



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA

HIBRIDACIÓN ENTRE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS DE
CUCURBITA PEPO* Y LA PLANTA SILVESTRE *CUCURBITA ARGYROSPERMA

SORORIA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ROGELIO CRUZ REYES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y
SUSTENTABILIDAD, UNAM. ESCUELA NACIONAL DE
ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO CASAS FERNÁNDEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y
SUSTENTABILIDAD, UNAM

DR. DANIEL PIÑERO DALMAU

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MORELIA, MICH., MÉXICO.

SEPTIEMBRE, 2016.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de, Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 20 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **CRUZ REYES ROGELIO** con número de cuenta **507020167**, con la tesis titulada "**Hibridación entre organismos genéticamente modificados de *Cucurbita pepo* y la planta silvestre *Cucurbita argyrosperma sororia***", dirigida por el **Dr. Mauricio Ricardo Quesada Avendaño**.

Presidente: Dr. Rafael Lira Saade
Vocal: Dra. Lorena Ashworth
Secretario: Dr. Alejandro Casas Fernández
Suplente: Dr. Germán Ávila Sakar
Suplente: Dr. Jorge Arturo Lobo Segura

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de septiembre de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme conocer y profundizar en los detalles del quehacer científico.

Al programa de apoyo PAPIIT (IN212714) de la UNAM, por apoyar esta investigación, lo cual permitió realizar las actividades de campo y de laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento (CONACyT; 174071/131008) y por el apoyo dentro del programa de becas nacionales de posgrado (207101). Al Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica para Conservación de Recursos Genéticos (2015-2-250996). A la Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación por el permiso otorgado para el uso del cultivo GM de *C. pepo* (0330, 0390, 02034). Al Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, IIES-UNAM, y a la Escuela Nacional de Estudios Superiores, ENES Unidad Morelia de la UNAM.

Al Dr. Mauricio Quesada Avendaño, como mi tutor; al Dr. Daniel Piñero Dalmau y al Dr. Alejandro Casas Fernández como miembros del Comité Tutorial.

Al Dr. Germán Ávila porque su ayuda en la culminación de este trabajo fue fundamental, mil gracias!

Al Dr. Mauricio Quesada por permitir formar parte de su laboratorio y dejarme aprender del proceso científico. Gracias por tu apoyo Mauricio.

Al Dr. Ken Oyama por todo el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización del experimento.

A **todos** los integrantes y anexos del laboratorio de Ecología Evolutiva y Conservación de Bosques Tropicales porque su ayuda y convivencia día a día fueron importantísimas para iniciar, realizar y finalizar este trabajo. Mil gracias: Adela, Fernando, Flor, Francisco, Gloria, Gume, Iris, Isadora, Jacob, Jonathan, José, Karman, Lucero, Luis, Manuel, Mariana, María de Jesús, Martha, Martín, Mauricio, Natalia, Octavio, Oliverio, Omar, Roberto, Silvia, Yuni, Yvonne y todos los servicios sociales de la UMSNH.

Con todo mi cariño a mis grandes, grandes amores:

Gustavo, Elizabeth y Minerva

A mi familia, con un profundo agradecimiento por lo todo el esfuerzo que hicieron, el apoyo y el cariño que me tienen. Gracias familia: Tata, Toto, Zorr, Ané, Lena, Man,

Aneya, Juancho, Cris y la Rorra!!

ÍNDICE

Índice.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	9
Introducción General.....	11
Artículo Científico.....	17
Capítulo I. Cultivos Genéticamente Modificados y los Centros de Origen y Domesticación de Plantas.....	30
Literatura citada.....	49
Capítulo II. Hibridación entre Cultivares Transgénicos de <i>Cucurbita pepo</i> y el Pariente Silvestre <i>Cucurbita argyrosperma</i> ssp. <i>sororia</i>	58
Literatura citada.....	102
Capítulo III. Incidencia de virus en poblaciones naturales de <i>Cucurbita</i> <i>argyrosperma</i> ssp. <i>sororia</i>	108
Literatura Citada.....	128
Discusión General y Conclusiones.....	134
Literatura Citada.....	138

RESUMEN

La siembra de cultivos genéticamente modificados (GM) con tolerancia a herbicidas, con resistencia a insectos plaga o resistencia a enfermedades incrementó a nivel mundial en las últimas dos décadas. Sin embargo su liberación puede implicar riesgos como la generación de súper malezas resistentes a herbicidas, el escape de secuencias transgénicas hacia los parientes silvestres o hacia las razas locales del cultivar modificado. Este último riesgo puede ser importante en los centros de origen y domesticación de cultivos, porque allí pueden crecer algunos parientes silvestres con los que puede ocurrir flujo génico. Primero, presento una revisión bibliográfica sobre la evaluación del riesgo de escape de transgenes hacia parientes silvestres, particularmente en los sitios centro de origen de algunos cultivos importantes. La liberación de organismo GM es controversial y compleja, en parte por los aspectos biológicos y de regulación que la integran. Involucra aspectos biológicos como el proceso de hibridación, del cual no conocemos los detalles de la integración de dos genomas en los individuos híbridos. Ignoramos el efecto de la persistencia del transgene en poblaciones silvestres, si el sitio de inserción -junto con los genes del domesticado- ocurre en una u otra zona del genoma silvestre. Este desconocimiento alimenta la incertidumbre en la predicción de una posible introgresión del transgene. Involucra también el ámbito regulatorio sobre el uso de los cultivos GM, no existe un consenso sobre la metodología de evaluación del riesgo, ni en la definición de daño ambiental. Queda claro que los híbridos y retrocruzantes son importantes para el análisis de riesgo y que en ellos se debe centrar la evaluación del escape, sin embargo para algunos parientes silvestres de cultivos GM, no existen evaluaciones de riesgo en sus sitios centro de origen.

Después, muestro los resultados de un experimento de polinización controlada entre un cultivar de calabaza (*C. pepo*) modificado con resistencia a virus y una calabaza

silvestre (*C. argyrosperma* ssp. *sororia*). Muestro la evaluación del patrón de herencia del transgene y el desempeño vegetativo y reproductivo de dos generaciones de híbridos y una generación de retrocruzantes. Resultado de esos cruzamientos encontré que esta calabacita silvestre -aunque no es el pariente directo del cultivar modificado-, produce híbridos. Los híbridos tanto de la primera como de la segunda generación, heredaron el transgene de resistencia a virus, pero con un desvío de la proporción esperada. En contraste, en la primera generación de retrocruzantes la herencia del transgene se ajustó al modelo mendeliano de herencia. El desempeño vegetativo y reproductivo de los híbridos fue bajo, pero hubo individuos fértiles tanto en la función masculina como en la femenina. Así en caso de escape, la persistencia del transgene de resistencia a virus estaría reforzada por la herencia del transgene, pero disminuida por el desempeño de los híbridos.

Finalmente, expongo que si los virus del ZYMV, WMV y el CMV son un factor de selección en poblaciones de *C. argyrosperma* ssp. *sororia*, su presencia favorecerá la persistencia del transgene de resistencia. Sin embargo no hay información sobre la incidencia de virus en estas poblaciones naturales. Para tener un mejor contexto sobre la posible introgresión de secuencias transgénicas en las poblaciones silvestres de estas calabacitas, realicé un estudio de tres años sobre la incidencia de virus. Encontré que de los tres virus que resiste el cultivar modificado de *C. pepo*, únicamente el ZYMV está presente en las poblaciones silvestres de esta calabacita. Registré como éste y otro par de virus (SqMV y el PRSV) son huéspedes comunes de la calabacita silvestre. Futuros trabajos sobre la introgresión del transgene de resistencia a virus deberían considerar la interacción entre la secuencia transgénica de resistencia a virus y el virus del ZYMV en *C. argyrosperma* ssp. *sororia*.

ABSTRACT

The sowing of genetically modified (GM) crops with herbicide tolerance, insect resistance pest or disease resistance increased worldwide over the past two decades.

However their release involves risks to the environment, an important risk is the escape of transgenic sequences to wild relatives or landraces. Risk assessment is a priority for sites centers of domestication and origin of crops, because they have wild relatives. First, I present a literature review on risk assessment escape to wild relatives. There, I describe how the release is a controversial and complex issue, partly due to biological aspects and norms regulation that includes. It implies hybridization, a process that we do not fully understand, specifically at interaction between two different genomes and the consequence of transgene insertion site. Predicting a possible introgression of transgene in a wild population has a large margin of uncertainty. This affects the regulatory aspect, in which there is no consensus on the evaluation and definition of environmental damage. Hybrids and backcrosses are important in escape of transgene, risk assessment is focused in them. However for some GM crops there are no risk assessments in the centers of origin and domestication until recently.

Subsequently, I present results of an experiment of controlled pollination between a cultivar of pumpkin (*C. pepo*) modified with virus resistance and a wild pumpkin (*C. argyrosperma* ssp. *sororia*) whose center of domestication is Mexico. I evaluated the inheritance pattern of transgene and performance of two generations of hybrids and one generation of backcrosses. Although this wild squash is not direct wild relative of modified zucchini, hybrids of first and second generation inherited the transgene, but with deviations from the expected proportion. In contrast in the first generation of backcrosses, inheritance of transgene adjusted to mendelian model. Although performance (vegetative and

reproductive) of hybrids was low, there were fertile individuals both in male and female function. So, if escape of transgene of virus resistance occurs, their persistence would be reinforced by inheritance mode, but diminished by the performance of hybrids.

Finally I describe a studio of virus incidence in wild populations of gourds. If viruses ZYMV, WMV and CMV are a factor of natural selection in *C. argyrosperma* ssp. *sororia*, their presence will to favor the persistence of transgene of resistance in the wild population. However there is no information of incidence of viruses in these wild populations. To get a context on the possible introgression of transgenic sequences in wild populations of gourds, I did an evaluation of incidence of viruses in wild populations of gourds through three years. Of the three viruses that resist the GM cultivar of *C. pepo*, only ZYMV is present in wild populations of gourds. Other two viruses (SqMV and PRSV) are common hosts of this wild squash. Future works on transgene introgression of resistance to viruses should be considering interaction between transgenic sequence and the ZYMV virus in *C. argyrosperma* ssp. *sororia*.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los organismos transgénicos tienen una importancia creciente tanto en la agricultura como en la economía mundial (Qaim 2009, Lemaux 2009). En el año 2013 se estimó, que había alrededor de 148 millones de hectáreas con cultivos transgénicos en todo el mundo, incluyendo países industrializados como en vías de desarrollo (James 2013). Para el año 2009 se calculó que el valor del mercado de las semillas transgénicas llegó a los 10,500 millones de dólares (James 2009). El aumento del área agrícola con cultivares transgénicos a nivel mundial es constante desde 1996. Los países subdesarrollados son usuarios importantes de esta biotecnología; alrededor del 90% de los campesinos que utilizan cultivos transgénicos se encuentran en países en vías de desarrollo (James 2009, Marshall 2009).

Además de los principales cultivos modificados con ingeniería genética o transgénicos utilizados en el mundo como la soya, el maíz, el algodón y la canola, existen otros cultivos modificados mediante ingeniería genética como la papaya, el tomate, alfalfa y la calabaza (James 2015). México ocupa el 16° lugar mundial en superficie dedicada al cultivo de transgénicos con 0.1 millones de hectáreas (James 2015), principalmente por cultivos de maíz, algodón y soya. En los últimos 20 años se autorizaron experimentalmente 31 diferentes cultivares de transgénicos como la papa, el jitomate o la calabaza. Las características que se ofertan en el mercado de los cultivos transgénicos comprenden la tolerancia a herbicidas, la resistencia contra herbívoros, la resistencia contra virus (James 2009).

El uso de organismos genéticamente modificados, generó inquietudes científicas respecto a posibles riesgos a la salud, riesgos agronómicos y ecológicos, tales inquietudes resultaron en el desarrollo de un cuerpo regulatorio y legislativo acerca de su uso comercial

(Nap et al. 2003). Los posibles riesgos ecológicos incluyen los efectos (directos e indirectos) sobre organismos no blanco, la posibilidad de escape hacia parientes silvestres (Pilson y Prendeville 2004). Algunos posibles efectos directos de los cultivos GM o del transgene involucran su establecimiento fuera del área de liberación, generando daño al convertirse en malezas o plagas, o al invadir nuevos ambientes ya sea como poblaciones ferales de plantas GM o por la incorporación del transgene a poblaciones silvestres (Wolfenbarger y Phifer 2000, Dale et al. 2002, Pilson y Prendeville 2004). Por ejemplo, cultivos GM tolerantes a herbicidas pueden transferir el transgene a los parientes silvestres y convertirlos en malezas (Pilson y Prendeville 2004). Por otra parte los herbívoros o patógenos de algún cultivo pueden desarrollar resistencia hacia la característica transgénica por un proceso de selección natural, en condiciones de exposición constante ante la variedad GM (Snow y Moran 1997). También se piensa que la presencia del cultivares GM en el ambiente puede favorecer la formación de nuevos patógenos; por ejemplo la resistencia a virus (Tepfer 2002). Adicionalmente la resistencia transgénica a patógenos o herbívoros puede alterar la estructura de la comunidad, al reducir el tamaño poblacional de los organismos blanco (Pilson y Prendeville 2004). El flujo de transgenes puede ocurrir con las poblaciones naturales emparentadas o con razas de cultivos convencionales, lo cual podría reducir la diversidad genética (Gepts y Papa 2003, Andow y Zwahlen 2006). Como efectos indirectos se consideran las afectaciones sobre los organismos que no son el blanco del transgene. La expresión del transgene puede influir sobre especies que son benéficas para el cultivo, como los polinizadores o los parasitoides que ayudan a regular la densidad de las plagas (Andow y Zwahlen 2006, Romeis et al. 2006).

Una de las primeras variedades de calabacita transgénicas liberadas comercialmente hace más de 10 años en EUA expresaban genes de resistencia contra dos virus. Sobre los riesgos ecológicos de esa calabaza GM tipo zucchini con resistencia a virus, el

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos concluyó en 1994, que era poco probable que el transgene insertado en *Cucurbita pepo* persistiera en las poblaciones naturales de esa calabaza (USDA 1994). Sin embargo esa evaluación no incluye a otros parientes silvestres de esa calabaza, que se distribuyen fuera de los Estados Unidos (NRC 2002).

En México se distribuyen varias especies silvestres emparentadas con las calabazas (Merrick 1990, Sanjur et al. 2002). Aquí, las calabazas además de la importancia alimentaria-económica -se siembra en una área aproximada de 18,000 hectáreas, (SIAP-SAGARPA 2013)-, tienen importancia etnobotánica (Lira-Saade 1995) y ecológica debido a la estrecha relación con sus herbívoros y sus polinizadores (Hurd Jr. et al. 1971, Metcalf et al. 1982). Adicionalmente, los parientes silvestres representan una fuente de variación genética de los cultivares de calabazas (Merrick 1990).

En la actualidad, en muchas partes de México se siguen utilizando técnicas tradicionales de cultivo de calabaza (Montes-Hernández et al. 2005), pero también existe un sector que tiene interés por sembrar organismos genéticamente modificados (Acevedo 2008). Desde el año 1993 hasta el año 2013 el gobierno mexicano aprobó 561 permisos de pruebas o liberaciones ambientales de organismos genéticamente modificados, de los cuales 19 ensayos fueron realizados con calabazas transgénicas con resistencia a virus (CIBIOGEM 2013).

Si ocurre una liberación comercial de calabazas transgénicas en México, sería razonable esperar que concurren poblaciones silvestres de calabazas y los cultivares transgénicos; una posible consecuencia de ello sería el flujo génico (Arriaga et al. 2006). El destino y el efecto que tendrían las secuencias transgénicas en poblaciones de parientes silvestres, en los sitios centro de origen no están totalmente aclarados (NRC 2002, Gepts y Papa 2003). En este trabajo intento aportar información sobre el riesgo de escape del

transgene de resistencia a virus en el centro de origen y domesticación del género *Cucurbita*.

En el primer capítulo hago una breve revisión sobre el posible escape de secuencias transgénicas hacia los parientes silvestres, considerando algunos casos de plantas modificadas y su condición de uso en su respectivo centro de origen. En el segundo capítulo presento los resultados de un detallado experimento que comprendió una serie de cruces controladas entre una calabaza GM (*Cucurbita pepo*) con resistencia a virus y una calabaza silvestre no directamente emparentada (*C. argyrosperma* ssp. *sororia*) comúnmente distribuida en el sitio centro de domesticación de las calabazas. Con los resultados obtenidos discuto, la posible persistencia de transgene de resistencia a virus en las poblaciones del pariente silvestre. Finalmente, en el tercer capítulo presento datos sobre la incidencia (proporción de individuos infectados en una población) de cinco virus en las poblaciones de la calabaza silvestre (*C. argyrosperma* ssp. *sororia*) y discuto cómo esto puede influir en la persistencia del transgene en esas poblaciones silvestres en un supuesto caso de escape.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, F. 2008. La bioseguridad en México y los organismos genéticamente modificados, cómo enfrentar un nuevo desafío. Capital Natural de México, Volumen II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México D.F.
- Arriaga, L., E. Huerta, R. Lira-Saade, E. Moreno, y J. Alarcón. 2006. Assessing the risk of releasing transgenic *Cucurbita* spp. in Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112:291–299.
- CIBIOGEM. 2013. Liberación al ambiente de Organismos Genéticamente Modificados. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/liberaciones-al-ambiente-por-cultivo-anual>
- Fuchs, M., y D. Gonsalves. 2007. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review of Phytopathology* 45:173–202.
- Gepts, P., y R. Papa. 2003. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Environmental Biosafety Research* 2:89–103.
- Hurd Jr., P. D., E. G. Linsley, y T. W. Whitaker. 1971. Squash and Gourd Bees (*Peponapis*, *Xenoglossa*) and the Origin of the Cultivated *Cucurbita*. *Evolution* 25:218–234.
- James, C. 2009. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA, Ithaca, NY.
- James, C. 2013. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA, Ithaca, NY.
- James, C. 2015. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA, Ithaca, NY.
- Lemaux, P. G. 2009. Genetically engineered plants and foods: a scientist's analysis of the issues (part II). *Annual Review of Plant Biology* 60:511–59.
- Lira-Saade, R. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica. IPGRI, Rome Italy.
- Marshall, A. 2009. 13.3 million farmers cultivate GM crops. *Nature Biotechnology* 27:221.
- Merrick, L. C. 1990. Systematics and evolution of a domesticated squash, *Cucurbita argyrosperma*, and its wild and weeds relatives. Páginas 77–95 en R. W. R. y C. J.

- D.M. Bates, editores. *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca.
- Metcalf, R. L., A. M. Rhodes, R. A. Metcalf, J. Ferguson, E. R. Metcalf, y P.-Y. Lu. 1982. Cucurbitacin contents and diabroticite (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding upon *Cucurbita* spp. *Environmental Entomology* 11:931–937.
 - Montes-Hernández, S., L. C. Merrick, y L. E. Eguiarte. 2005. Maintenance of Squash (*Cucurbita* spp.) landrace diversity by farmers activities in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:697–707.
 - Nap, J.-P., P. L. J. Metz, M. Escaler, y A. J. Conner. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part I. Overview of current status and regulations. *The Plant Journal* 33:1–18.
 - NRC. 2002. Environmental effects of transgenic plants: The scope and adequacy of regulation. The National Academies Press.
 - Pilson, D., y H. R. Prendeville. 2004. Ecological effects of transgenic crops and the escape of transgenes into wild populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35:149–174.
 - Qaim, M. 2009. The economics of genetically modified crops. *Annual Review of Resource Economics*. 1: 665-693.
 - Sanjur, O. I., D. R. Piperno, T. C. Andres, y L. Wessel-Beaver. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:535–40.
 - SIAP-SAGARPA. 2013. Cultivos de interés. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=114&Itemid=72.
 - USDA. 1994. Response to the Upjohn Company/Asgrow Seed Company petition 92-204-01 for determination of nonregulated status for ZW-20 Squash. Washington, DC, USDA.

