., ... Mallory-Smith, C. (2006). Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagronomic habitats. *Molecular Ecology*, 15(13), 4243–4255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03072.x>

- Rosa, S. F., Gatto, F., Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Kreysa, J., & Querci, M. (2016). Development and applicability of a ready-to-use PCR system for GMO screening. *Food Chemistry*, 201, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.007>
- SAGARPA. (2017a). Algodon Mexicano. In *Planeacion agrícola nacional 2017-2030* (1st ed., Vol. I, p. 28). Ciudad de México.
- SAGARPA. (2017b). Maiz blanco y amarillo Mexicano. In *Planeación agrícola nacional 2017-2030* (1st ed., pp. 1–14). Ciudad de México.
- SAGARPA. (2017c). Papaya Mexicana. In SAGARPA (Ed.), *Planeación agrícola nacional 2017-2030* (1st ed., Vol. I, pp. 1–14). Ciudad de México: SAGARPA.
- Santamaría, F. B., Mirafuentes, F. H., & Rico, H. P. (2014). *Mxj. Híbrido de papaya sin carpeloidía* (Vol. 17). Yucatan, México.
- Santamaria, J. M. (2017). *Propagación clonal de papaya para la obtención de plantas sobresalientes en tamaño y color*. Yucatán.
- Secretaría de Economía. (2018). Sistema de Información Arancelaria Vía Internet. Retrieved October 9, 2018, from <http://www.economia-snci.gob.mx/>
- Shah, D. M., Horsch, R. B., Klee, H. J., Kishore, G. M., Winter, J. A., Tumer, N. E., ... Fraley, R. T. (1986). Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*, 233(4762), 478–481. <https://doi.org/10.1126/science.233.4762.478>
- SIAP. (2018). SIACON - NG. Ciudad de México. Retrieved from <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>
- Silva-Rosales, L., González-de-León, D., Guzmán-González, S., & Chauvet, M. (2010). Why there is no Transgenic Papaya in Mexico. *Transgenic Plant Journal*, 4(Special Issue 4), 45–51. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/255981172_Why_there_is_no_Transgenic_Papaya_in_Mexico/file/5046352139c57a4240.pdf
- SNICS. (2018). *Gaceta oficial de los derechos de obtentor de variedades vegetales*. México.
- Somma, M., & Querci, M. (2009). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. Retrieved from http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual_ES/Sesi?n4.pdf
- Souza Júnior, M. T., Nickel, O., & Gonsalves, D. (2005). Development of virus resistant transgenic papayas expressing the coat protein gene from a Brazilian isolate of Papaya ringspot virus. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 357–365. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000400004>
- Storey, W. B. (1941). The botany and sex relationships of the papaya. *Hawaii Agric. Exp. Bull.*, 87, 5–23.

Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10010265038/>

- Tripathi, S., Suzuki, J. Y., & Gonsalves, D. (2007). Development of Genetically Engineered Resistant Papaya for papaya ringspot virus in a Timely Manner. In P. C. Ronald (Ed.), *Plant-Pathogen Interactions* (1st ed., pp. 197–240). Davis: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-966-4>
- United Nations. (2017). UN Comtrade, International Trade Statistics Database. Retrieved October 9, 2018, from <https://comtrade.un.org/>
- Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., & Gheysen, G. (2002). AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theoretical and Applied Genetics*, *105*(2–3), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0983-4>
- VanBuren, R., Zeng, F., Chen, C., Zhang, J., Wai, C. M., Han, J., ... Ming, R. (2015). Origin and domestication of papaya Y h chromosome. *Genome Research*, *25*, 1–10. <https://doi.org/10.1101/gr.183905.114.9>
- Vázquez Calderón, M., Zavala León, M. J., Contreras Martín, F. A., Espadas Y Gil, F., Navarrete Yabur, A., Sánchez Teyer, L. F., & Santamaría, J. M. (2014). New cultivars derived from crosses between commercial cultivar and a wild population of papaya rescued at its center of origin. *Journal of Botany*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/829354>
- Wall, E. M., Lawrence, T. S., Green, M. J., & Rott, M. E. (2004). Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR. *European Food Research and Technology*, *219*(1), 90–96. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0921-6>
- Wang, F., Yuan, Q. H., Shi, L., Qian, Q., Liu, W. G., Kuang, B. G., ... Jia, S. R. (2006). A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). *Plant Biotechnology Journal*, *4*(6), 667–676. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00210.x>
- Warwick, S. I., Simard, M. J., Légère, A., Beckie, H. J., Braun, L., Zhu, B., ... Stewart, C. N. (2003). Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theoretical and Applied Genetics*, *107*(3), 528–539. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1278-0>
- Wegier, A., Piñeyro-Nelson, A., Alarcón, J., Gálvez-Mariscal, A., Álvarez-Buylla, E. R., & Piñero, D. (2011). Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. *Molecular Ecology*, *20*(19), 4182–4194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05258.x>
- Wei, J., Le, H., Pan, A., Xu, J., Li, F., Li, X., ... Yang, L. (2016). Collaborative trial for the validation of event-specific PCR detection methods of genetically modified papaya Huanong No.1. *Food Chemistry*,

194, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.010>

- Wei, J., Li, F., Guo, J., Li, X., Xu, J., Wu, G., ... Yang, L. (2013). Collaborative ring trial of the papaya endogenous reference gene and its polymerase chain reaction assays for genetically modified organism analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(47), 11363–11370. <https://doi.org/10.1021/jf403338a>
- Wheater, C. P., Cook, P. A., & Bell, J. R. (2011). *Practical field ecology: a project guide*. (John Wiley & Sons Ltd, Eds.) (1st ed.). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Xu, W., Bai, W., Guo, F., Luo, Y., Yuan, Y., & Huang, K. (2008). A papaya-specific gene, papain, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic papayas. *European Food Research and Technology*, *228*(2), 301–309. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0935-6>
- Zhang, G., Zhou, P., Guo, A., Shen, W., & Li, X. (2003). An initial study of transgenic *Carica papaya* used as a kind of vaccine for anti tuberculosis. *Acta Botanica Yunnanica*, *25*(2), 223–229. Retrieved from <https://europepmc.org/abstract/cba/535985>
- Zhu, Y. J., Agbayani, R., & Moore, P. H. (2007). Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. *Planta*, *226*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0471-1>

Anexo 1

Anexo 1.1 Coordenadas geográficas de las muestras colectadas por el Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, UNAM, utilizadas para este proyecto.

1 Poblaciones silvestres

Especie	Tipo	Estado	Población	Latitud	Longitud
C.papaya	Silvestre	Campeche	Mamantel	18.5471056	-91.0858333
C.papaya	Silvestre	Chiapas	Palenque	17.4944389	-92.0192028
C.papaya	Silvestre	Guerrero	Marquelia	16.5809056	-98.7881222
C.papaya	Silvestre	Guerrero	Tecpan de Galeana	18.2223917	-103.162506
C.papaya	Silvestre	Michoacan	Costa de Michoacán	20.7708139	-105.376119
C.papaya	Silvestre	Nayarit	Bucerías	21.5821509	-104.996408
C.papaya	Silvestre	Oaxaca	Matías Romero	16.9072389	-95.0101333
C.papaya	Silvestre	Oaxaca	Santiago Astata	15.9831861	-95.6482944
C.papaya	Silvestre	Oaxaca	Ventanilla	15.6785944	-96.5696806
C.papaya	Silvestre	Población Río Lagartos	Río Lagartos	21.5183722	-88.1387472
C.papaya	Silvestre	Población Río Lagartos	Chichén Itzá	20.6822694	-88.5684806
C.papaya	Silvestre	Quintana Roo	Oxtankah	18.5828889	-88.2444611
C.papaya	Silvestre	Quintana Roo	Cancún	20.9052028	-87.4285639
C.papaya	Silvestre	Sinaloa	Población Tepic	23.3637028	-105.946194
C.papaya	Silvestre	Tabasco	Villa Guadalupe	17.3696611	-93.620375
C.papaya	Silvestre	Veracruz	Poza Rica	20.4796889	-97.6564111
C.papaya	Silvestre	Veracruz	Tuxtlas	18.5816139	-95.0753667
C.papaya	Silvestre	Veracruz	Acayucan	17.5114583	-95.0904278
C.papaya	Silvestre	Veracruz	Tuxclas	18.6198389	-95.0891722
C.papaya	Silvestre	Yucatan	Dzibilcahtún	21.0932568	-89.5971389