Experimental assessment of gene flow between transgenic squash and a wild relative in the center of origin of cucurbits

ROGELIO CRUZ-REYES,^{1,2} GERMÁN ÁVILA-SAKAR,^{2,3}
GUMERSINDO SÁNCHEZ-MONTOYA,² AND MAURICIO QUESADA^{2†}

¹Unidad Académica en Desarrollo Sustentable, Universidad Autónoma de Guerrero, Tecpan, Guerrero 40900 México

²Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica para la Conservación de los Recursos Genéticos, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, and Instituto de Investigaciones de Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia Michoacán 58190 México

³Department of Biology, The University of Winnipeg, Winnipeg, Manitoba R3B 2E9 Canada

Citation: Cruz-Reyes, R., G. Ávila-Sakar, G. Sánchez-Montoya, and M. Quesada. 2015. Experimental assessment of gene flow between transgenic squash and a wild relative in the center of origin of cucurbits. *Ecosphere* 6(12):248. <http://dx.doi.org/10.1890/ES15-00304.1>

Abstract. The introgression of modified genetic sequences (transgenes) into wild populations hinges on the generation of viable and fertile hybrids from crosses between transgenic cultivars and their wild relatives. We assessed the risk of escape of a gene construct that confers resistance to three viruses (ZYMV, WMV, CMV) from a transgenic zucchini (*Cucurbita pepo*) to *Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia*, a wild relative at the center of origin of the genus in Mexico. We experimentally generated first and second generation hybrids, as well as backcross progeny (BC), and evaluated their performance. The virus-resistance transgene was successfully inherited into both hybrid generations and also to BC progeny from the crosses of hybrids with the wild relative. The transgene generally followed Mendelian inheritance as a dominant trait. Both hybrid generations and the BC progeny had lower reproductive output compared to the wild parent. Given that the hybrid and BC progeny were viable and fertile, the escape and persistence of the transgene is possible via wild populations of *C. argyrosperma* ssp. *sororia*. This information is essential for biosafety policy in Mexico—center of origin and diversification of several crops—where the liberation of genetically modified plants is currently under approval, and risk assessment is necessary.

Key words: biosafety; biosecurity; *Cucurbita*; GMO; hybrid performance; introgression; plant breeding; pollen flow; transgene inheritance; transgenic crop.

Received 24 May 2015; **accepted** 2 June 2015; **published** 8 December 2015. Corresponding Editor: D. P. C. Peters.

Copyright: © 2015 Cruz-Reyes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

† E-mail: mquesada@cieco.unam.mx

INTRODUCTION

Over the last two decades several developed countries have approved the release of genetically modified (GM) varieties of more than 10 agricultural species. Today, more than 175 million hectares have been planted with GM crops worldwide (James 2013). Most commonly, GM crops have received genetically engineered sequences (transgenes) that confer them with

tolerance to herbicides and resistance to herbivores and viruses (James 2013). The dispersion of transgenes into wild relatives from GM crops may represent an ecological risk, especially for relatives located on the sites of origin and diversification of cultivars (Gepts and Papa 2003, Snow et al. 2005, Ellstrand et al. 2013).

Mexico has approved the experimental planting of GM squash (*Cucurbita pepo*) with transgenes conferring resistance to three common

viruses (*public communication*; <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/liberaciones-al-ambiente-por-cultivo-anual>). Because cultivated squash is inter-fertile with several important wild *Cucurbita* taxa in Mexico and because gene flow from cultivated to wild *Cucurbita* is common (Merrick 1990, Wilson 1990), transgene escape may generate hybrids with potential invasiveness due to their resistance to viruses (Snow et al. 2005). The potential for transgene-acquired invasiveness takes on relevance in the light of documented cases of transgene escape, as in herbicide-resistant canola (*Brassica napus*; Warwick et al. 2008), creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*; Reichman et al. 2006), insect-resistant cotton (*Gossypium hirsutum*; Wegier et al. 2011) and maize (*Zea mays*; Quist and Chapela 2001, Piñeyro-Nelson et al. 2009), but evidence of the association between transgene escape and weediness is limited.

Gene flow between crops and their wild ancestors is a commonplace phenomenon that may allow the introgression (permanent incorporation) of transgenes from GM cultivars to their wild relatives (Stewart et al. 2003, Kwit et al. 2011, Ellstrand et al. 2013). The introgression of transgenes into wild populations involves gene flow from a transgenic crop to a wild relative through hybridization, backcrossing, and selection (Wolfenbarger and Phifer 2000, Stewart et al. 2003, Chapman and Burke 2006, Kwit et al. 2011). The initial escape of a transgene into a wild population may occur via pollen or seeds. Further spread and establishment of the transgene in the wild population depends on the fitness of the transgenic hybrids and backcross (BC) progeny relative to the wild-type plants (Stewart et al. 2003, Hooftman et al. 2008). Additionally, successful transgene introgression requires that the transgene remain functional as it is inherited across generations (Dale 1994, Dietz-Pfeilstetter and Kirchner 1998).

Gene flow is contingent upon the spatial and temporal overlap in flowering between the GM cultivar and the wild plants (Wolfenbarger and Phifer 2000, Stewart et al. 2003). Low hybrid fitness (hybrid breakdown) is a common barrier to gene flow among species (Arnold et al. 1999, Burke and Arnold 2001), and therefore, it could be the main impediment to the spread of transgenes. However, hybrids formed from the

cross between varieties of the same species (or across species) could have equal or greater fitness (heterosis) than the parents (Arnold and Hodges 1995, Burke and Arnold 2001). Clearly, the persistence of an escaped transgene in a wild population depends on the fitness of the hybrid progeny (Hails and Morley 2005).

Disease-resistance transgenes could confer hybrids with selective advantage over wild-type plants, especially under conditions of high disease incidence. Such an adaptive advantage would increase the potential of introgressed plants to become weeds, which could be the case of the hybrid progeny resulting from crosses between the Liberator III transgenic zucchini, genetically engineered for resistance against three common viruses and wild squashes (Tricoll et al. 1995, Laughlin et al. 2009). After deregulating transgenic *Cucurbita* in the USA in 1996 (NRC 2002), the cultivation of this agricultural species has potentially allowed for the introgression of transgenes into wild relatives in the USA (NRC 2002) and in Mexico—center of origin, diversification, and domestication of *Cucurbita* (Whitaker and Bemis 1964, Hurd et al. 1971, Sanjurjo et al. 2002). Eleven taxa of wild *Cucurbita* occur within close physical proximity of agricultural fields throughout Mexico (Lira-Saade 1995), and gene flow between wild and domesticated squashes has been documented already (Montes-Hernández and Eguiarte 2002). Thus, the conditions for the escape of transgenes exist. Transgene escape may have negative consequences for conservation and biodiversity if hybridization between GM crops and their wild relatives results in the development of invasive plants (Wolfenbarger and Phifer 2000, Pilson and Prendeville 2004), or if the transgene increases the transmissibility or virulence of the pathogen (Tepfer 2002, Pilson and Prendeville 2004). On the other hand, transgene escape could be innocuous to the environment if transgenic hybrids are unable to persist in nature.

Here we present an experimental study of hybridization between the transgenic zucchini cultivar Liberator III, and a wild cucurbit that is not the closest relative of the cultivar, but is widely distributed in Mexico: *Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia* (Merrick 1990). Our main objective was to assess the transmission, via pollen, of a virus resistance transgene (VRT)

from transgenic zucchini (*Cucurbita pepo*) to experimental populations of its wild relative (*C. argyrosperma* ssp. *sororia*) at the center of origin of the genus. We assessed transgene inheritance in F₁ and F₂ hybrids, and BC progeny, and evaluated performance in each generation under greenhouse and field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Parental species

In order to study the inheritance of the transgene across species, we generated F₁ hybrids from crosses between cultivated Virus Resistant Transgenic (VRT) *Cucurbita pepo* L. as pollen donors and wild *C. argyrosperma* ssp. *sororia* as recipients because gene flow is more likely to occur via pollen flow into wild populations. Moreover, this cross is the only one that produces hybrid progeny in matings between *C. argyrosperma* and *C. pepo* (Merrick 1990). Permits needed for this study with GM zucchini in Mexico were granted by SAGARPA (0330, 0390, 02034).

The Liberator III crookneck squash (Seminis, San Louis, Missouri, USA) cultivar is a commercially available transgenic zucchini cultivar (*C. pepo* ssp. *pepo*) with coat protein-based resistance to three of the most common viruses on cultivated squash: zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), watermelon mosaic virus (WMV), and cucumber mosaic virus (CMV). The VRT construct contains the promoter 35S of the cauliflower mosaic virus and the neomycin phosphotransferase gene (NPT II) as a marker; and it is inherited hemizygotically (Tricoll et al. 1995). All three viruses have a worldwide distribution and seem to have an important anthropogenic dispersal component (Lecoq et al. 1998, Simmons et al. 2008), and preliminary data show that at least ZYMV is present in wild populations of cucurbits associated to rural human settlements (R. Cruz-Reyes; unpublished data) and may have detrimental effects on plant fitness (Sasu et al. 2009).

Cucurbita argyrosperma ssp. *sororia* (L. H. Bailey), one of several widespread wild taxa that could harbor transgenes escaped from GM zucchini, occurs in disturbed areas along seasonal streams and near agricultural lands in Mexico and Central America (Merrick 1990). For this

study, we used seeds from nine natural populations obtained from the Chamela region in Jalisco, Mexico (Appendix A: Table A1).

The two parental species are part of a complex of wild-domesticated species within which there is ample gene flow (Wilson 1990). *C. argyrosperma* ssp. *sororia* is the most genetically distant species of the clade that includes *C. pepo* ssp. *pepo*, *C. argyrosperma* ssp. *argyrosperma*, and *C. moschata*. Both species are diploid ($n = 20$), monoecious, protandric, self-compatible annuals. *C. pepo* ssp. *pepo* has short internodes, and therefore a more compact habit compared to *C. argyrosperma*, which is a vine (Merrick 1990, Singh 1990).

Inheritance of the transgene

During the summer of 2007, we conducted manual pollinations on 110 wild plants grown in an experimental plot at the Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad UNAM, in Morelia, Michoacán. Transgenic plants were grown inside a greenhouse to impede any uncontrolled flow of transgenic pollen. One day before anthesis, we twist-tied the corollas of staminate and pistillate flowers to prevent pollinator visitation. Upon anthesis, we removed the pollen of a minimum of five transgenic pollen donors, and mixed it up in a plastic container. We repeated the above procedure using pollen from five wild donors. Pollen from these containers was then used to conduct the experimental pollinations to produce F₁ progeny.

We conducted the following hand pollination treatments: (1) saturation of the stigmata of wild plants using only transgenic pollen (SAT), (2) mixed pollen loads in either a 15:1, 7:1, or a 3:1 transgenic:wild pollen ratio (Appendix A: Table A2). We chose these ratios because crosses between these two species invariably favor siring by conspecific pollen (Quesada et al. 1993, 1995, 1996). Because of hemizygotic inheritance, only half of the pollen produced by transgenic plants is expected to carry the transgene. Pollen mixtures delivered roughly 300 pollen grains in total (285 ± 52 [mean \pm SE] transgenic and 18 ± 6 wild pollen grains for the 15:1 mixture, 261 ± 42 transgenic and 36 ± 11 wild grains for the 7:1 mixture, and 239 ± 23 transgenic and 75 ± 11 wild grains for the 3:1 mixture). We used the flat tips of metal rods of different diameters in order

to deliver precise amounts of pollen for all mixtures. Ovaries of recipients contained 262 ± 34 ovules, and therefore the loads we used were sufficient to fertilize most ovules in the ovary (Quesada et al. 1993). Recipient flowers were labeled and seeds (F_1) from the resulting fruits were extracted and counted. In 2008, we grew a sample of 30 F_1 progeny from each recipient to assess performance of families, screen them for the presence of the transgene, and use them to obtain F_2 and BC progeny (Appendix A: Table A2; Appendix B). F_1 progeny that carried the transgene are hereafter referred to as F_1 VRT.

In order to generate F_2 progeny, we conducted two hand pollination treatments: (1) F_1 non-VRT as pollen recipients and F_1 VRT plants as pollen donors (F_1 non-VRT \times F_1 VRT); (2) F_1 VRT plants as both pollen donors and recipients (F_1 VRT \times F_1 VRT). Since we were also interested in the persistence of transgenes through backcrossing, we generated two kinds of backcrosses: (1) F_1 VRT as pollen recipients and wild plants as donors (F_1 VRT \times W); (2) wild recipients and F_1 VRT hybrids as donors (W \times F_1 VRT). For all these pollinations, we saturated the stigmata of recipients with the corresponding pollen (no mixtures were used, Appendix A: Table A2). We assessed the performance of F_2 progeny in an experimental plot.

We evaluated the performance of hybrids and BC progeny in comparison with that of the parental lines (wild and VRT) in terms of the following variables: proportion of seeds that germinated, proportion of plants that survived to reproductive age (census conducted at the middle of the reproductive season), days to emergence, leaf area at day 14 (after emergence), staminate and pistillate flower production, and pollen viability (as measured by its stainability with Alexander's green). For consistency with data from F_2 progeny, we only assessed performance on the F_1 generated by means of the stigma saturation pollination treatment.

Seeds for all generations were first germinated in a growth chamber and later transplanted to an agricultural plot (Appendix B). Performance was assessed the first year for the parental lines, the second year for the F_1 and the third year for the F_2 and BC progeny using the same experimental plot every year (see planting design details in Appendix B).

Detection of the transgene

All plants in our study (parentals, F_1 , F_2 , and backcrosses) were screened for the presence of the VRT using the expression of NPTII and the promoter 35S of the cauliflower mosaic virus (P-35S CaMV) as indicators of VRT presence and functionality (Tricoll et al. 1995, Lipp et al. 1999; see molecular analyses in Appendix B).

Genetic and statistical analyses

We tested for Mendelian inheritance of the VRT overall, and among families (Appendix A: Table A3) within each type of cross by means of a G goodness-of-fit test, assuming the VRT to be hemizygotic (Sokal and Rohlf 1995, Tricoll et al. 1995). Expected ratios for F_1 progeny were: 1:1 VRT: non-VRT for the saturation treatment, and 15:1, 7:1, and 3:5 VRT: non-VRT for the 15:1, 7:1, and 3:1 mixtures, respectively (Appendix A: Table A2). The asymmetry between pollen loads simulates a scenario where a large plot of transgenic plants is surrounded by a wild population, thus promoting a higher frequency of pollen grains from the domesticated crop than wild ones on stigmata of plants near the plot. Additionally, a previous study on these species with similar loads found conspecific fertilizations to be more successful than heterospecific ones (*unpublished data*). Since we only used the saturation treatment to produce the F_2 progeny, the expected ratios for the F_2 were 1:1 VRT: non-VRT from the cross (F_1 non-VRT \times F_1 VRT), and 3:1 from the (F_1 VRT \times F_1 VRT) cross. Lastly, expected ratios for both backcrosses were 1:1 VRT: non-VRT.

We conducted a multivariate analysis of variance (MANOVA) to determine if the presence of the transgene in the F_1 generation and the type of cross used to produce it (pollination treatments: SAT, 15:1, 7:1, 3:1) resulted in differential performance among VRT and non-VRT plants. We used number and mass of seeds, days to germination, leaf area and pistillate and staminate flower production as indicators of performance. To meet assumptions of normality and homoscedasticity, the following variables were transformed as indicated: number of seeds (\log_{10}), staminate flower production ($1/\text{square root}$), mass of seeds (square root). Leaf area of seedlings was not included because no data were collected on this variable for progeny from mixed

pollen load treatments.

Similarly, we used MANOVA to test for effects of the type of cross used to produce F_2 progeny (F_1 non-VRT \times F_1 VRT or F_1 VRT \times F_1 VRT) and of the presence/absence of the transgene on days to germination, leaf area, and staminate and pistillate flower production as indicators of performance. Since backcrosses produced fewer progeny, our sample sizes were too small to conduct a MANOVA. Instead we performed univariate analyses (GLM) to test for differences between transgenic and non-transgenic progeny for both types of backcrosses (F_1 VRT \times W and W \times F_1 VRT) on days to germination, leaf area, and staminate and pistillate flower production.

Since we found no differences in vigor between transgenic and non-transgenic F_1 , F_2 and BC progeny, we used pooled data for each type of cross to compare performance among parental, F_1 , F_2 and BC progeny by means of a general linear model that tested for the effects of generation (parental, F_1 , F_2 and BC) and maternal family nested within generation followed by a priori Tukey multiple-comparison tests. To achieve model assumptions, days to germination, foliar area, staminate and pistillate flower production, and seeds per fruit were log-transformed, and seed mass was square-root transformed.

We used a chi-square test of independence to test for differences among progeny from parental, hybrid and backcrosses on seed germination, survival to reproduction, and pollen viability. We followed this analysis with an a posteriori Marascuilo multiple-comparison test for differences between progeny types in the proportion of seeds that germinated, survived to reproduction, and also for the proportion of viable pollen.

Additionally we determined reproductive rate for each type of cross from a simplified life table with data on survival to reproductive stage and fecundity through the female or male function. Fertility through the female function was calculated as seed production divided by the number of individuals that survived to reproductive stage; fertility through the male function was calculated as the product of the number of male flowers, pollen viability, and the mean number of pollen grains per male flower of *C. pepo* (28016 grains; Quesada et al. 1995) divided by the number of plants at reproductive stage. For

female fertility of the F_1 progeny derived from treatments with mixed pollen loads, we did not differentiate between the values of VRT and non-VRT plants.

RESULTS

Inheritance of the transgene

F₁ progeny.—All types of crosses produced enough seeds for an adequate analysis of the inheritance of the transgene. The inheritance of the VRT deviated from the expected Mendelian proportions for a hemizygotic gene in all four crosses used to generate F_1 hybrids ($G = 76.98$, $df = 39$, $P = 0.0003$). In the stigma saturation treatment (only VRT pollen used), we expected a 1:1 transgenic:wild phenotype ratio. Similarly for the pollen mixture treatments, observed ratios differed significantly from theoretical ratios (Fig. 1A).

Overall, we observed a deficit in the number of F_1 VRT progeny (Appendix C: Table C1). Moreover, as the transgenic:wild pollen ratio decreased, the absolute numerical difference between transgenic and non-transgenic progeny increased. However, significant deviations from the expected ratios did not occur in all the families (progeny derived from a single fruit). Transgene segregation was not significantly different from the expected ratios in 85% of the families in the saturation treatment, and 82%, 50%, and 35% of those in the 15:1, 7:1 and 3:1 pollen mixtures respectively ($G = 34.25$, $df = 15$, $P = 0.004$; $G = 63.03$, $df = 11$, $P = 0.000001$; and $G = 97.34$, $df = 16$, $P = 0.00001$; Fig. 1A).