2 Cultivos

Especie	Tipo	Variedad	Estado	Localidad	Latitud	Longitud
C.papaya	Cultivo	NA	Jalisco	Emiliano Zapata	19.3618789	-104.929256
C.papaya	Cultivo	NA	Colima	Cuyutlan	18.9341972	-103.997292
C.papaya	Cultivo	NA	Guerrero	San Luis de la Loma	17.2099361	-100.771319

Anexo 1.2 Coordenadas geográficas de las muestras colectadas por el Laboratorio de Genética de la Conservación del Instituto de Biología, UNAM y por la Doctora Guadalupe Andraca Gómez

1 Individuos silvestres

Especie	Tipo	Estado	Localidad	Latitud	Longitud
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Comalcalco	18.2002722	-93.2000197
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Comalcalco	18.1725998	-93.2118333
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Comalcalco	18.2163333	-93.2011833
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Comalcalco	18.1803568	-93.2024167
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Comalcalco	18.2843056	-93.2001083
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Cunduacan	18.1000936	-93.16674638
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Cunduacan	18.1333878	-93.1834833
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Centro	18.0641667	-92.883375
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Tacotalpa	17.4449722	-92.7431944
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Tacotalpa	17.4386667	-92.7492222
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Tacotalpa	17.4386806	-92.7488889
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Teapa	17.5261944	-92.0944499
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Teapa	18.2002722	-93.2000197
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Macuspana	17.615161	-92.4686944
C.papaya	Silvestres	Tabasco	Macuspana	17.6200556	-92.337083
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7798097	-101.721028
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7800278	-101.721167
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7795573	-101.720361

C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7823889	-101.724028
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7838611	-101.726222
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7836389	-101.72675
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7849167	-101.72375
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7838333	-101.72349
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7842778	-101.72349
C.papaya	Silvestres	Guerrero	Troncones	17.7823356	-101.723699

2 Traspacios

Especie	Tipo	Variedad	Estado	Localidad	Latitud	Longitud
C.papaya	Traspatio	Maradol	Veracruz	Jicaro	18.5379916	-96.1095475
C.papaya	Traspatio	NA	Veracruz	Sayula de Aleman	17.8833418	-94.9599025
C.papaya	Traspatio	NA	Veracruz	Sayula de Aleman	17.8757952	-94.9663211
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Ventosa	16.4785994	-94.9888705
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Salina Cruz	16.223032	-95.2093631
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Morro de Mazatan	16.1026199	-95.3774176
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Santiago Astata	15.9903786	-95.675306
C.papaya	Traspatio	Amameyada	Oaxaca	Santa Maria	15.9959342	-95.7055212
C.papaya	Traspatio	Criolla	Oaxaca	Santa Maria	15.9939549	-95.7045122
C.papaya	Traspatio	Maradol	Oaxaca	Morro Ayuta	15.8352895	-95.8472708
C.papaya	Traspatio	Criolla	Oaxaca	Barra de la cruz	15.8352895	-95.9704418
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Barra de la cruz	15.8371646	-95.9695656
C.papaya	Traspatio	Criolla	Oaxaca	Pochutla	15.7354418	-96.3401197
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Pochutla	15.7381534	-96.48154
C.papaya	Traspatio	Amarilla	Oaxaca	Pochutla	15.7380695	-96.4813063
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Pochutla	15.7477213	-96.4789905
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	El Vigía	15.7179058	-96.4781006
C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Zipolite	15.6669946	-96.5479915
C.papaya	Traspatio	Maradol	Oaxaca	Tlachicon	15.7278274	-96.70934