F₂ progeny.—Overall, the inheritance of the VRT also deviated from the expected Mendelian ratios for F_2 progeny, regardless of the type of cross (F_1 non-VRT \times F_1 VRT or F_1 VRT \times F_1 VRT; $G = 111.48$, $df = 25$, $P = 0.00001$ and $G = 64.8$, $df = 18$, $P = 0.00001$, respectively, $P < 0.01$ for both cases; Fig. 1B). However, as in the F_1 progeny, the observed frequencies of VRT and non-transgenic F_2 progeny did not deviate significantly from the expected 3:1 Mendelian ratios in 71% of the (F_1 non-VRT \times F_1 VRT) crosses and in 63% of the (F_1 VRT \times F_1 VRT) crosses. More VRT hybrids were produced in the latter cross because both parents carried the VRT (Appendix C: Table C2).

Backcrosses.—In contrast to the previous crosses, overall the VRT segregated according to the

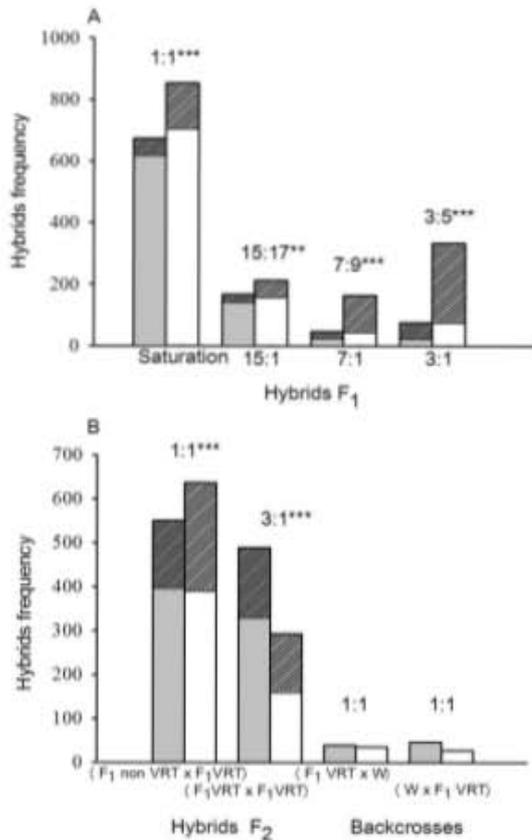


Fig. 1. Observed frequencies of (A) F₁ hybrids with (grey bar) or without (open bars) the VRT transgene, at four different loads of transgenic:wild pollen (saturation, 15:1, 7:1, 3:1); and (B) F₂ and backcrossed progeny. To generate F₂ progeny, we used F₁ non-VRT and F₁ VRT plants as recipients and F₁ VRT as donors. For the two kinds of backcrosses, F₁ VRT progeny were used as recipients or donors in crosses with wild parents. Streaks on bars indicate progeny from families that did not follow the expected Mendelian frequencies. If these areas are not taken into account, the observed phenotype frequencies approach more the expected VRT:non-VRT Mendelian frequencies. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

expected Mendelian ratios in the backcrosses. The VRT segregated according to the expected ratios in all the families regardless of the kind of cross (F₁ VRT × W, $G = 1.14$, $df = 2$, $P > 0.05$, or W × F₁ VRT, $G = 3.5$, $df = 3$, $P > 0.05$; Fig. 1B; Appendix C: Table C3).

Progeny performance

Effect of the transgene and pollen load.—We found no significant differences in performance between hybrids that inherited the transgene and those that did not among the F₁, F₂ or BC progeny (Appendix C: Tables C4 and C5). No overall effect of pollination treatment (saturation, 15:1, 7:1 and 3:1) was found either. No significant effect of the type of cross was found among the F₂ (F₁ non-VRT × F₁ VRT vs. F₁ VRT × F₁ VRT) or BC (F₁ VRT × W vs. W × F₁ VRT) progeny (Appendix C: Tables C4 and C5).

Performance of progeny and parental lines.—Having found no significant effect of having the transgene on the vegetative performance of F₁, F₂ or BC progeny, we pooled all progeny data to compare performance amongst them and also against the parental lines.

We found significant differences among the different generations in all variables examined: days to germinate ($F_{6,143} = 2.73$, $P < 0.02$), leaf area at 14 days ($F_{6,25} = 86.79$, $P < 0.0001$), staminate ($F_{6,75} = 61.48$, $P < 0.0001$) and pistillate ($F_{6,75} = 8.42$, $P < 0.0001$) flower production per plant, number of seeds per fruit ($F_{5,98} = 16.38$, $P < 0.0001$) and seed mass ($F_{6,34} = 105.33$, $P < 0.0001$; Fig. 2A–F). The effect of the maternal family nested within generation was not significant except for seed mass ($F_{6,34} = 1.64$, $P < 0.05$).

According to Tukey multiple-comparison tests among generations, F₁ hybrids took significantly longer to emerge than either of the parental lines or F₂ hybrids, and they tended to take as long to emerge as both BC progeny lines (Fig. 2A). Time to emergence of F₂ hybrids and BC progeny was longer than that of the parental lines, but only significantly so from the wild parent. Leaf area was the greatest in the VRT parent and smallest in the wild parent, with all other generations intermediate and significantly different from both parents but not amongst themselves (Fig. 2B). Pistillate flower production was the highest among the VRT parental plants, and the lowest in the F₁ progeny, with the wild parent and both F₂ lines intermediate and significantly different from the F₁ hybrids and the VRT parent. Both BC progenies were also intermediate, although given their slightly lower means, they did not differ significantly from the wild parent or the F₁ hybrids (Fig. 2C).

A similar pattern, (but reversed for the

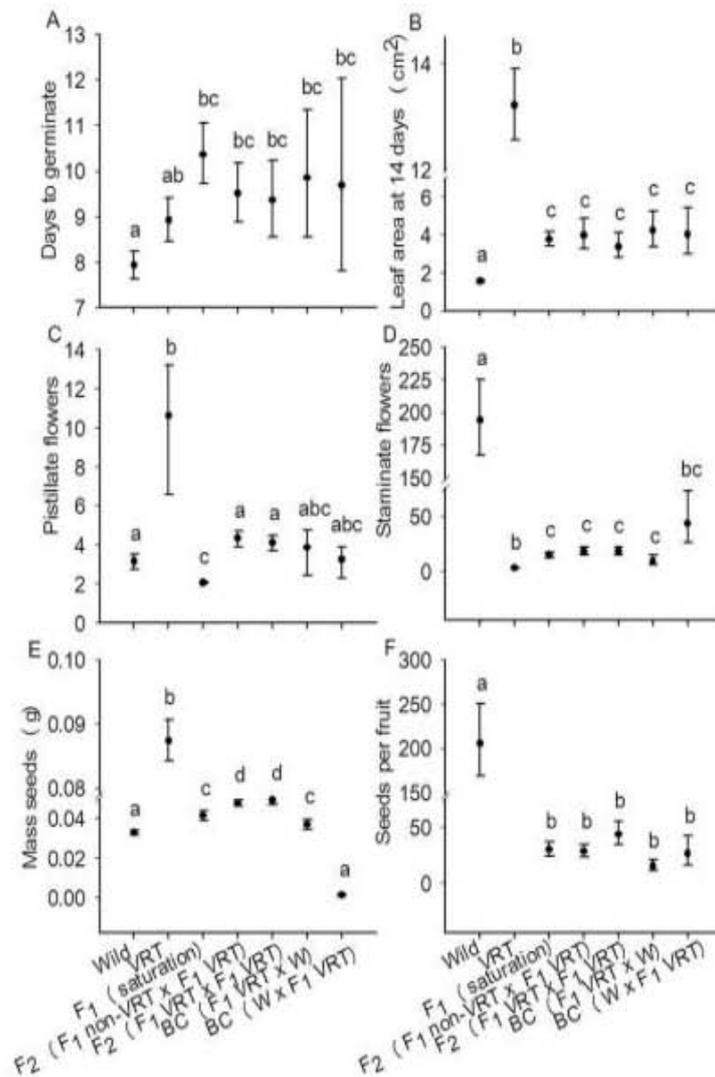


Fig. 2. Performance of parents (*C. pepo* VRT, wild *C. argyrosperma* ssp. *sororia*) and hybrids (F₁, F₂) and backcrosses. Seedling stage: (A) days to germinate ($n = 3948$) and (B) leaf area 14 days after germination ($n = 340$), reproductive stage: number of (C) female ($n = 928$) and (D) male ($n = 906$) flowers per plant, (E) average seed mass ($n = 1957$) and (F) number of seeds per fruit ($n = 148$). All values are back-transformed least-squares means \pm s.e.; means with different letters differ significantly from each other according to a Tukey-Kramer multiple comparisons procedure. We obtained legal permits to exclusively cultivate VRT *Cucurbita pepo* enclosed in greenhouses and these plants did not produce seeds because of a lack of pollinators. This is the reason for the missing data point for VRT seed number.

parental lines) is seen in staminate flower production, with extreme high and low flower production for the wild and VRT parental lines respectively and F₁ and F₂ hybrids having also low, production, but significantly greater than

VRT parentals. As for the BC progeny lines, they produced as many (F₁ VRT \times W) or more (W \times F₁ VRT) flowers as the hybrids. Notably, staminate flower production in the wild parent exceeded that of the other generations by almost

Table 1. Proportion of seeds germinated, proportion of plants that survived to reproduction, and proportion of viable pollen among parentals, hybrids (F₁, F₂) and backcrosses (BC).

Generation	Seed germination		Survival to reproduction		Pollen viability	
	<i>n</i>	Proportion	<i>n</i>	Proportion	<i>n</i>	Proportion
Wild parent	224	0.88 ^A	110	0.85 ^A	16	0.97 ^A
Transgenic parent	55	0.90 ^{AB}	55	0.54 ^B	21	0.96 ^A
F ₁	3273	0.62 ^D	1832	0.63 ^B	34	0.53 ^B
F ₂ (F ₁ non-VRT × F ₁ VRT)	1697	0.80 ^{BC}	1282	0.73 ^{AB}
F ₂ (F ₁ VRT × F ₁ VRT)	1119	0.77 ^{BC}	816	0.74 ^{AB}	14	0.60 ^C
BC (F ₁ VRT × W)	165	0.69 ^{CD}	112	0.79 ^{ABC}
BC (W × F ₁ VRT)	172	0.52 ^D	85	0.93 ^{AC}	19	0.78 ^D

Notes: Different letters indicate significant differences among proportions according to χ^2 tests. Seed germination = number of seeds germinated/number seeds sowed; survival to reproduction = number of seedlings transplanted/number of adult plants at half of reproductive stage; pollen viability = number of viable grains/number of pollen grains per sample (minimum sample of 200 grains); *n* = sample size.

one order of magnitude (Fig. 2D).

Similarly, wild parents produced almost four times more seeds per fruit than any of the other generations. No differences among progeny generations were detected for this variable (Fig. 2F). Average seed mass of hybrids was intermediate between (and significantly different from) both parental lines, although closer to that of the wild parent. Average seed mass differed significantly between the two lines of BC progeny: seeds of VRT mothers were larger than those of wild mothers. Interestingly, again, the backcross involving wild mothers produced seeds similar in mass to those of the wild parent (Fig. 2E).

Seed germination success, seedling survival and pollen viability

Overall, we detected significant differences among generations in the proportion of seeds that germinated ($\chi^2 = 286.9$, *df* = 6, $P < 0.00001$; Table 1). Germination was significantly greater in the parental lines than in the hybrid or BC progeny. Germination was 26% lower in F₁ hybrids, and 8% (F₁ non-VRT × F₁ VRT) and 11% (F₁ VRT × F₁ VRT) lower in F₂ hybrids, compared to the wild parent. Germination in BC progeny was lower by 29% (F₁ VRT × W) and 36% (W × F₁ VRT) in relation to the wild parent. Germination rates of the hybrids and the BC progeny did not differ significantly from one another (Table 1).

Differences in survival to reproductive age among generations were less pronounced ($\chi^2 = 93.6$, *df* = 6, $P < 0.00001$). Survival of F₁ progeny was 22% lower than that of the wild parent. Survival was also lower than that of the parental

lines in F₂ hybrids and BC progeny, but not significantly so. Among parental lines, survival was greater in wild than VRT plants (Table 1), but many of the latter were affected by a whitefly infestation in the greenhouse.

Pollen viability varied significantly among generations ($\chi^2 = 4254$, *df* = 4, $P < 0.00001$). Both parental lines had greater pollen viability than the hybrids and the BC progeny. The BC (W × F₁ VRT) and the F₂ (F₁ VRT × F₁ VRT) progeny had greater pollen viability than F₁ hybrids (Table 1).

A potential effect of year is not supported by our analyses because only in two of the six performance variables were there differences between the F₁ and the F₂ or BC progeny (Table 2), despite the fact that F₁ hybrids were grown in a different year than the others. Similarly, seed germination rates did not differ significantly between F₁ hybrids and F₂ or BC progeny. Also, pollen viability varied between F₂ and BC progeny, despite being grown during the same year.

Reproductive rate

Reproductive rates of the F₁ and F₂ hybrids were lower than those of the wild parent (Table 2). Compared to the wild parent, reproductive rates through the female function were only 2–6% in the F₁, 1% in the F₂, and 9% in BC progeny (W × F₁ VRT). Through the male function, reproductive rates of the F₁, F₂ (only progeny from F₁ VRT × F₁ VRT tested) and BC (W × F₁ VRT) progeny were, respectively 6%, 0.9%, and 20% compared to the wild parent. Notably, reproductive rates of W × F₁ VRT BC progeny, were ca. 2.5 and 51 times greater (female and

Table 2. Reproductive rate (survival \times fertility) of wild parents, hybrids (F_1 , F_2), and backcrosses (BC progeny).

Generation	Reproductive individuals	Survival rate	Female function			Male function	
			Total seeds	Fertility	Reproductive rate	Fertility	Reproductive rate
Wild parent	94	0.85	5609	59.67	50.72	59671.4	50720.7
F_1 (saturation)	691	0.62	1935	2.8	1.75	344.2	215
F_1 (15:1)	223	0.62	442	1.98	1.24
F_1 (7:1)	98	0.69	330	3.37	2.32
F_1 (3:1)	150	0.66	758	5.05	3.31
F_2 (F_1 non-VRT \times F_1 VRT)	933	0.73	589	0.63	0.46
F_2 (F_1 VRT \times F_1 VRT)	606	0.74	650	1.07	0.79	532.8	394.3
BC ($W \times F_1$ VRT)	79	0.93	405	1.05	4.77	11845	11015.8

Notes: The two columns of reproductive rates are analogous to the basic reproductive rate obtained from life tables, but we consider each cross as one class. Female fertility was calculated as the total number of seeds produced divided by the number of plants at reproductive stage, male fertility was calculated as the product of the number of male flowers, pollen viability and the number of pollen grains produced per flower of *C. pepo* (28,030 grains) divided by the number of plants at reproductive stage.

male function, respectively) than those of the F_1 generation. Overall, reproductive rates of hybrids (F_1 , F_2) and BC progeny were greater than one, except in the F_2 generation, which means that the number of hybrids and BC progeny in populations should increase.

DISCUSSION

Our study showed that GM *Cucurbita pepo* can produce fertile hybrids with its wild relative, *C. argyrosperma* ssp. *sororia*. To our knowledge, we are the first to show that F_1 progeny that inherited the transgene are capable of transmitting it to their progeny through crosses with other hybrids or in backcrosses. The transgene followed Mendelian inheritance as a dominant trait in a majority of families, and its frequency in the hybrid progeny increased as the transgenic:wild pollen ratio increased in pollen loads.

Inter-specific transmissibility of the transgene

In crosses that used pure transgenic pollen on wild maternal plants, 44% of the progeny was F_1 VRT and deviated from the expected Mendelian ratio, but such deviation was caused by the progeny produced in 6 out of 40 plant families. Mendelian segregation of the VRT occurred in 85% of the families, which is consistent with reports from intraspecific crosses in *Beta vulgaris* and *C. pepo* (Dietz-Pfeilstetter and Kirchner 1998, Sasu et al. 2009).

Pollen of GM plants competed successfully with wild pollen in wild pistils as seeds were sired by both type of donors in pollen mixtures treatments. The pooled F_1 progeny obtained from

the other three pollen mixture treatments significantly deviated from Mendelian inheritance of the transgene. However, as the proportion of VRT pollen increased in mixed pollen loads on wild recipients, the transfer of the transgene to the progeny was more likely to follow Mendelian inheritance as a dominant trait in more families. Similarly, in these pollen mixture experiments, as the proportion of transgenic pollen in the load increased, the proportion of transgenic hybrid progeny increased too. These results suggest a density-dependent effect over fertilization success of transgenic pollen in competition with the wild species. Although wild pollen in mixed loads reduced the frequency of hybrid VRT, microgametophytes of the modified crop were able to compete successfully in the style and fertilize wild ovules.

Our study with *Cucurbita* is an advancement with respect to other studies because we were able to identify transgenic and non-transgenic F_1 donors and recipients before conducting the experimental crosses. This allowed us to clearly establish the inheritance of the transgenes in F_2 hybrids and BC progeny. In the pooled F_2 , we observed deviations from Mendelian inheritance in the transgene frequency. However, the F_2 progeny of 71% of the families derived from crosses of F_1 VRT pollen on F_1 non-VRT recipients followed Mendelian inheritance. Similarly, the F_2 progeny of 63% of the families derived from F_1 VRT donor and recipient crosses followed Mendelian inheritance. Despite deviations from Mendelian inheritance of the transgene in interspecific hybridizations (possibly due to hybrid inter-specific cross-compatibility issues

related to fertilization, seed abortion, or differential seed germination), we demonstrated that transgenes can be transferred from *C. pepo* VRT to the wild relative *C. argyrosperma* ssp. *sororia* with stability.

Inheritance of the VRT among BC progeny followed Mendelian expectations regardless of whether the F₁ VRT acted as donors or recipients in crosses with the wild relative. The transgenic virus resistance construct is inherited as a single dominant trait in an interspecific hybridization system and can be incorporated in the gene pool of the wild relative through backcrossing. A consistent segregation of the transgene across several generations suggests that the transgenic construct is stable despite the possibility of genetic recombination during meiosis (Stewart et al. 2003, Bicar 2009).

In the crop/wild interface landscape, cultivars of *C. pepo* and wild populations of *C. argyrosperma* ssp. *sororia* coincide in different regions of Mexico (Arriaga et al. 2006). Both cultivated *C. pepo* and the wild gourds, share pollinators and bloom during similar periods throughout the year (Hurd et al. 1971, Lira-Saade 1995). *Xenoglossa* and *Peponapis* bees have maintained a mutualistic evolutionary relationship with *Cucurbita* spp. as the most efficient pollinators of the genus (Hurd et al. 1971). Therefore, gene flow is likely to occur among common *Cucurbita* species. In Mexico, cultivation of *C. pepo* usually occurs in densities between 10,000-14,000 plants per hectare (*public communication*; <http://www.siap.gob.mx/calabacita/>), and wild populations of *C. argyrosperma* ssp. *sororia* occur surrounding many of these fields in much lower densities (i.e., 10-40 plants along 100 m of road). This scenario will lead to an over-representation of VRT pollen of the cultivated plants, where bees will carry only transgenic pollen or mixed loads biased towards a higher proportion of transgenic:wild pollen, favoring VRT pollen flow into the wild. Already, there is evidence that bees can carry mixed pollen loads from cultivated and wild *Cucurbita*, and that gene flow occurs between cultivated and wild plants of *C. argyrosperma* (Kirkpatrick and Wilson 1988, Montes-Hernández and Eguiarte 2002). Our study shows that even if VRT pollen is in low density, it can compete with wild pollen and produce viable hybrids carrying the transgene

into recipient plants of *C. argyrosperma* ssp. *sororia*. Therefore, the commercial release of *C. pepo* VRT in Mexico would result in the creation of hybrids with wild populations of *C. argyrosperma* ssp. *sororia*, which is the initial step to introgression.

Performance of hybrid and backcross progeny

Low hybrid viability could hinder the escape of transgenes to wild populations. In our study, hybrid and BC progeny generally showed both reduced vegetative and reproductive performance compared to the wild parent, and thus, we may conclude that introgressed progeny are not good competitors. However, we must take into account the variability in these measures. Transgenic and non-transgenic hybrid performance is variable (Arnold and Hodges 1995, Hails and Morley 2005), and it may be equal to that of the parents (Arnold and Hodges 1995, Pertl et al. 2002, Ammitzbøll et al. 2005). Thus, an F₁ hybrid generation with low fitness does not necessarily prevent transgene introgression, it merely slows down the process (Hails and Morley 2005). Although F₁ hybrids of *C. pepo* VRT and *C. argyrosperma* ssp. *sororia* had lower fitness than the wild parent, they were fertile and therefore could allow the flow of genes (including transgenes) to future generations. Interestingly, experimentally generated hybrids of free-living *C. pepo* ssp. *texana* and a transgenic cultivar of *C. pepo* ssp. *pepo* resistant to two viruses also had lower fitness than the wild parent (hybrid fitness relative to wild parent of 15-53%; Spencer and Snow 2001). One reason why the decrease in fitness reported in that study was not as severe as the one we found could be that the parental lines of those hybrids were more closely related (same species) than the parental lines we used. In either case, the F₁ hybrids constitute a, at most, only a partial barrier to gene flow among transgenic crop and wild *Cucurbita*.

The vigor of F₂ hybrids did not differ based on whether one or both parents were F₁ VRT, but the overall fitness of the F₂ generation was lower compared to the wild parents. Hybrid breakdown has also been shown to occur in the F₂ *Brassica napus* and in herbicide-resistant GM rice (*Oryza sativa*; Hauser et al. 1998, Zhang et al. 2003). Despite their low fitness, F₂ hybrids remain a viable VRT reservoir from which further

transgene introgression could occur.

The BC progeny of F₁ hybrid donors and wild recipients had greater vegetative and reproductive performance than F₁ hybrids. This suggests that crosses between F₁ VRT and wild plants can generate progeny with improved fitness compared to the F₁ hybrids. Similarly, in other GM hybrid systems, the backcross generations had greater fitness than the F₁ and F₂ generations (GM *Brassica napus* × *B. rapa*, and *Raphanus raphanistrum* × *B. napus* GM; Chèvre et al. 1997, Metz et al. 1997, Ammitzbøll et al. 2005). It is noteworthy that the inheritance of the transgene to BC progeny showed no deviations from Mendelian inheritance and that BC progeny had greater fitness than the F₁ hybrids, when the maternal parents of the BC progeny were wild. This BC progeny could have a greater probability of surviving, reproducing, and transmitting the VRT than either of the hybrid generations.

Other factors may affect the fate of transgenes in wild populations after hybridization. VRT hybrids in environments with high incidence of viruses would have selective advantages over susceptible plants, and consequently should increase in frequency (Laughlin et al. 2009, Sasu et al. 2009). In contrast, transgene expression may have negative effects on the fitness of VRT plants, and thus, could decrease their frequency in a population. For example, indirect costs in VRT BC squash occurred because these plants attracted more herbivores (chrysomelid beetles) than non-VRT BC susceptible to the virus but suffered greater infection by the lethal bacterium *Erwinia* as it was carried by the herbivores (Sasu et al. 2009). Studies are required to determine if similar costs occur in VRT hybrids in the tropics where ecological interactions could be more complex.

Concluding remarks

In conclusion, our study demonstrated that a virus-resistance transgene in the cultivated squash, *Cucurbita pepo*, can be transferred to its distant wild relative *Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia*, and may result in introgression of transgenic sequences in natural populations in the region of origin and domestication of *Cucurbita*. The transgene is likely to follow Mendelian inheritance as the proportion of VRT pollen increases and under different pollen competition scenarios. The results of our study should be

considered in risk assessment analyses for the introduction of GM squash cultivars at the site of origin of the genus. Future studies are needed to assess whether viral-resistance transgenes provide these hybrids with a competitive advantage in wild conditions, and to determine if there are any direct or indirect costs of transgene expression in hybrids and BC progeny.

ACKNOWLEDGMENTS

Permits to use GMO zucchini plants for this study in Mexico were granted by SAGARPA (0330, 0390, 02034). The authors thank all support staff at Laboratorio de Ecología Evolutiva y Conservación de Bosques Tropicales, IIES, and Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, UNAM for help in the lab, greenhouse, and experimental plot, and for providing the space for the experimental plot and the use of their facilities. Financial support for this study was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (174071/131008), Proyecto Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica para la Conservación de Recursos Genéticos 2015-2-250996 and Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica-Universidad Nacional Autónoma de México (IN212714) to M. Quesada, and from Programa de Estancias de Investigación y Docencia, UNAM to G. Ávila-Sakar. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of R. Cruz-Reyes at Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

LITERATURE CITED

- Ammitzbøll, H., T. N. Mikkelsen, and R. B. Jørgensen. 2005. Transgene expression and fitness of hybrids between GM oilseed rape and *Brassica rapa*. *Environmental Biosafety Research* 4:3–12.
- Arnold, M. L., M. R. Bulger, J. M. Burke, A. L. Hempel, and J. H. Williams. 1999. Natural hybridization: How low can you go and still be important? *Ecology* 80:371–381.
- Arnold, M. L., and S. A. Hodges. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution* 10:67–71.
- Arriaga, L., E. Huerta, R. Lira-Saade, E. Moreno, and J. Alarcón. 2006. Assessing the risk of releasing transgenic *Cucurbita* spp. in Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112:291–299.
- Bicar, E. H. 2009. Characterizing transgene inheritance. *Methods in molecular biology; Transgenic Maize* 526:147–159.
- Burke, J. M., and M. L. Arnold. 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* 35:31–52.

- Chapman, M. A., and J. M. Burke. 2006. Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. *The New Phytologist* 170:429–443.
- Chèvre, A.-M., F. Eber, A. Baranger, and M. Renard. 1997. Gene flow from transgenic crops. *Nature* 389:924.
- Dale, P. J. 1994. The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: general considerations. *Molecular Ecology* 3:31–36.
- Dietz-Pfeilstetter, A., and M. Kirchner. 1998. Analysis of gene inheritance and expression in hybrids between transgenic sugar beet and wild beets. *Molecular Ecology* 7:1693–1700.
- Ellstrand, N. C. et al. 2013. Introgression of crop alleles into wild or weedy populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 44:325–345.
- Gepts, P., and R. Papa. 2003. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Environmental Biosafety Research* 2:89–103.
- Hails, R. S., and K. Morley. 2005. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology & Evolution* 20:245–252.
- Hauser, T. P., R. B. Jørgensen, and H. Østergård. 1998. Fitness of backcross and F₂ hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81:436–443.
- Hoofman, D. A. P., J. G. B. Oostermeijer, E. Marquard, and H. J. C. M. den Nijs. 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* 45:1094–1103.
- Hurd, P. D., Jr., E. G. Linsley, and T. W. Whitaker. 1971. Squash and gourd bees (*Peponapis*, *Xenoglossa*) and the origin of the cultivated *Cucurbita*. *Evolution* 25:218–234.
- James, C. 2013. Global status of commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA, 46 Ithaca, New York, USA.
- Kirkpatrick, K. J., and H. D. Wilson. 1988. Interspecific gene flow in *Cucurbita*: *C. texana* vs. *C. pepo*. *American Journal of Botany* 75:519–527.
- Kwit, C., H. S. Moon, S. I. Warwick, and C. N. Stewart. 2011. Transgene introgression in crop relatives: molecular evidence and mitigation strategies. *Trends in Biotechnology* 29:284–293.
- Laughlin, K. D., A. G. Power, A. A. Snow, and L. J. Spencer. 2009. Risk assessment of genetically engineered crops: fitness effects of virus-resistance transgenes in wild *Cucurbita pepo*. *Ecological Applications* 19:1091–1101.
- Lecoq, H., G. Wisler, and M. Pitrat. 1998. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. Pages 126–142 in J. D. McCreight, editor. *Cucurbitaceae, 1998: evaluation and enhancement of cucurbits germplasm*. ASHS, Alexandria, Virginia, USA.
- Lipp, M., et al. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International* 82:923–928.
- Lira-Saade, R. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica. IPGRI, Rome, Italy.
- Merrick, L. C. 1990. Systematics and evolution of a domesticated squash, *Cucurbita argyrosperma*, and its wild and weedy relatives. Pages 77–95 in D. M. Bates, W. R. Robinson, and C. Jeffrey, editors. *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- Metz, P. L. J., E. Jacobsen, J. P. Nap, A. Pereira, and W. J. Stiekema. 1997. The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa* × *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theoretical and Applied Genetics* 95:442–450.
- Montes-Hernández, S., and L. E. Eguiarte. 2002. Genetic structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) in western Mexico. *American Journal of Botany* 89:1156–1163.
- NRC [National Research Council]. 2002. Environmental effects of transgenic plants: the scope and adequacy of regulation. The National Academies Press, Washington, D.C., USA.
- Pertl, M., T. P. Hauser, C. Damgaard, and R. B. Jørgensen. 2002. Male fitness of oilseed rape (*Brassica napus*), weedy *B. rapa* and their F₍₁₎ hybrids when pollinating *B. rapa* seeds. *Heredity* 89:212–218.
- Pilson, D., and H. R. Prendeville. 2004. Ecological effects of transgenic crops and the escape of transgenes into wild populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35:149–174.
- Piñeyro-Nelson, A., J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernández, A. Rangel, M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante, and E. R. Alvarez-Buylla. 2009. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology* 18:750–761.
- Quesada, M., K. Bollman, and A. G. Stephenson. 1995. Leaf damage decreases pollen production and hinders pollen performance in *Cucurbita texana*. *Ecology* 76:437–443.
- Quesada, M., J. A. Winsor, and A. G. Stephenson. 1993. Effects of pollen competition on progeny performance in a heterozygous cucurbit. *American Naturalist* 142:694–706.
- Quesada, M., J. A. Winsor, and A. G. Stephenson. 1996. Effect of pollen selection on progeny vigor in a *Cucurbita pepo* × *C. texana* hybrid. *Theoretical and Applied Genetics* 92:885–890.
- Quist, D., and I. H. Chapela. 2001. Transgenic DNA

- introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414:541–543.
- Reichman, J. R., L. S. Watrud, E. H. Lee, C. A. Burdick, M. A. Bollman, M. J. Storm, G. A. King, and C. Mallory-Smith. 2006. Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagronomic habitats. *Molecular Ecology* 15:4243–4255.
- Sanjur, O. I., D. R. Piperno, T. C. Andres, and L. Wessel-Beaver. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:535–540.
- Sasu, M. A., M. J. Ferrari, D. Du, J. A. Winsor, and A. G. Stephenson. 2009. Indirect costs of a nontarget pathogen mitigate the direct benefits of a virus-resistant transgene in wild *Cucurbita*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:19067–19071.
- Simmons, H. E., E. C. Holmes, and A. G. Stephenson. 2008. Rapid evolutionary dynamics of zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology* 89:1081–1085.
- Singh, A. K. 1990. Cytogenetics and evolution in the Cucurbitaceae. Pages 10–28 in D. M. Bates, W. R. Robinson, and C. Jeffrey, editors. *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- Snow, A. A., D. A. Andow, P. Gepts, E. M. Hallerman, A. Power, J. M. Tiedje, and L. L. Wolfenbarger. 2005. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecological Applications* 15:377–404.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman, New York, New York, USA.
- Spencer, L. J., and A. A. Snow. 2001. Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 86:694–702.
- Stewart, C. N., M. D. Halfhill, and S. I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews. Genetics* 4:806–817.
- Tepfer, M. 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annual Review of Phytopathology* 40:467–491.
- Tricoll, D. M., K. J. Carney, P. F. Russell, J. R. McMaster, D. W. Groff, K. C. Hadden, P. T. Himmel, J. P. Hubbard, M. L. Boeshore, and H. D. Quemada. 1995. Field Evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. *Nature Biotechnology* 13:1458–1465.
- Warwick, S. I., A. Légère, M.-J. Simard, and T. James. 2008. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17:1387–1395.
- Wegier, A., A. Piñeyro-Nelson, J. Alarcón, A. Gálvez-Mariscal, E. R. Alvarez-Buylla, and D. Piñero. 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* 20:4182–4194.
- Whitaker, T. W., and W. P. Bemis. 1964. Evolution in the genus *Cucurbita*. *Evolution* 18:553–559.
- Wilson, H. D. 1990. Gene flow in squash species: Domesticated *Cucurbita* species may not represent closed genetic systems. *BioScience* 40:449–455.
- Wolfenbarger, L. L., and P. R. Phifer. 2000. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* 290:2088–2093.
- Zhang, N., S. Linscombe, and J. Oard. 2003. Outcrossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide-resistant rice and the weed, red rice. *Euphytica* 130:35–45.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

ECOLOGICAL ARCHIVES

Appendices A–C are available online: <http://dx.doi.org/10.1890/ES15-00304.1.sm>

CAPÍTULO I

CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS Y LOS CENTROS DE ORIGEN Y
DOMESTICACIÓN DE PLANTAS

REVISIÓN

CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS Y EL RIESGO DE HIBRIDACIÓN

Importancia de los cultivos GM

Los cultivos genéticamente modificados (GM) lograron una importancia económica creciente a partir de la década de los años noventa (Qiam 2009), eso se ve reflejado en el área cultivada con plantas genéticamente modificadas, la cual incrementó 100 veces a nivel mundial en las últimas dos décadas. Actualmente estos cultivos ocupan un poco más del 10% del total de área cultivable en todo el planeta. El uso comercial de cultivos GM se concentra en cuatro especies: la soya, el algodón, el maíz y la canola. Esas variedades son representativas de dos características transgénicas dominantes del mercado de cultivos GM: la tolerancia a herbicidas (glifosato) y la resistencia a insectos plaga (cultivos Bt, James 2013). Hace un par de décadas algunos países industrializados lideraban el uso comercial de cultivos GM, sin embargo en la actualidad varios países en vías de desarrollo son los principales usuarios. Actualmente una proporción importante de los campesinos que utilizan cultivos GM se encuentran en países en vías de desarrollo (20 de 28 países que cultivan plantas GM). También se considera que aproximadamente el 90% de los granjeros que utilizan cultivos GM manejan granjas pequeñas y tienen escasos recursos económicos (James 2013). La evaluación del riesgo ecológico de cultivos GM es relevante para algunos de esos países, ya que representan sitios de origen o domesticación de cultivos y allí se

distribuyen algunos parientes silvestres de cultivares GM (Gepts 2001, Andersson y de Vicente 2009).

El utilizar cultivares GM puede tener algunas ventajas. Por ejemplo la variedad de algodón GM tolerante a herbicidas puede reducir la aplicación de tales químicos en un 6.1% al compararse con las variedades comunes (Brookes y Barfoot 2013). La utilización de cultivos GM puede acarrear beneficios económicos para los granjeros, aunque no siempre se garantizan ganancias. La mayoría de los agricultores que usaron tecnología GM reportaron incrementos en la producción de sus cultivos, pero también se tienen evidencias de efectos económicos negativos por su utilización tanto en países en vías de desarrollo como en los desarrollados. De 168 evaluaciones que midieron la producción entre cultivos GM y cultivos convencionales, 124 mostraron incrementos en la producción, en 32 no se observó diferencias entre cultivos y 13 mostraron efectos negativos (Carpenter 2010). En países en vías de desarrollo no se reportaron incrementos en la producción al utilizar algodón tolerante a herbicidas, un incremento promedio de 7% tanto en soya tolerante a herbicidas como en algodón resistente a insectos (Carpenter 2010). El uso de cultivos GM puede incrementar la productividad de los cultivos; la diferencia promedio de la producción entre granjeros que utilizan tecnología GM y aquellos que no la utilizan fue de 29% (rango de -25 a 150%) en países en vías de desarrollo y de 6% (rango de -12 a 26%) en países desarrollados (Carpenter 2010).

En los siguientes años los granjeros seguirán siendo el mercado principal de las empresas desarrolladoras de cultivos GM. Esencialmente, esas compañías ofrecen mejorar los ingresos de los campesinos a través de variedades modificadas que reducen la aplicación de insecticidas o herbicidas, pero esa visión puede llevar al desconocimiento de las necesidades de mejoramiento de cultivos a nivel local. En los países en vías de

desarrollo por ejemplo, el esfuerzo en el mejoramiento de cultivos está dirigido a reforzar aspectos nutritivos de los mismos (Cressey 2013).

Además de las ventajas que ofrecen los cultivos GM también pueden representar desventajas al ambiente bajo ciertas circunstancias. El flujo génico desde cultivos GM hacia parientes silvestres puede conducir a la introgresión (incorporación permanente de genes, en este caso del cultivo en poblaciones silvestres) del transgene en las poblaciones silvestres, lo cual puede representar riesgos de bioseguridad. Los riesgos sobresalientes incluyen el caso donde la característica transgénica robustece la adecuación o la condición de maleza de los portadores, otro caso podría ser cuando el transgene otorga una desventaja selectiva especialmente en poblaciones pequeñas (Kwit et al. 2009), ambas condiciones son relevantes en los centros de origen de cultivos (Engels et al. 2006).

El flujo génico entre cultivos GM y parientes silvestres puede favorecer la acumulación de transgenes en los materiales nativos (apilamiento), los cuales a su vez pueden retransmitir el transgene favoreciendo una introducción no deseada hacia otras especies de plantas (Gepts y Papa 2003, Zapiola y Mallory-Smith 2012). En este trabajo realizo una breve revisión de la utilización de cultivos GM en centros de origen y su posible escape fuera de las áreas de control vía hibridación, dando énfasis en un pequeño grupo de casos poco estudiados y algunos otros emblemáticos para los centros de origen y diversificación de cultivos.

Cultivos GM y el riesgo de introgresión

Se considera que el flujo génico es un posible riesgo hacia los parientes silvestres, pero los cultivos GM pueden representar otros potenciales riesgos. Por ejemplo se piensa que algunos cultivos GM pueden exacerbar la característica de las malezas en áreas agrícolas, favorecer el desarrollo de plantas invasivas, impactar a organismos no blanco

(como organismos del suelo, insectos que no son plaga, aves y otros animales), además de formar nuevas plagas o más vigorosas, provocar cambios o pérdida en la diversidad de especies o en la diversidad genética de las especies (Snow et al. 2005, Clark 2006). El flujo génico debe ser un tema importante además de pertinente para los países en los que se distribuyen parientes silvestres de cultivos GM, una revisión reciente demuestra que el 42.2% de la literatura sobre flujo de transgenes entre 2002 y 2011, aborda aspectos del flujo hacia los parientes silvestres (Nicolia et al. 2014). El flujo de transgenes (así como el de los genes de plantas domesticadas por métodos tradicionales) puede tener consecuencias no deseadas sobre los parientes silvestres o variedades locales. Por ejemplo si un transgene otorga una ventaja adaptativa a los individuos portadores, su presencia en la población silvestre podría conducir a un incremento en la característica de maleza de la población o puede conducir a una asimilación genética de los parientes silvestres por los cultivos GM (Ellstrand 1999).