C.papaya	Traspatio	NA	Oaxaca	Tlachicon	15.7376943	-96.7653347
C.papaya	Traspatio	NA	Guerrero	San Isidro	16.6188714	-98.4853403
C.papaya	Traspatio	NA	Guerrero	Marquelia	16.5785471	-98.8401453
C.papaya	Traspatio	Maradol	Guerrero	Playa ventura	16.5934913	-98.9234252
C.papaya	Traspatio	Maradol	Guerrero	Playa ventura	16.5392477	-98.9155903
C.papaya	Traspatio	Maradol	Oaxaca	Loma Bonita	18.0994444	-95.8833333
C.papaya	Traspatio	Maradol	Oaxaca	Loma Bonita	18.0980556	-95.882577
C.papaya	Traspatio	Maradol	Oaxaca	Loma Bonita	18.1002778	-95.8830556
C.papaya	Traspatio	Maradol	Oaxaca	Loma Bonita	18.1052778	-95.8844444
C.papaya	Traspatio	NA	Veracruz	Carretera Pozarica	20.4652778	-97.0069444
C.papaya	Traspatio	NA	Veracruz	Tecolutla	20.4772222	-97.0069444
C.papaya	Traspatio	NA	Veracruz	Tecolutla	20.4472222	-97.0913889
C.papaya	Traspatio	NA	Veracruz	Tecolutla	20.4899127	-97.021165

3 Cultivos

Especie	Tipo	Variedad	Estado	Localidad	Latitud	Longitud
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	Etla	17.1945662	-96.7572463
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	Barra de la cruz	15.8388602	-95.9917345
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	Tlachicon	15.7278289	-96.7093443
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	Minaltepec	15.964289	-97.2486042
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	San Isidro	15.9503235	-97.265359
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	Rio Grande	16.0097391	-97.4540842
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	Rio Grande	16.0153711	-97.4757749
C.papaya	Cultivo	Maradol	Oaxaca	San José estancia grande	16.3358544	-98.210606
C.papaya	Cultivo	NA	Veracruz	Jicaro	18.6105476	-96.219548
C.papaya	Cultivo	NA	Veracruz	Jicaro	18.6100158	-96.218898
C.papaya	Cultivo	Tainung	Yucatan	X-EB	20.905676	-88.190071

Anexo 1.3 Coordenadas geográficas de las muestras colectadas por la Dra. Mariana Chávez Pesqueira de la Unidad Académica de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

1 Cultivos

Especie	Tipo	Variedad	Estado	Localidad	Latitud	Longitud
C.papaya	Cultivo	NA	Campeche	Nilchi	19.8836972	-90.2517833
C.papaya	Cultivo	NA	Campeche	Suc Tuc	19.7497528	-90.1515583
C.papaya	Cultivo	NA	Yucatan	Santa Clara	21.3142278	-89.0720444
C.papaya	Cultivo	NA	Yucatan	Temax	21.1762833	-88.937558

2 Traspacios

Especie	Tipo	Variedad	Estado	Localidad	Latitud	Longitud
C.papaya	Traspatio	variedad larga	Yucatan	Libre Union	20.7064806	-88.8096389
C.papaya	Traspatio	variedad larga	Yucatan	Xocen	20.5990389	-88.1633333
C.papaya	Traspatio	variedad larga	Quintana Roo	Tixcacal Guardia	19.8433833	-88.1353056
C.papaya	Traspatio	variedad larga	Quintana Roo	Xhazil	19.8409917	-88.0751806

Anexo 2

Variedades nativas colectadas en traspatios y puntos de colecta de estas.

Variedad	Estados	N individuos colectados	Coordenadas
Amameyada	Veracruz	8	17.88354 -94.96022
	Oaxaca	10	15.995934 -95.70552
Amarilla	Oaxaca	5	15.839538 -95.96999 15.737269 -96.48161
Criolla	Oaxaca	20	15.99395 -95.70451 15.73544 -96.34011 15.83528 -95.97044