La normatividad para la liberación de cultivos GM pide una evaluación del desempeño del cultivo y la influencia de éste sobre la comunidad de organismos del ecosistema agrícola, teniendo en contraste variedades comunes (Crawley et al. 2001). Sin embargo la evaluación del escape vía hibridación con parientes silvestres requiere un análisis fuera del área de cultivo, empezando por considerar el escape de semillas o por polen en el caso de plantas (Tiedje et al. 1989, Stewart 2003). Una vez dadas las condiciones del escape, los cultivos GM podrían generar poblaciones ferales o se podrían incorporar las secuencias del transgene en las poblaciones de parientes silvestres mediante hibridación (Kwit et al. 2011).

El flujo de transgenes requiere una serie de pasos para concretarse y cada uno de ellos es necesario para que el siguiente suceda. Para que ocurra el escape o movimiento de transgenes hacia poblaciones silvestres, estos últimos deben crecer dentro del rango de

dispersión de polen o de las semillas del cultivo transgénico. Posteriormente el cruzamiento entre cultivo transgénico y el pariente silvestre debe producir progenie viable y fértil. Además debe ocurrir un traslape durante la floración del pariente silvestre y del cultivar modificado. La progenie híbrida obtenida de esa fertilización debe mostrar un cierto grado de viabilidad y fertilidad que permita el retrocruzamiento con los parientes silvestres (Tabla 1). Finalmente, el paso fundamental es la determinación de la persistencia a largo plazo del transgene en la población silvestre (Gepst y Papa 2003).

En los individuos transgénicos derivados de retrocruzamientos con el pariente silvestre, el locus donde se inserte el transgene puede sufrir una reducción de diversidad en las regiones adyacentes a ese sitio (Gepts y Papa 2003). La inserción del transgene es azarosa, sin embargo si ocurre en ciertas zonas de los cromosomas con genes que son seleccionados positivamente, esos sitios tienen mayor posibilidad de ser transferidos hacia los parientes silvestres (Stewart et al. 2003). En retrocruzantes derivados de cruces entre la lechuga (*Lactuca sativa*) y un pariente silvestre (*Lactuca serriola*) se documentó un desequilibrio por ligamiento que permitió una sobre representación de alelos del domesticado en el genoma de los retrocruzantes. En el caso de cultivos GM el desequilibrio por ligamiento permitiría la introgresión de secuencias transgénicas incluso cuando no contribuyan directamente a la adecuación (Hooftman et al. 2011).

Si un organismo genéticamente modificado es liberado al ambiente, establecerá interacciones con el medio biótico, algunas de esas interacciones pueden tener consecuencias no deseadas como resultado de efectos directos o indirectos (Wolfenbarger y Phifer 2000). Las relaciones bióticas en que participan las especies, incluidas los cultivos GM pueden ser complejas, de manera que los efectos que genera un transgene no siempre son evidentes. Por ejemplo en las plantas transgénicas del zucchini (*Cucurbita pepo*) con resistencia a virus, la característica transgénica las hace más susceptibles al ataque de

escarabajos herbívoros, los cuales a su vez son vectores de la bacteria *Erwinia*. Este patógeno que es transmitido en las heces fecales que depositan los escarabajos sobre los nectarios cuando se agrupan al interior de las flores para reproducirse, es mortífero para las plantas, ya que infecta y destruye su sistema vascular (Sasu et al. 2009, 2010). Así la presencia del transgene genera un costo indirecto a las plantas retrocruzantes que portan la secuencia de resistencia a virus. Este último caso ejemplifica la complejidad que enfrenta la evaluación de los riesgos ambientales de la liberación de cultivos GM.

Evaluación de riesgos ecológicos

La liberación de organismos genéticamente modificados (OGM) está regulada a nivel mundial, la evaluación del riesgo por la liberación está basada en la posibilidad de daño y las consecuencias del mismo, en una evaluación caso por caso (Nap et al. 2003). Específicamente la determinación del riesgo ambiental (e.g. la liberación de un OGM) debe apoyarse en el producto de dos probabilidades: la probabilidad de exposición del ambiente a un peligro por la utilización de un organismo genéticamente modificado (valoración de exposición) y la probabilidad condicional de que ese peligro cause un daño (valoración del efecto, Snow et al. 2005, Andow y Zwahlen 2006).

El análisis de riesgo ambiental (ERA) debe considerar tres aspectos fundamentales: la valoración, el manejo y la comunicación del riesgo (Snow et al. 2005). La valoración del riesgo ambiental comprende varias etapas: en la primera se identifica la característica que puede causar efectos adversos (fase de formulación del problema, o la definición del caso), después se evalúa la potencial consecuencia que tendría cada efecto adverso (realizando una comprobación práctica), posteriormente se evalúa la probabilidad de ocurrencia de esos efectos (estimación o medición) y finalmente se estima el riesgo de cada característica (efecto o comparación de exposición, Hilbeck et al. 2011). Durante el manejo de riesgo se

consideran rutas alternativas de acción y se elige la opción más apropiada, en relación a los resultados de la determinación del riesgo. Finalmente en la comunicación de riesgo, la decisión tomada deberá ser consensuada entre los actores interesados y transmitida con claridad y transparencia entre ellos (Snow et al. 2005).

En relación al flujo génico, el proceso de introgresión del transgene en las poblaciones silvestres emparentadas, representaría el componente de exposición dentro del análisis de riesgo (Ellstrand et al. 2013). Revisiones previas del flujo de transgenes enfatizaron en la determinación la probabilidad de que ocurriera tal flujo (Chandler y Dunwell 2008), pero hasta donde conozco no existe un trabajo que haya determinado la probabilidad de que la introgresión de secuencias transgénicas cause un daño en los parientes silvestres.

Se considera como estrategias de manejo del riesgo el confinamiento de los cultivos GM en invernaderos o la restricción de siembra en ciertas áreas (Bock 2005). Adicionalmente, en caso de que ocurra una liberación ambiental se requiere un monitoreo que incluya la distribución espacio-temporal del cultivo GM y de los parientes silvestres, además de contar con personal capacitado que pueda identificar efectos ambientales no esperados. También se deben probar hipótesis durante el monitoreo que permitan identificar aquellos índices más adecuados para el proceso mismo (Snow et al. 2005). Llegar a esta parte con la menor incertidumbre posible es crucial para la conservación de la biodiversidad, ya que la introgresión es un proceso irreversible.

Sin embargo, puntualizar la determinación del riesgo ecológico debido al uso de cultivos GM ha sido difícil entre la comunidad científica. Desde el punto de vista de Johnson et al. (2007), no existe una relación estrecha entre el análisis de riesgo y las investigaciones científicas, argumentan que las investigaciones pueden generar muchos datos, pero no todas aportan a la evaluación de hipótesis del análisis de riesgo. Una

dificultad importante es la ausencia de consenso sobre la forma de valorar la entidad que puede verse dañada y la integración correcta de hipótesis de riesgo (Tepfer et al. 2013). Adicionalmente, la falta de consenso sobre los riesgos puede ser una consecuencia de resultados no concluyentes, incluso hasta contradictorios en las investigaciones. Por ejemplo el caso del escape de secuencias transgénicas de maíz (*Zea mays*) en el centro de origen del cultivo, donde una primera evaluación detectó la presencia de secuencias transgénicas en maíz Bt, una segunda evaluación rechazó la misma y una tercera evaluación confirmó la presencia de secuencias en maíz Bt en el año 2004 (Quist y Chapela 2001, Ortiz-García et al. 2005, Pineyro-Nelson et al. 2009).

En la evaluación de riesgo ambiental respecto a una posible introgresión de secuencias transgénicas en parientes silvestres, falta por resolver aspectos importantes. Uno de los principales retos es la definición apropiada de *daño ambiental* en relación al flujo de transgenes (Sanvido et al. 2012). Por ejemplo se considera que la introgresión de secuencias transgénicas es un riesgo para la diversidad genética de los parientes silvestres (Lu 2013), sin embargo resulta difícil cuantificar el riesgo.

Flujo (trans)génico

Una revisión previa recopiló datos sobre la distancia de dispersión de polen desde parcelas con cultivos GM de la canola, el maíz y el algodón hacia plantas no modificadas, así como la distancia de aislamiento recomendada para esos cultivos (Chandler y Dunwell 2008). La coexistencia entre cultivos GM y plantas del cultivo no modificadas debe considerar una distancia de aislamiento entre esos dos tipos de plantas, esa posible coexistencia ha tratado de ser cuantificada al considerar un umbral de flujo (Messueguer et al. 2006, Devos et al. 2008). Sin embargo la contención es muy difícil de lograr, como lo evidencian algunos casos donde ya ocurrió la dispersión de transgenes (Ellstrand et al. 2013).

El escape de transgenes fuera de las áreas de cultivo ha ocurrido en algunas variedades de cultivos GM, en el caso de la canola (*Brassica napus*); la presencia del transgene de tolerancia al herbicida glifosato fue documentada años después de la última temporada de siembra, en una área donde comúnmente crece la canola de vida libre (Warwick et al. 2003, Warwick et al. 2008). Otro caso es el escape del transgene de resistencia al herbicida glifosato a través del pasto (*Agrostis stolonifera*) usado como césped en campos de golf (Reichman et al. 2006), los individuos ferales que recibieron polen GM produjeron progenie, la cual logró establecer una hibridación intergenérica con una especie de pasto común (*Polypogon mospeliensis*) al que transfirieron el transgene (Zapiola et al. 2012). También en los centros de origen se han documentado escapes de transgenes como por ejemplo en México. En poblaciones silvestres de algodón (*Gossypium hirsutum*), se registró la presencia del transgene de resistencia a herbívoros (Wegier et al. 2011) y el controvertido caso del maíz (*Zea mays*, Quist y Chapela 2001, Ortiz-García et al. 2005), en el que los resultados recientes confirman la presencia de secuencias transgénicas en razas locales de maíz (Piñeyro-Nelson et al. 2009).

Tabla 1. Desempeño de progenie híbrida entre cultivos GM y parientes silvestres.

Cultivar modificado	Maleza o pariente silvestre	Tipo de modificación	Característica con desempeño igual al silvestre	Característica con menor desempeño que el silvestre	Característica con mayor desempeño que el silvestre	Adecuación de híbridos o retrocruzantes	Ventaja al portar el transgene	Evaluación en sitio de origen del cultivo	Referencia.
Girasol <i>Helianthus annuus</i> .	<i>Helianthus annuus</i> .	Resistencia a lepidópteros (Bt).	--	--	--	RC transgénicas hasta 55% más semillas por planta.	Sí (sobre retrocruzantes no portadoras).	Si.	Snow et al. 2003.
Arroz <i>Oryza sativa</i> .	<i>O. sativa</i> ssp. <i>japonica</i> , <i>O. sativa</i> ssp. <i>indica</i> .	Resistencia a herbicida (glufosinato).	Número de panículas por planta.	Menor número de semillas, viabilidad de polen.	Mayor número de espículas por panícula, plantas F ₂ más altas.	--	--	Si.	Song et al. 2011.
Arroz <i>Oryza japonica</i> .	<i>O. japonica</i> .	Resistencia a insectos herbívoros.	--	Menos semillas viables por planta.	Número de espículas, peso de semillas por planta.	Mayor vigor vegetativo de los híbridos.	---	Si	Cao et al. 2009.
<i>O. sativa</i> .	<i>O. sativa</i> ssp. <i>spontanea</i> .	Resistencia a insectos (Bt/ CpTI).	Híbridos F ₄ , número de tallos, producción de semillas.	---	Altura de la planta, número de panículas, peso de semillas.	La F ₄ no mostró diferencias con la maleza en condiciones naturales.	Reducción del daño por insectos.	Si.	Yang et al. 2012.
Canola <i>Brassica napus</i> .	<i>Brassica rapa</i> .	Resistencia al herbicida glifosato.	--	Menor número de semillas.	Biomasa.	Los híbridos presentan mayor adecuación en presencia del herbicida.	Sí (sobre genotipos sin el transgene).	No.	Londo et al. 2010.
	<i>Raphanus raphanistrum</i> .	Resistencia al herbicida (glifosato).	--	Reducción de viabilidad del polen.	--	Híbridos con baja fertilidad.	--	Si.	Warwick et al. 2003.
	<i>Raphanus raphanistrum</i> .	Resistencia al herbicida (glifosato).	Fertilidad de retrocruzantes, emergencia, supervivencia y altura de las plantas.	Fertilidad del polen y menor número de semillas.	--	La fertilidad de las retrocruzas depende del citoplasma del receptor; mayor adecuación en retrocruzantes con citoplasma silvestre.	Sólo en presencia del herbicida glufosinato.	--	Guerintaine et al. 2002.

Maíz <i>Zea mays</i> .	<i>Zea mays</i> .	Tolerancia al herbicida glifosato.	Viabilidad de polen.	---	Mayor producción de semillas (25% aprox.).	---	--	No.	Guadagnuolo et al. 2006.
Zucchini <i>Cucurbita pepo</i> .	<i>Cucurbita argyrosperma</i> ssp. <i>sororia</i> .	Resistencia a virus.	Producción de flores pistiladas (F ₂ y RC).	Producción de flores estaminadas, (F ₁ , F ₂ y RC), semillas por fruto. (F ₁ , F ₂ y RC).	Área foliar (F ₁ , F ₂ y RC), tiempo de germinación (F ₁ , F ₂ , RC).	F ₁ y F ₂ con bajo desempeño reproductivo y RC con recuperación de la fertilidad.	--	Si.	Cruz- Reyes et al. 2015.

CENTROS DE DOMESTICACIÓN Y CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

India

Arroz

El arroz (*Oryza sativa*) tiene su centro de origen en el norte de la India, también en el sureste de Asia y el sur de China (Huang 2012, Gepts 2014). El flujo de transgenes de cultivares modificados hacia plantas silvestres de arroz puede ocurrir, puesto que allí coexisten cultivares y varias especies silvestres de arroz (Lu y Yang 2009). Da soporte a esta idea el flujo que ocurre entre variedades comunes de arroz y parientes silvestres. Por ejemplo, en campos de China y Corea el flujo de genes desde el arroz domesticado (*O. sativa*) hacia el pariente silvestre (*O. rufipogon*), favoreció la formación de híbridos en un rango de 1.21% a 2.19% (Chen et al. 2004). Existen varios eventos de transformación biotecnológica para el arroz, los cuales otorgan resistencia a herbicidas, además, en la zona de origen (en China) se han realizado pruebas experimentales con arroz modificado genéticamente con resistencia Bt a lepidópteros (Lu y Yang 2009, CERA 2014).

El flujo génico puede facilitar el escape y establecimiento de un transgene en poblaciones silvestres o en plantas maleza de arroz. Sin embargo el impacto del transgene de resistencia a herbívoros por ejemplo dependerá de su expresión y del efecto que tenga en la adecuación (Chen 2004, Lu y Yang 2009). Por ejemplo los híbridos derivados de cruza entre arroz GM con resistencia a insectos lepidópteros (CpTI y Bt) y una maleza (*O. sativa spontanea*) presentaron una ligera mejoría en el desempeño en relación a las líneas parentales (Cao et al. 2009). En presencia de insectos herbívoros, el transgene de resistencia a lepidópteros (Bt) puede incrementar la fecundidad (44%) de los portadores en relación al arroz

maleza, aunque este beneficio puede ser efímero si la presión ejercida por los insectos no existe (Yang et al. 2011, Yang et al. 2012).

Otros efectos ecológicos del transgene fuera del ambiente agrícola no han sido evaluados en profundidad, la mayoría de los trabajos se centran en ambientes agrícolas. Por ejemplo la evaluación del efecto de las proteínas Bt en arroz sobre organismos no blanco; no hubo efectos detectables sobre el tiempo de desarrollo del himenóptero parasitoide *Anagrus nilaparvateae* evaluado en 11 generaciones del parasitoide, ni tampoco en su fecundidad (Gao et al. 2010). En relación al efecto sobre los microorganismos del suelo, tampoco se detectó un efecto consistente en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias y hongos actinomicetos, entre suelo cultivado con plantas Bt de arroz y suelo sembrado con arroz convencional (Wei-Xiang et al. 2004). Esta evaluación es importante en ambientes no agrícolas, ya que existen diferencias en la comunidad de microorganismos, principalmente de hongos, entre suelos que están bajo prácticas agrícolas de aquellos que están en cercanía pero que no reciben manejo agrícola intenso, así que el efecto de plantas transgénicas en este ambiente puede ser distinto al observado en un ambiente agrícola. (Hassink et al. 1991).

África *Sorgo*

El sorgo (*Sorghum bicolor*), otro cultivo en cual el flujo génico con parientes silvestres permitiría el escape de transgenes hacia malezas emparentadas. Cuando concurren el sorgo cultivado (*Sorghum bicolor*) con la maleza emparentada (*S. halwepense*), el porcentaje de hibridación disminuye al incrementar la distancia entre ambas plantas; del 2.54% al 0.06% en la formación de híbridos a partir de los 13m hasta los 158m respectivamente (Morrel et al. 2005, Schmidt y Bothma 2006). Esta información es relevante para África como centro de origen del cultivo, allí se distribuyen varias subespecies silvestres del género *Sorghum* (deWet

y Huckabay 1966). El uso de cultivos transgénicos empezó en la región; en Burkina Faso, donde se probó una variedad de sorgo transgénico en condiciones de confinamiento, la variedad probada fue modificada para incrementar la expresión de vitamina A, Zinc y Hierro (BCH 2016). Otros eventos de transformación incluyen la resistencia a lepidópteros barrenadores del tallo (*Chilo partellus*), mediante proteínas Cry (Girijashankar et al. 2005). Desconocemos si existe alguna evaluación del riesgo ecológico en la zona de origen del sorgo.

Europa

Betabel

El betabel tiene varias especies silvestres emparentadas en Europa, zona que es considerada como centro de diversidad de este taxón (Maxted et al. 2008). El flujo génico entre el betabel (*Beta vulgaris*) y el pariente silvestre (*B. vulgaris* ssp. *marítima*), así como con otras malezas, sucede incluso pudiendo incrementar la diversidad genética (Desplanque et al. 1999, Bartsch et al. 1999). Se sabe que algunos de esos cruzamientos intraespecíficos pueden producir híbridos, los cuales son malezas difícil de controlar en el ambiente agrícola (Bartsch et al. 2003). La preocupación por controlar esas malezas se justifica por un evento de transformación que introdujo resistencia a herbicidas a base de glifosato (EPSPS) en una variedad de betabel (Monteiro et al. 2013). Adicionalmente, en algunos países de Europa hay solicitudes para el uso de cultivos de estas variedades GM (Dinamarca, Alemania, CERA 2016). Otra característica introducida al betabel mediante ingeniería genética es la resistencia a virus. Un estudio que utilizó híbridos entre la acelga GM con resistencia al virus de la rizomanía de la remolacha (BNYVV) y una variedad del cultivo de acelga, muestra como el gen de resistencia a virus puede otorgar ventajas a los híbridos F₁ portadores, en ambientes que tengan una fuerte infestación viral (Bartsch et al. 2001).

Asia

Alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa*) y otras especies cercanamente relacionadas tienen su centro de origen en Asia menor (Michaud et al., 1988; Quiros y Bauchan 1988). La presencia de miembros del complejo de *Medicago sativa* presentes en zonas de Asia y Rusia, sugieren que la introgresión desde la alfalfa domesticada hacia los parientes silvestres de la zona es un fenómeno común (Grenne et al. 2008, Quiros y Bauchan 1988). La alfalfa es uno de los principales cultivos forrajeros mejorados mediante ingeniería genética con resistencia a herbicidas derivados de glifosatos (Marolly-Smith y Zapiola 2008). En algunos países asiáticos cercanos al centro de origen, se realizaron ensayos con alfalfa GM; en Filipinas y en la República de Corea (BCH 2015). Una evaluación de flujo génico en alfalfa, detectó el desplazamiento del transgene hasta una distancia de 4 km (Van Deyzne et al. 2004).

Soya

La soya (*Glycine max*) fue probablemente domesticada en China a partir del pariente silvestre *Glycine soja* (Guo et al. 2010). La soya (*Glycine max*) es un cultivo que se reproduce principalmente mediante autofertilización, así que su tasa de exocruzamiento es mínima (< 1%), sin embargo en las plantas silvestres el exocruzamiento puede ser hasta del 19% (Fujita et al. 1997). La hibridación entre soya cultivada y plantas silvestres emparentadas es mínima, se demostró experimentalmente en poblaciones de soya silvestre (*Glycine max* ssp. *soja*) que pocas plantas reciben polen de plantas domesticadas (0.73% en un rango de 0% hasta 5.89%, Nakayama y Yamaguchi 2002). Un resultado similar se encontró evaluando la hibridación

entre cultivares de soya GM con tolerancia al herbicida glifosato y plantas silvestres de soya; el rango de hibridación fue de 0% al 0.097% (Mizuguti et al. 2010). En un experimento de hibridación entre la soya GM con tolerancia al glifosato y el pariente silvestre (*Glicine soja*), los híbridos F₁ tuvieron un mayor crecimiento vegetativo así como mayor biomasa y en la F₂ las semillas fueron más grandes que en los parientes silvestres (Guan et al. 2015).

Sudamérica

Papa

El centro de origen de la papa (*Solanum tuberosum*) se encuentra en Sudamérica, allí se distribuyen varios parientes del cultivo (*S. acaule*, *S. bukasovii*, *S. sparsipilum*; Celis et al. 2004). El riesgo de flujo de transgenes hacia las especies emparentadas de la papa en la zona boliviana-peruana tiene soporte en el flujo génico que ocurre naturalmente entre cultivos y parientes silvestres (Ross 1986). La evaluación del riesgo por flujo génico hacia los parientes silvestre de la papa es necesaria, puesto que ya se probó experimentalmente una variedad transgénica resistente al Virus Y de la Papa en Argentina (Bravo-Almonacid et al. 2011). Otra evaluación para un evento de modificación que otorga resistencia contra nematodos en la papa, no encontró un efecto significativo sobre la comunidad microbiana del suelo, pero si la posibilidad de flujo génico con parientes silvestres (Celis et al. 2004).

Norteamérica

Girasol

La planta de girasol (*Helianthus annuus*) tiene su centro de domesticación más probable en el este de América del Norte (Harter et al. 2004). La tasa de hibridación que ocurre entre el cultivo común de girasol *H. annuus* y el girasol silvestre (*H. petiolaris*) es mínima, no obstante las frecuencias alélicas de los cultivares domesticados pueden mantenerse durante al menos cinco generaciones de cruzamiento con plantas silvestres (Whitton 1997, Gutierrez et al. 2011). En relación al transgene de resistencia contra lepidópteros mediado por proteínas Bt en girasol GM, éste puede ser transferido hacia plantas silvestres de girasol vía retrocruzamientos. Esos retrocruzantes pueden beneficiarse de portar el transgene en presencia de herbívoros, ya que posibilitan el incremento de la producción de semillas (55%) comparado con las plantas no transgénicas (Snow et al. 2003). En otro análisis con girasol transgénico que expresa el gene de la enzima oxalato oxidasa (OxOx) que otorga resistencia contra el hongo de la podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*), los retrocruzantes con plantas silvestres presentaron menos infecciones por el hongo pero no obtuvieron una ventaja que se reflejara en un incremento en la producción de semillas (Burke y Rieseberg 2003).

Mesoamérica

Calabaza

El centro de domesticación de varias especies del género *Cucurbita* es Mesoamérica y en México se han cultivado experimentalmente plantas modificadas de la calabacita zucchini (*Cucurbita pepo*) con resistencia a virus (Sanjur 2002, CIBIOGEM 2014), liberada comercialmente en EUA (USDA 1994). Se sabe que el flujo génico entre la variedad GM y plantas silvestres específicas permite la formación de híbridos (Spencer y Snow 2001). Un

factor en contra de la persistencia del transgene en retrocruzantes, puede ser el costo indirecto debido a su expresión antes mencionada (Sasu et al. 2009), pero el transgene puede transferirse más allá del ancestro silvestre directo, como lo ha demostrado otro trabajo experimental (Cruz-Reyes et al. 2015). Específicamente dicho estudio mostró que los híbridos y retrocruzantes entre *C. pepo* GM con resistencia a tres virus (ZYMV, CMV y WMV) y la calabacita silvestre *C. argyrosperma* ssp. *sororia* –posiblemente la especie más lejanamente emparentada a *C. pepo* dentro del género–, heredan el transgene. Dicho estudio también evidencia un pobre desempeño en los híbridos F₁, el cual mejora en los retrocruzantes (Cruz-Reyes et al. 2015).

Maíz

Uno de los principales cultivos que tiene su centro de origen en Mesoamérica es el maíz (*Zea mays*), para el cual se otorgaron permisos de siembra experimental de maíz GM con resistencia a lepidópteros y herbicidas en México (CIBIOGEM 2014). El flujo génico entre el cultivo modificado con resistencia Bt a herbívoros y variedades comunes en condiciones de coexistencia ocurre; se documentó que el ADN del maíz GM representó el 0,9% del ADN total en 3 de las 12 parcelas evaluadas (Messeguer et al. 2006). Además se conoce que puede ocurrir hibridación del maíz GM con tolerancia a herbicidas de glifosato con su pariente silvestre, el teocinte (*Zea mays* ssp. *mexicana*). Los híbridos obtenidos de esos cruzamientos experimentales produjeron más semillas que el teocinte en condición de presión selectiva por la aplicación de glifosato (Guadagnuolo et al. 2006). La presencia de secuencias de maíz GM en razas locales en su sitio de origen causó preocupación y controversia debido a que el maíz GM no fue liberado comercialmente en esa zona del país (Quist y Chapela 2001, Ortiz-García et al. 2005, Piñeyro-Nelson et al. 2009).

Algodón

Uno de los sitios donde inició la domesticación de la planta de algodón (*Gossypium hirsutum*) es Mesoamérica (Wendel y Grover 2015). Hace más de 15 años en México se inició la siembra de algodón transgénico (CIBIOGEM 2014). El exocruzamiento entre plantas de algodón ocurre poco; menos del 10% más allá de los 10m de distancia entre plantas, sin embargo el nivel del flujo puede variar según el polinizador (Kareiva et al. 1994, Yan et al. 2015). También se encontró flujo a larga distancia (1625m, van Deyzne et al. 2005). En poblaciones silvestres de algodón ubicadas en México (sitio de origen) se detectaron restos de secuencias transgénicas. Específicamente, la presencia de transgenes con tolerancia a herbicidas, con resistencia a herbívoros, y un antibiótico en cuatro de ocho metapoblaciones muestreadas (Wegier et al. 2011).

Futuras consideraciones

Varias investigaciones recientes sugieren que para predecir el destino de las secuencias transgénicas en las poblaciones silvestres, además de información sobre la formación de híbridos entre cultivares GM y plantas silvestres, es fundamental determinar la asociación de los transgenes del cultivo con la adecuación (de Jong y Rong 2013). Parece que ciertas zonas donde se insertan genes de plantas domesticadas dentro de un genoma híbrido (con un pariente silvestre) pueden favorecer su permanencia durante el proceso de retrocruzamiento, con lo cual se favorece la introgresión de genes del cultivo domesticado. La identificación de zonas con poca probabilidad de pasar a través de generaciones puede ser importante para el desarrollo de mecanismos de contención (Hoftman et al. 2011). Aunque ciertamente, el contar con datos detallados del proceso de hibridación no elimina del todo la incertidumbre sobre el riesgo de la introgresión (de Jong y Rong 2011).

Se han propuesto varias estrategias preventivas para evitar el flujo de transgenes: como el procesamiento cuidadoso de los cultivos GM sobre todo durante su transporte, realizar una selección adecuada de plantas para incluir características que eviten el flujo (el desarrollo de plantas infértiles, la presencia de cleistogamia o de apomixis), el mejoramiento de técnicas durante la generación de las plantas GM (mutaciones de sitio dirigidas, mediante endonucleasas que establecen mutaciones que regulan la expresión de un gene, en la cisgénesis se transfieren únicamente genes desde especies sexualmente compatibles) o con la presencia de características que inhabiliten el escape como tecnologías que eliminan selectivamente el transgene del genoma o la inclusión de genes que sean desventajosos en la adecuación del portador del transgene (mitigación transgénica, Ryffel 2014).

LITERATURA CITADA

- Andersson, M. S., y M. C. de Vicente. 2009. Gene flow between crops and their wild relatives. Johns Hopkins University Press.
- Andow D.A.,y C. Zwahlen. 2006. Assessing environmental risk of transgenic plants. Ecology Letters 9: 196-214.
- Bartsch, D., U. Brand, C. Morak, M. Pohl-Orf, I. Schuphan, y N. C. Ellstrand. 2001. Biosafety of hybrids between transgenic virus-resistant sugar beet and swiss chard. Ecological Applications 11:142–147.
- Bartsch, D., J. Cuguen, E. Biancardi, y J. Sweet. 2003. Environmental implications of gene flow from sugar beet to wild beet - current status and future research needs. Environmental Biosafety Research 2:105–115.
- Brookes G, y P. Barfoot. Key environmental impacts of global GM crop use 1996-2011. GM Crops 2013; 4:1-11; PMID:2363591.
- Biosafety Clearing House. 2016. . <http://bch.cbd.int/database/results?searchid=653495>.

- Bock, A.-K. 2005. Genetically Modified Plants and Risk Analysis, págs. 92–101 en P. M. Pechan and G. E. de Vries, editors. Genes on the Menu Facts for Knowledge-Based Decisions. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Bravo-Almonacid, F., V. Rudoy, B. Welin, M. E. Segretin, M. C. Bedogni, F. Stolorowicz, M. Criscuolo, M. Foti, M. Gomez, M. López, G. Serino, S. Cabral, C. Dos Santos, M. Huarte, y A. Mentaberry. 2012. Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. Transgenic Research 21:967–982.
- Burke, J. M., and L. H. Rieseberg. 2003. Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. Science 300:1250.
- Cao, Q.-J., H. Xia, X. Yang, y B.-R. Lu. 2009. Performance of hybrids between weedy rice and insect-resistant transgenic rice under field experiments: implication for environmental biosafety assessment. Journal of integrative plant biology 51:1138–48.
- Carpenter, J. 2010. Peer-reviewed survey indicate positive impact of commercialized GM crops. Nature Biotechnology 28:319–321.
- Celis, C., M. Scurrah, S. Cowgill, S. Chumbiauca, J. Green, J. Franco, G. Main, D. Kiezebrink, R. G. F. Visser, y H. J. Atkinson. 2004. Environmental biosafety and transgenic potato in a centre of diversity for this crop. Nature 432:222–225.
- Center for environmental risk assessment. 2016. <http://www.cera-gmc.org/GMCropDatabase>.
- Cerdeira, A. L., y S. O. Duke. 2006. The Current Status and Environmental Impacts of Glyphosate-Resistant Crops. Journal of Environment Quality 35:1633.
- Chandler, S., y J. M. Dunwell. 2008. Gene Flow, Risk Assessment and the Environmental Release of Transgenic Plants. Critical Reviews in Plant Sciences 27:25–49.
- Chen, L. J. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. Annals of Botany 93:67–73.
- CIBIOGEM. 2013. Liberación al ambiente de Organismos Genéticamente Modificados. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/liberaciones-al-ambiente-por-cultivo-anual>
- Clark, E. A. 2006. Environmental risks of genetic engineering. Euphytica 148:47–60.

- Crawley, M. J., S. L. Brown, R. S. Hails, D. D. Kohn, y M. Rees. 2001. Transgenic crops in natural habitats. *Nature* 409:682–3.
- Cressey, D. 2013. A new breed. *Nature* 497:27–29.
- Cruz-Reyes, R., G. Ávila-Sakar, G. Sánchez-Montoya, y M. Quesada. 2015. Experimental assessment of gene flow between transgenic squash and a wild relative in the center of origin of cucurbits. *Ecosphere* 6:248.
- Dale, P. J., B. Clarke, y E. M. G. Fontes. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20:567–74.
- Desplanque, B., P. Boudry, K. Broomberg, P. Saumitou-Laprade, J. Cuguen, y H. Van Dijk. 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1194–1201.
- Devos, Y., M. Demont, K. Dillen, D. Reheul, M. Kaiser, y O. Sanvido. 2009. Coexistence of genetically modified (GM) and non-GM crops in the European Union. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29:11–30.
- Van Deynze, A. E., F. J. Sundstrom y K. J. Bradford. 2005. Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science* 45:1565.
- Ellstrand, N. C., P. Meirmans, J. Rong, D. Bartsch, A. Ghosh, T. J. de Jong, P. Haccou, B.-R. Lu, A. A. Snow, C. Neal Stewart, J. L. Strasburg, P. H. van Tienderen, K. Vrieling, y D. Hooftman. 2013. Introgression of Crop Alleles into Wild or Weedy Populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 44:325–345.
- Ellstrand, N. C., H. C. Prentice, y J. F. Hancock. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:539–563.
- Fujita, R., M. Ohara, K. Okazaki, y Y. Shimamoto. 1997. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *Journal of Heredity* 88 :124–128.
- Gao, M.-Q., S.-P. Hou, D.-Q. Pu, M. Shi, G.-Y. Ye, y X.-X. Chen. 2010. Multi-generation effects of Bt rice on *Anagrus nilaparvatae*, a parasitoid of the nontarget pest *Nilaparvata lugens*. *Environmental Entomology* 39:2039–44.

- Gepts, P. 2001. Origins of plant agriculture and major crops plants. Páginas 629–737 en M. Tolba, editor. Our fragile world: Challenges and opportunities for sustainable development. EOLSS Publishers, Oxford, UK.
- Gepts, P. 2014. The contribution of genetic and genomic approaches to plant domestication studies. *Current Opinion in Plant Biology* 18:51–59.
- Gepts, P., y R. Papa. 2003. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Environmental Biosafety Research* 2:89–103.
- Girijashankar, V., H. C. Sharma, K. K. Sharma, V. Swathisree, L. S. Prasad, B. V Bhat, M. Royer, B. S. Secundo, M. L. Narasu, I. Altosaar, y N. Seetharama. 2005. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*). *Plant Cell Reports* 24:513–22.
- Guadagnuolo, R., J. Clegg, y N. C. Ellstrand. 2006. Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. *Ecological Applications* 16:1967–74.
- Guan, Z.-J., P.-F. Zhang, W. Wei, X.-C. Mi, D.-M. Kang, y B. Liu. 2015. Performance of hybrid progeny formed between genetically modified herbicide-tolerant soybean and its wild ancestor. *AoB Plants* 7:121-1-8.
- Gueritaine, G., M. Sester, F. Eber, M. Chevre, y H. Darmency. 2002. Fitness of backcross six of hybrids between transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Molecular Ecology* 11:1419–26.
- Guo, J., Y. Wang, C. Song, J. Zhou, L. Qiu, H. Huang, y Y. Wang. 2010. A single origin and moderate bottleneck during domestication of soybean (*Glycine max*): implications from microsatellites and nucleotide sequences. *Annals of Botany* 106:505–514.
- Gutierrez, A., M. Cantamutto, y M. Poverene. 2011. Persistence of sunflower crop traits and fitness in *Helianthus petiolaris* populations. *Plant Biology* 13:821–830.
- Harter, A. V., K. A. Gardner, D. Falush, D. L. Lentz, R. A. Bye, y L. H. Rieseberg. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature* 430:201–205.
- Hassink, J., J. H. O. Voshaar, E. H. Nuhuis, y J. A. Van Veen. 1991. Dynamics of the microbial populations of a reclaimed-polder soil under a conventional and a reduced-input farming system. *Soil Biology and Biochemistry* 23:515–524.

- Hilbeck, A., M. Meier, J. Römbke, S. Jänsch, H. Teichmann, y B. Tappeser. 2011. Environmental risk assessment of genetically modified plants - concepts and controversies. *Environmental Sciences Europe* 23:13.
- Hooftman, D. A. P., A. J. Flavell, H. Jansen, H. C. M. den Nijs, N. H. Syed, A. P. Sørensen, P. Orozco-ter Wengel, y C. C. M. van de Wiel. 2011. Locus-dependent selection in crop-wild hybrids of lettuce under field conditions and its implication for GM crop development. *Evolutionary Applications* 4:648–659.
- Huang, X., N. Kurata, X. Wei, Z.-X. Wang, A. Wang, Q. Zhao, Y. Zhao, K. Liu, H. Lu, W. Li, Y. Guo, Y. Lu, C. Zhou, D. Fan, Q. Weng, C. Zhu, T. Huang, L. Zhang, Y. Wang, L. Feng, H. Furuumi, T. Kubo, T. Miyabayashi, X. Yuan, Q. Xu, G. Dong, Q. Zhan, C. Li, A. Fujiyama, A. Toyoda, T. Lu, Q. Feng, Q. Qian, J. Li, y B. Han. 2012. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature* 490:497–501.
- James, C. 2013. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013*. ISAAA, Ed. ISAAA Brie. Ithaca, NY.
- Johnson, K., A. Raybould, M. Hudson, y G. Poppy. 2007. How does scientific risk assessment of GM crops fit within the wider risk analysis? *Trends in Plant Science* 12:1–5.
- de Jong, T. J., and J. Rong. 2013. Crop to wild gene flow: Does more sophisticated research provide better risk assessment? *Environmental Science & Policy* 27:135–140.
- Kareiva, P., W. Morris, and C. M. Jacobi. 1994. Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3:15–21.
- Kwit, C., H. S. Moon, S. I. Warwick, y C. N. Stewart. 2011. Transgene introgression in crop relatives: molecular evidence and mitigation strategies. *Trends in Biotechnology* 29:284–93.
- Londo, J. P., N. S. Bautista, C. L. Sagers, E. H. Lee, y L. S. Watrud. 2010. Glyphosate drift promotes changes in fitness and transgene gene flow in canola (*Brassica napus*) and hybrids. *Annals of Botany* 106:957–65.
- Lu, B.-R. 2013. Introgression of transgenic crop alleles: Its evolutionary impacts on conserving genetic diversity of crop wild relatives. *Journal of Systematics and Evolution* 51:245–262.
- Lu, B.-R., y C. Yang. 2009. Gene flow from genetically modified rice to its wild relatives: Assessing potential ecological consequences. *Biotechnology Advances* 27:1083–1091.

- Mallory-Smith, C., y M. Zapiola. 2008. Gene flow from glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 64:428–440.
- Maxted, N., B.V.Ford-Lloyd y S. P. Kell. 2008. Crop wild relatives: establishing the context,” en: N. Maxted, B. V. Ford-Lloyd, S. P. Kell, J. Iriondo, E. Dulloo y J. Turok eds., *Crop wild relative conservation and use*, CABI Publishing, Wallingford.
- Messeguer, J., G. Peñas, J. Ballester, M. Bas, J. Serra, J. Salvia, M. Palaudelmàs, y E. Melé. 2006. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnology Journal* 4:633–645.
- Mizuguti, A., K. Ohigashi, Y. Yoshimura, A. Kaga, Y. Kuroda, y K. Matsuo. 2010. Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research* 9:13–23.
- Monteiro, F., M. M. Romeiras, D. Batista, y M. C. Duarte. 2013. Biodiversity assessment of sugar beet species and Its wild relatives: linking ecological data with new genetic approaches. *American Journal of Plant Sciences* 4:21–34.
- Morrell, P. L., T. D. Williams-Coplin, A. L. Lattu, J. E. Bowers, J. M. Chandler, y A. H. Paterson. 2005. Crop-to-weed introgression has impacted allelic composition of johnsongrass populations with and without recent exposure to cultivated sorghum. *Molecular Ecology* 14:2143–54.
- Nap, J.-P., P. L. J. Metz, M. Escaler, y A. J. Conner. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part I. Overview of current status and regulations. *The Plant Journal* 33:1–18.
- Nicolia, A., A. Manzo, F. Veronesi, y D. Rosellini. 2014. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Critical Reviews in Biotechnology* 34:77–88.
- Ortiz-García, S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberón, y A. Snow. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003-2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12338–43.
- Piñeyro-Nelson, a, J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernández, A. Rangel, M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante, y E. R. Alvarez-Buylla. 2009. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology* 18:750–61.

- Qaim, M. 2009. The Economics of genetically modified crops. *Annual Review of Resource Economics* 1:665–694.
- Quist, D., e I. H. Chapela. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414:541–3.
- Reichman, J. R., L. S. Watrud, E. H. Lee, C. A. Burdick, M. A. Bollman, M. J. Storm, G. A. King, y C. Mallory-Smith. 2006. Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagronomic habitats. *Molecular Ecology* 15:4243–55.
- Ryffel, G. U. 2014. Transgene flow: Facts, speculations and possible countermeasures. *GM Crops & Food* 5:249–258.
- Sanjur, O. I., D. R. Piperno, T. C. Andres, y L. Wessel-Beaver. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:535–40.
- Sanvido, O., J. Romeis, A. Gathmann, M. Gielkens, A. Raybould, y F. Bigler. 2012. Evaluating environmental risks of genetically modified crops: ecological harm criteria for regulatory decision-making. *Environmental Science & Policy* 15:82–91.
- Sasu, M. A., M. J. Ferrari, D. Du, J. A. Winsor, y A. G. Stephenson. 2009. Indirect costs of a nontarget pathogen mitigate the direct benefits of a virus-resistant transgene in wild *Cucurbita*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:19067–71.
- Sasu, M. A., I. Seidl-Adams, K. Wall, J. A. Winsor, y A. G. Stephenson. 2010. Floral transmission of *Erwinia tracheiphila* by cucumber beetles in a wild *Cucurbita pepo*. *Environmental Entomology* 39:140–8.
- Schmidt, M., y G. Bothma. 2006. Risk assessment for transgenic sorghum in Africa: crop-to-crop gene flow in (*L.*) Moench. *Crop Science* 46:790.
- Snow, A. A., D. A. Andow, P. Gepts, E. M. Hallerman, A. Power, J. M. Tiedje, y L. L. Wolfenbarger. 2005. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecological Applications* 15:377–404.

- Snow, A. A., D. Pilson, L. H. Rieseberg, M. J. Paulsen, N. Pleskac, M. R. Reagon, D. E. Wolf, and S. M. Selbo. 2003. A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecological Applications* 13:279–286.
- Song, X., Z. Wang, y S. Qiang. 2011. Agronomic performance of F₁, F₂ and F₃ hybrids between weedy rice and transgenic glufosinate-resistant rice. *Pest Management Science* 67:921–31.
- Spencer, L. J., y A. A. Snow. 2001. Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 86:694–702.
- Stewart, C. N., M. D. Halfhill, y S. I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews. Genetics* 4:806–17.
- Tepfer, M., M. Racovita, y W. Craig. 2013. Putting problem formulation at the forefront of GMO risk analysis. *GM Crops & Food* 4:10–15.
- Tiedje, J., R. Colwell, y Y. Grossman. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 298-315.
- USDA. 1994. Response to the Upjohn Company/Asgrow seed company petition 92-204-01 for determination of nonregulated status for ZW-20 Squash. Washington, DC: USDA.
- Warwick, S. I., A. Légère, M.-J. Simard, y T. James. 2008. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17:1387–95.
- Warwick, S. I., M.-J. Simard, A. Légère, H. J. Beckie, L. Braun, B. Zhu, P. Mason, G. Séguin-Swartz, y C. N. Stewart. 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* 107:528–39.
- Wegier, A., A. Piñeyro-Nelson, J. Alarcón, A. Gálvez-Mariscal, E. R. Alvarez-Buylla, y D. Piñero. 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* 20:4182–94.
- Wei-Xiang, W., Y. Qing-Fu, M. Hang, D. Xue-jun, y J. Wen-Ming. 2004. Bt-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in a flooded paddy soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36:289–295.

- Wendel, J. F., y C. E. Grover. 2015. Taxonomy and evolution of the cotton genus, *Gossypium*. Cotton. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI.
- de Wet, J. M. J., y J. P. Huckabay. 1967. The Origin of Sorghum bicolor. II. Distribution and Domestication. *Evolution* 21:787-802.
- Whitton, J., D. E. Wolf, D. M. Arias, A. A. Snow, y L. H. Rieseberg. 1997. The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 95:33–40.
- Wolfenbarger, L. L., y A. P. R. Phifer. 2000. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* 290:2088–2093.
- Yan, S., J. Zhu, W. Zhu, Z. Li, A. M. Shelton, J. Luo, J. Cui, Q. Zhang, y X. Liu. 2015. Pollen-mediated gene flow from transgenic cotton under greenhouse conditions is dependent on different pollinators. *Scientific Reports* 5:15917.
- Yang, X., F. Wang, J. Su, y B.-R. Lu. 2012. Limited fitness advantages of crop-weed hybrid progeny containing insect-resistant transgenes (Bt/CpTI) in transgenic rice field. *PloS one* 7:e41220.
- Yang, X., H. Xia, W. Wang, F. Wang, J. Su, A. A. Snow, y B.-R. Lu. 2011. Transgenes for insect resistance reduce herbivory and enhance fecundity in advanced generations of crop-weed hybrids of rice. *Evolutionary applications* 4:672–684.
- Zapiola, M. L., y C. A. Mallory-Smith. 2012. Crossing the divide: gene flow produces intergeneric hybrid in feral transgenic creeping bentgrass population. *Molecular Ecology* 21:4672–80.

CAPÍTULO II

HIBRIDACIÓN ENTRE CULTIVARES TRANSGÉNICOS DE *Cucurbita pepo* Y EL PARIENTE SILVESTRE *Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia*.

INTRODUCCIÓN

El flujo génico entre cultivares y sus parientes silvestres está registrado para varios cultivos (Ellstrand 1999). Estos hechos dieron sustento al cuestionamiento del posible flujo génico de transgenes hacia poblaciones de parientes silvestres y que la liberación de cultivos modificados condujera a la introgresión del transgene (Pilson y Prendeville 2004, Chapman y Burke 2006).

Los cuestionamientos incrementaron con las primeras evidencias de escape de transgenes desde cultivares GM hacia poblaciones silvestres; como ocurrió con la canola (*Brassica napus*) modificada con resistencia a herbicida (Warwick et al. 2003, Warwick et al. 2008), con el césped (*Agrostis stolonifera*) usado en campos de golf que fue modificado con resistencia a herbicida (Reichman et al. 2006), con el algodón (*Gossypium hirsutum*) resistente a herbívoros (Wegier et al. 2011). Además, está el controvertido caso del maíz (*Zea mays*, Quist y Chapela 2001, Ortiz-García et al. 2005), en el cual los análisis recientes confirman la presencia de secuencias transgénicas en razas locales de maíz. El tema es importante, ya que en este sitio de origen y domesticación no está aprobada la liberación comercial de maíz GM (Piñeyro-Nelson et al. 2009). Estos ejemplos muestran la dificultad para contener los

transgenes en las áreas de cultivo y evitar su escape una vez que el cultivar GM es liberado al ambiente (Marvier y Van Acker 2005). Sea que estos casos de escape representen las fases iniciales de hibridación o de introgresión (Kwit et al. 2011), las consecuencias se pueden volver complejas rápidamente. Así sucedió con el césped *Agrostis stolonifera* con resistencia a herbicida, pocos años después de su escape el transgene se transfirió a otro pasto feral a través de una hibridación intergenérica, (*Polypogon monspeliensis*, Zapiola y Mallory-Smith 2012).

Para que un transgene se establezca en una población silvestre vía polen, debe ocurrir una serie de eventos que involucren al cultivar GM y su pariente silvestre tales como: el flujo génico, hibridación y selección positiva sobre la característica transgénica (Wolfenbarger y Phifer 2000, Chapman y Burke 2006, Kwit et al. 2011). La efectividad del flujo dependerá del traslape espacial y temporal que permita la polinización entre cultivares GM y las plantas silvestres. Posteriormente, el establecimiento del transgene dependerá de la formación de híbridos y de la adecuación que presenten (Wolfenbarger y Phifer 2000, Chapman y Burke 2006, Kwit et al. 2011). Además, en la fase de hibridación se requiere que el transgene permanezca funcional, que sea transmitido eficientemente a través de generaciones sucesivas de retrocruzamientos o autofertilizaciones. Para que ocurra una asimilación estable del transgene durante la recombinación entre los genomas híbridos y silvestres, la secuencia transgénica no debe tener rupturas, de lo contrario se impediría la introgresión (Jorgensen et al. 2009). Finalmente para que la introgresión del transgene se cumpla, éste debe transmitirse entre generaciones de retrocruzantes sin ser purgado (Stewart et al. 2003, Kwit et al. 2011).

La asimilación del transgene en una población silvestre es una condición necesaria, pero no suficiente para la formación de híbridos (Wolfenbarger y Phifer 2000, Chapman y Burke 2006, Kwit et al. 2011), por lo cual debemos considerar la adecuación de los híbridos,

que generalmente está disminuida comparada con los parentales (Arnold 1997). Sin embargo, algunas ocasiones la adecuación de los híbridos puede igualar o superar a las progenies no híbridas de cada una de las especies parentales (Arnold y Hodges 1995, Burke y Arnold 2001, Rhode y Cruzan 2005). El desempeño reproductivo de los híbridos influirá la dispersión del transgene en una población silvestre (Hails y Morley 2005); una alta adecuación facilitará la formación de generaciones avanzadas de híbridos, por el contrario los híbridos estériles obstaculizarían la transferencia del transgene entre generaciones (Guerintaine et al. 2002, Hooftman et al. 2008). En este punto adquiere importancia el conocimiento de las características que influyen tanto en la fertilidad como en la supervivencia de los híbridos, ya que ello permitiría estimar la frecuencia de alelos de los cultivares en generaciones híbridas subsecuentes al escape (Cummings et al. 2002).

Para la determinación del riesgo de liberación de un cultivar GM, el conocimiento detallado de los procesos antes mencionados es importante, en particular para cultivares GM cuya característica incluida mediante ingeniería genética podrían representar una ventaja adaptativa fuera del campo agrícola, la cual podría facilitar su permanencia en las poblaciones silvestres. Un ejemplo de cultivos GM cuya característica puede ser ventajosa es la resistencia a virus, ya que los organismos portadores del transgene que produzcan fenotipos con mejor desempeño en su respuesta a virus pueden tener mayor adecuación que los no portadores. Hay variedades comerciales en dos especies de cultivos que expresan esta resistencia a virus; la calabaza (*Cucurbita pepo*) y la papaya (*Carica papaya*) y que fueron de los primeros cultivares GM en ser desregulados comercialmente en EUA (APHIS 1994). En este caso la evaluación del flujo génico es pertinente ya que durante el proceso de desregulación de las calabazas transgénicas en EUA, el servicio de inspección de salud animal y vegetal de ese país (APHIS) no consideró el posible efecto sobre otros parientes silvestres que se distribuyen

fuera de sus fronteras (NRC 2002). Las incógnitas más evidentes sobre el transgene de resistencia a virus en poblaciones silvestres giran alrededor de la capacidad que tendría para convertirlas en plantas invasoras (Wolfenbarger y Phifer 2000, Pilson y Prendeville 2004, Snow et al. 2005) o la probabilidad de una recombinación entre las secuencias transgénicas y los genomas virales. Esto podría tener consecuencias como alteraciones en la amplitud de hospederos que pueden infectar un virus o cambios en la capacidad de infección (virulencia, Pilson y Prendeville 2004). Finalmente se desconoce si la presencia del transgene puede alterar la variabilidad genética de las poblaciones silvestres (Gepts y Papa 2003). Estas interrogantes son importantes para los centro de origen de cultivos, ya que en esos sitios se deben considerar medidas precautorias que permitan conservar la variabilidad genética de los parientes silvestres sobre todo porque el flujo génico es un proceso irreversible (Engels et al. 2006).

El uso de cultivares de *C. pepo* transgénicos con resistencia a virus (TRV) en el centro de origen y domesticación del género *Cucurbita* puede tener consecuencias en la variabilidad genética de los parientes silvestres (Gepts y Papa 2003, Jenczewski et al. 2003, Stewart et al. 2003, Engels et al. 2006). Debido a que no existen estudios que exploren la capacidad de hibridación de *C. pepo* con parientes silvestres no directamente emparentados, aquí se aborda la siguiente pregunta ¿el transgene de resistencia a virus puede establecerse en el sitio centro de origen y diversificación del género *Cucurbita*? Para los centros de origen es una prioridad el conocimiento de la capacidad de hibridación de cultivares GM con los diferentes parientes (Warwick 2003, FitzJhon et al. 2007). En el caso de *C. pepo* GM, sólo se probó con el pariente silvestre directo (Spencer y Snow 2001), pero hay evidencia de que este cultivar puede cruzarse con otras especies (Merrick 1990, Arriaga et al. 2006). La información sobre la capacidad de formación de híbridos, la determinación de la paternidad y su desempeño pueden

ayudar a dilucidar la posibilidad de permanencia del transgene en poblaciones silvestres ubicadas en el centro de origen del género *Cucurbita*.

Aquí presento los resultados de un estudio experimental de hibridación entre dos especies de calabaza; un cultivar de zucchini *Cucurbita pepo* transgénico con resistencia a virus y una especie silvestre de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia*), que está emparentada no directamente al cultivar transgénico (Sanjur et al. 2002). Esta especie tiene una amplia distribución en México, centro de origen y domesticación (Decker-Walters 1990, Merrick 1990). Evaluar la posible hibridación con esta especie silvestre es importante, ya que puede servir como un puente génico para la transferencia del transgene hacia otras especies de calabaza (Montes-Hernández y Eguiarte 2002, Felber et al. 2007).

MÉTODOS

Parental silvestre

Cucurbita argyrosperma ssp. *sororia*. (L. H. Bailey) es una herbácea rastrera o trepadora nativa de México y Centroamérica con crecimiento indeterminado, monoica, protándrica y autocompatible (Merrick 1990). Se encuentra en floración desde junio hasta enero, sus flores son unisexuales de forma campanulada, de color amarillo o crema. Las flores estaminadas frecuentemente son más grandes y producen menos néctar que las pistiladas, en la antesis ambas flores abren durante las primeras horas de la mañana. Sus principales polinizadores son las abejas solitarias oligolécticas de los géneros *Peponapis* y *Xenoglossa* (Hurd 1971, Mariano 2001). Puede producir frutos de tipo pepo, globosos o piriformes, con cáscara rígida, los cuales pueden tener aproximadamente 250 semillas o más (Merrick 1990).

Son atacadas por herbívoros del género *Acalymma* y *Diabrotica* (Chrysomelidae), los cuales son atraídos por los triterpenoides tetracíclicos (cucurbitacinas) característicos del género (Metcalf y Rhodes 1990).

Merrick y Bates (1989) propusieron que en esta especie se forma un complejo taxonómico constituido por dos subespecies: *C. argyrosperma* ssp. *argyrosperma* es la variedad cultivada y *C. argyrosperma* ssp. *sororia* es la forma silvestre. Un estudio de relaciones filogenéticas del género *Cucurbita* que utilizó ADN mitocondrial, demostró que *C. argyrosperma* ssp. *sororia* es el ancestro de la especie cultivada *C. argyrosperma* ssp. *argyrosperma* (Sanjur et al. 2002). Cruzamientos experimentales entre *C. argyrosperma* ssp. *sororia* y *C. pepo* demostraron que entre estas especies hay compatibilidad reproductiva, debido a que pueden producir semillas viables (Merrick, 1990). En condiciones naturales puede ocurrir flujo génico entre la subespecie domesticada y la silvestre de *C. argyrosperma*. (Montes-Hernández y Eguiarte 2002).

Parental domesticado

Cucurbita pepo L. es un cultivo importante a nivel mundial, cuyas plantas son monoicas con flores tubulares y corolas campanuladas de color amarillo-naranja. Sus flores son unisexuales, abren por la mañana y son polinizadas por abejas solitarias del género *Peponapis* y *Xenoglossa* (Hurd et al. 1971) y por la abeja común (*Apis*). Típicamente produce entre 20 y 30 flores estaminadas por 8 a 12 flores pistiladas de las cuales de 2 a 6 se convierten en frutos. En las áreas de cultivo de calabaza, es común encontrar como polinizadores a abejas de los géneros *Apis*, *Peponapis*, *Bombus* (Artz y Nault 2011). Algunas variedades de la calabaza tipo zucchini fueron modificadas mediante ingeniería genética, la línea modificada CZW-3 fue desarrollada con técnicas de recombinación de ADN para incluir genes de resistencia a tres tipos de virus; el virus mosaico del pepino (CMV), el virus mosaico amarillo

del zucchini (ZYMV) y el virus mosaico de la sandía (WMV-2). Las secuencias incluidas en esas variedades codifican para la expresión de una proteína de la cubierta de cada virus que le otorga resistencia a la planta (Tricoll et al. 1995), tiene además como marcador genético el gen de neomicina fosfotransferasa (NPTII) y la secuencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Este último, activa la expresión de las 3 secuencias de proteínas de cubierta que dan resistencia contra los tres tipos de virus (Tricoll et al. 1995). La variedad transgénica Liberator III[®] con resistencia a virus tiene un crecimiento arbustivo, produce frutos amarillos, alargados (12 a 15 cm de largo) con un pequeño estrangulamiento cerca de la zona del pedúnculo, estos frutos maduran cerca de los 41 días (SEMINIS).

Población experimental

Para realizar este trabajo experimental obtuve una población híbrida a partir del cruzamiento unidireccional desde un cultivar genéticamente modificado (*Cucurbita pepo* var. Liberator III[®]) hacia una calabaza silvestre (*C. argyrosperma* spp *sororia*) no directamente emparentada con el cultivar. Elegí esta dirección porque es la más probable para el escape del transgene hacia la población silvestre vía polen y porque las cruas en la dirección contraria no producen semillas (Merrick 1990).

En la primavera del 2007 sembré en invernadero 240 semillas de plantas silvestres colectadas de 10 poblaciones naturales de la región de Chamela, Jalisco. También sembré 50 semillas de calabazas modificadas genéticamente, las cuales se mantuvieron en invernadero durante todo el experimento. Las plantas transgénicas se sembraron en macetas con un volumen de 30 litros; adicionalmente 3 semanas después sembré otros tres grupos de 10 semillas de plantas transgénicas para asegurar la presencia de polen durante todo el periodo de

floración de las plantas silvestres. Los individuos adultos de plantas GM sólo fueron utilizados como donadores de polen.

Por otra parte cuando las plántulas de la especie silvestre produjeron su tercera hoja verdadera se trasplantaron 110 plántulas a una parcela experimental ubicada dentro del campus del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM (Campus Morelia). Durante los primeros dos meses esas plantas juveniles se mantuvieron diariamente con riego en la parcela hasta el inicio de la época de lluvias. Ya en la época de lluvia, mantuve la parcela experimental deshierbada hasta que finalizó el ciclo de vida de las silvestres.

Diseño experimental: F₁

Una vez que las plantas silvestres alcanzaron su madurez reproductiva inicié las cruza. El diseño para obtener la F₁ consistió en utilizar plantas silvestres y plantas transgénicas como donadoras de polen y como plantas receptoras de polen, únicamente utilicé calabazas silvestres. El diseño tuvo cuatro tratamientos, el primero incluyó únicamente polen transgénico, en él saturé el estigma de flores silvestres con más de 1000 granos. En los tratamientos restantes, apliqué cargas mixtas con polen de transgénico y de silvestre. En esos tratamientos representé tres diferentes proporciones, siempre fue mayor la cantidad de polen de transgénica que de plantas silvestres; 15:1, 7:1, 3:1 (15 veces más polen de plantas transgénicas que polen de plantas silvestres, etc.). Ver tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos de cargas de polen usadas en experimento de cruza manual entre *C. pepo* transgénica y *C. argyrosperma* ssp. *sororia* para obtener la F_1 .

Polen transgénico <i>C. pepo</i>	Polen silvestre <i>C. argyrosperma sororia</i>	Proporción	Tratamiento
1000 granos aprox.	0	Saturación	1
300 granos aprox.	20 granos aprox.	15:1	2
280 granos aprox.	40 granos aprox.	7:1	3
240 granos aprox.	80 granos aprox.	3:1	4

Esas proporciones de cargas de polen mixtas, fueron realizadas así debido a que un trabajo previo (Medina datos no publicados), demostró que las cargas con proporciones similares entre polen silvestre y transgénico, no producían híbridos con el transgene. Por otra parte, la cantidad de polen depositado, aseguró la fertilización de la mayoría de los óvulos (262 ± 34 , $n=5$). Para obtener cargas de polen mixtas con distintas proporciones, utilicé pequeñas varillas de metal de diferentes diámetros (0.51 mm, 0.75 mm, 1.07 mm, 2.13 mm y 3.15 mm). Realicé una estandarización de la cantidad de polen que cabía en la superficie plana circular del extremo de cada varilla, para lo cual conté los granos con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los promedios del número de granos en las cargas de polen fueron de 305 ± 52 (media y desviación estándar) granos de polen de plantas transgénicas por 18 ± 6 granos de plantas silvestres para el tratamiento de 15:1; de 283 ± 42 granos de polen de transgénicas por 36 ± 11 granos de polen silvestre para el tratamiento de 7:1 y de 233 ± 23 granos de polen transgénico por 75 ± 11 granos de polen silvestre en el tratamiento 3:1.

Para asegurar el control de la polinización, diariamente (junio-septiembre de 2007) revisé cada una de las 101 plantas silvestres que llegaron a la etapa adulta en la parcela experimental, mientras que las plantas transgénicas las revisé en el invernadero. La tarde del día previo a la antesis, cerré con alambre plastificado cada una las flores femeninas de plantas silvestres que abrirían al día siguiente (la coloración crema es evidente en las flores que maduran la mañana siguiente). Cerré un mínimo de 5 flores estaminadas de plantas transgénicas y 5 flores masculinas de distintas plantas silvestres para usar su polen en las cruza manuales. La mañana siguiente colecté el polen de los donadores transgénicos y silvestres. El polen de las plantas silvestres se mezcló en un recipiente plástico y en otro se mezcló el polen de las plantas transgénicas. De cada recipiente tomé granos de polen con ayuda de las diferentes varillas para realizar la polinización en flores pistiladas silvestres cerradas el día previo. Las flores donde realicé las cruza manuales fueron etiquetadas con laminillas de aluminio. El resto de la temporada, seguí en desarrollo de todos los frutos y finalmente aquellos que lograron madurar fueron colectados en noviembre de 2007.

Al inicio del 2008, extraje y limpié las semillas de cada fruto que alcanzó la madurez, determiné la maduración de las semillas por su peso (en una balanza Ohaus; Explorer E12140). En marzo del 2008, las semillas viables de cada tratamiento se sembraron individualmente en cámara de germinación (Conviron E15) y posteriormente se trasladaron al invernadero (5300 semillas).

F₂ y retrocruzas

Durante abril de 2008, trasplanté en la parcela experimental un máximo de 30 plántulas por cada fruto obtenido de la temporada anterior, a partir de ese momento hice las prácticas de mantenimiento en la parcela experimental de la misma manera que el año previo. A principios de julio, y una vez que las plantas híbridas F₁ llegaron a la fase reproductiva, inicié con las cruzas manuales. En esta fase le di prioridad al tratamiento de saturación que contenía sólo polen híbrido, con ello traté de asegurar la producción de frutos para obtener la F₂.

Para conseguir la F₂ realicé dos tipos de cruzas (julio-septiembre 2008), en las cuales consideré la presencia o ausencia del promotor 35S en los híbridos F₁ (ver más adelante). En el primer tipo de cruzas, los híbridos no transgénicos (en adelante HNT) fueron los receptores de polen, mientras que los híbridos transgénicos (en adelante HT) fueron los donadores del mismo. En lo sucesivo referiré esta crusa como (HNT x HT). En el segundo tipo de crusa los híbridos transgénicos (HT) fueron receptores de polen de otros individuos híbridos transgénicos (HT). En adelante este tipo de crusa la nombraré: (HT x HT).

Durante la etapa reproductiva de la generación F₁, revisé diariamente cada una las plantas híbridas y cerré aquellas flores masculinas y femeninas que abrirían al día siguiente y que serían utilizadas en la cruzas manuales (julio- septiembre 2008). Realicé las cruzas manuales de saturación de la misma forma que el año anterior, mezclando polen de al menos 5 plantas F₁ de diferentes familias (frutos) en un recipiente plástico. Posteriormente, con ayuda de una antera libre de polen, saturé el estigma de las plantas híbridas receptoras. Etiqueté con papel aluminio las flores en las que se realizaron las cruzas.

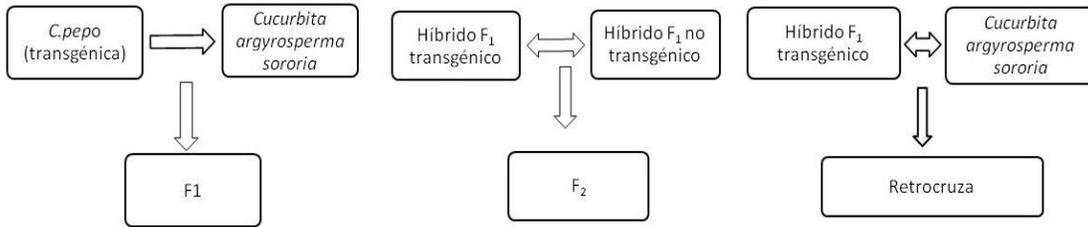


Figura 1. Diagrama general de las cruzas realizadas para obtener las dos generaciones híbridas y una generación de retrocruzantes. Las flechas horizontales indican la dirección de la cruce y las verticales el tipo de progenie obtenida.

Para obtener la generación de retrocruzantes, realicé dos tipos de cruzas de saturación de polen. En la primera, las plantas híbridas F_1 que llevaban el transgene (HT) actuaron como receptoras de polen de plantas silvestres de *C. argyrosperma* ssp. *sororia* (en adelante S). Esta cruce la indicaré como (HT x S). En el otro tipo de cruce, las plantas silvestres fueron las receptoras y los híbridos F_1 que portaban el transgene de resistencia a virus actuaron como donadores. Haré referencia a este tipo de cruce como (S x HT). De la misma manera como hice en las cruces de saturación para obtener la F_1 y F_2 , mezclé polen de por lo menos 5 diferentes donadores para depositarlo en los estigmas.

Análisis de paternidad

La variedad transgénica de plantas tipo zucchini, Liberator III[®] fue apropiada para realizar el experimento de paternidad debido a que permitió detectar la presencia y expresión de las secuencias del transgene en cada una de las plantas de las generaciones híbridas F_1 , F_2 y de los retrocruzantes. Esto es posible, ya que al interior del casete introducido por ingeniería genética, se encuentra la secuencia del gen de neomicina fosfotransferasa (NPTII), usado como marcador genético, además de la secuencia del gen promotor de 35S del virus del

mosaico de la coliflor (35S CaMV), el cual activa la expresión de las 3 secuencias de proteínas de cubierta que otorgan resistencia contra los tres tipos de virus- (Tricoll et al. 1995). Figura. 2.



Figura 2. Esquema simplificado del casete transgénico que muestra las secuencias del gen marcador (NPTII), del gen de resistencia al virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV), virus mosaico de la sandía (WMV-2) y del virus mosaico del pepino (CMV), en calabazas modificadas genéticamente. Modificado de Tricoll et al. 1995.

ELISA

La proteína expresada por el gen marcador de la neomicina fosfotransferasa NPTII, la detecté realizando ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Para ello tomé muestras de la 6ª hoja de cada una de las plántulas, corté 0.600g de tejido que molí en buffer de extracción con ayuda de una multiherramienta (Dremel Mod. 395T6). Esos extractos fueron sometidos al ensayo ELISA utilizando un kit comercial específico (AGDIA®) para detectar la proteína NPTII expresada en los organismos genéticamente modificados. El ensayo se basa en la utilización de un anticuerpo doble (ELISA DAS) y otro marcado con una enzima (peróxidasa), los conjugados de estos últimos presentan una actividad enzimática de tal manera que, al adicionar un sustrato reacciona produciendo un cambio de color observable. Los anticuerpos dobles reaccionan en presencia de la proteína NPTII, permitiendo determinar la expresión del gen transgénico (Tricoll et al. 1995, Mc Kenzie et al. 2000). Seguí el procedimiento de la prueba conforme lo indica el fabricante (AGDIA®), al finalizar la prueba

un vire del color en la muestra fue registrado como resultado positivo, muestras sin cambio fueron tomados como resultados negativos a la expresión del gen marcador.

PCR

Por otra parte, para determinar la presencia del gen promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV), hice amplificaciones de esa secuencia usando PCR "punto final". De cada una de las plántulas, tomé una muestra de tejido (6ª hoja) para realizar extracción de ADN; corté 0.06g de tejido que fue molido con morteros y pistilos en nitrógeno líquido; utilicé el método CTAB para la extracción de ADN.

Los oligonucleótidos usados para amplificación de la secuencia del promotor 35S fueron 5 minutos -3 minutos GCT CCT ACA AAT GCC ATC A y 3'-5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA (Lipp et al. 1999). Realicé la amplificación de ADN de cada muestra en un termociclador para PCR (GenAmp 9700) usando el siguiente programa; 94°C por 1 minuto, después a 94°C por 45", posteriormente a 65°C por 65" y seguido de 72°C por 45", repetidos durante 35 ciclos, finalmente las muestras se mantuvieron a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados usando un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en el gel se registró la presencia/ausencia del amplicón con un tamaño de 195 pares de bases que corresponde al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Lipp et al. 1999). No obstante que la técnica de PCR para amplificar secuencias del promotor 35S, se utiliza principalmente como un método de tamizado en la detección de organismos genéticamente modificados para tamaño de muestra grande (Hoslt et al. 1993), también ha sido utilizado para detecciones individuales (Tricoll et al. 1995).

Vigor de los híbridos

Para evaluar la posibilidad que tienen los híbridos y retrocruzantes de persistir posteriormente a la fertilización estudié su desempeño. Contrasté el desempeño de las generaciones híbridas en relación al desempeño del parental transgénico y del parental silvestre. Para ello, cuantifiqué dentro del invernadero en una submuestra aleatoria de plantas híbridas y retrocruzantes el porcentaje de germinación de semillas, los días para germinar y el área foliar 14 días después de germinar. Después de trasplantar en la parcela experimental y una vez que las plantas llegaron a la etapa reproductiva, evalué la sobrevivencia (realicé un censo a la mitad de la etapa reproductiva, en septiembre). Durante toda la fase reproductiva evalué la fertilidad de los híbridos y retrocruzantes, cuantificando la producción de flores masculinas y la producción de flores femeninas, la viabilidad del polen, excepto para la cruce entre híbridos F_1 (HNT x HT) y la retrocruza F_2 (HT x S); para realizar esta comparación utilicé la progenie de la generación F_1 que derivó del tratamiento de saturación, ya que tenía la certeza de que los individuos eran híbridos.

Con esos datos, calculé la tasa reproductiva por generación, utilicé los valores de fertilidad y fecundidad multiplicada por la supervivencia ($l \times m$). Con tales datos obtuve una tabla de vida simplificada con una sola cohorte. La fertilidad la obtuve dividiendo la producción total de semillas por generación por el número de plantas que supervivieron a la etapa reproductiva. La fertilidad masculina la obtuve como el producto de la producción de flores estaminadas, viabilidad del polen y los granos de polen producidos por flor dividido por el número de plantas supervivientes en la etapa reproductiva (utilicé la producción de granos de polen registrada para *C. pepo* de 28,016 granos Quesada et al. 1995). Esos valores los multipliqué por la proporción de supervivientes en la etapa reproductiva. Los datos de fertilidad de las plantas silvestres los obtuve, revisando una población silvestre (6 individuos)

al final de la temporada reproductiva, en la cual se produjeron 15 frutos de los que se contaron las semillas, mientras que la tasa de supervivencia la obtuve de las plantas sembradas en la parcela experimental.

Análisis estadístico

A partir del análisis de paternidad evalué la segregación mendeliana del transgene de resistencia a virus usando la prueba G de bondad de ajuste (Sokal y Rohlf, 1995). La prueba permitió determinar diferencias en la segregación esperada y la observada en la totalidad de la progenie y dentro de cada familia. Debido a que el transgene de resistencia a virus se comporta como un gen hemicigótico (Tricoll et al. 1995), las proporciones esperadas entre híbridos no transgénicos e híbridos transgénicos en la F_1 fueron de: 1:1 (tratamiento de saturación). Para las proporciones teóricas esperadas en los tratamientos con mezcla de polen, consideré la presencia de polen no transgénico en el organismo GM y en la planta silvestre en correspondencia al polen transgénico (Figura 3). Estas proporciones teóricas, considerando un gen hemicigótico fueron de 17:15 (plantas sin transgene: híbridos transgénicos para el tratamiento con mezcla de 15:1), 9:7 (plantas sin transgene: híbridos transgénicos para el tratamiento 7:1), 5:3 (plantas sin transgene: híbridos transgénicos para el tratamiento 3:1). En las progenies de la generación F_2 , la proporción esperada de híbridos transgénicos: híbridos no transgénicos fue 1:1 (HNT x HT) y de 3:1 (HT x HT). Mientras que en la progenie derivada de retrocruzadas puse a prueba la proporción entre retrocruzantes transgénicos: retrocruzantes no transgénicos de 1:1 para (HT x S) y (S x HT).

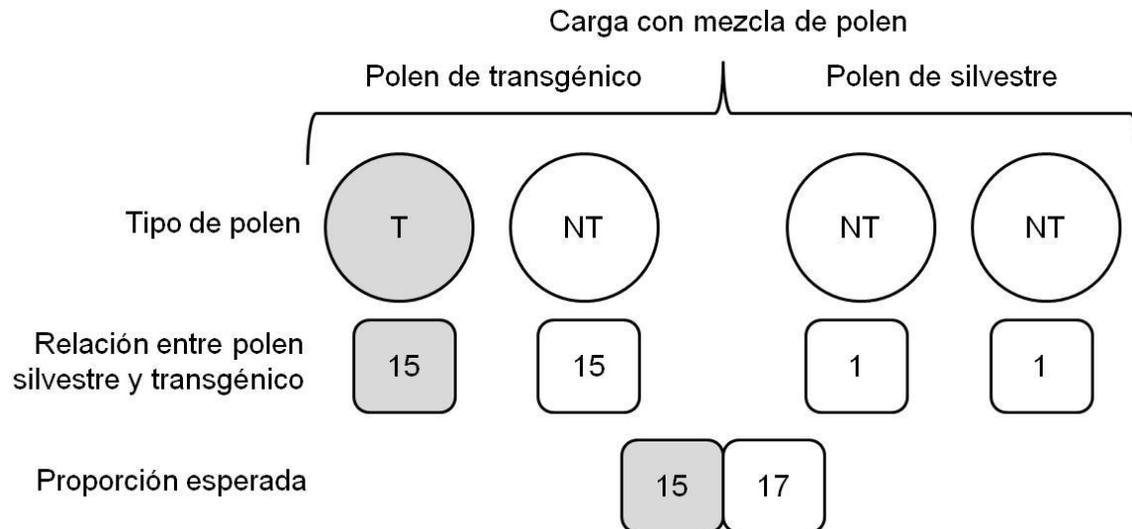


Figura 3. Proporción esperada en la progenie F_1 derivada de carga de polen con mezcla de polen transgénico y silvestre del tratamiento 15:1. El transgene de resistencia a virus es hemicigótico, es decir la mitad de los microgametos producidos por la planta GM portarán el transgene, mientras que la otra mitad no. Por su parte todos los microgametos de parental silvestre carecerán del transgene. Las figuras sombreadas representan los gametos o la proporción que corresponde al transgene. T= transgénico, NT= no transgénico.

Para evaluar el desempeño vegetativo y reproductivo entre líneas parentales, líneas híbridas y los retrocruzantes realicé un análisis de varianza usando un modelo lineal generalizado (GLM). Realicé comparaciones a posteriori entre líneas genéticas mediante la prueba de Tukey. También puse a prueba la homogeneidad entre líneas genéticas para la germinación de semillas, la sobrevivencia a la etapa adulta así como la viabilidad del polen realizando una prueba de X^2 . Una comparación a posteriori usando el procedimiento Marascuilo me permitió detectar diferencias entre proporciones de las líneas genéticas (Marascuilo 1971, Zar 1999).

Con los datos promedio de algunas variables del ciclo de vida de las generaciones híbridas, obtuve una tasa neta de reproducción simplificada que incluyera características de sobrevivencia y reproducción (como indicador de la capacidad de fertilidad de los híbridos y retrocruzantes). La tasa la obtuve para la función femenina y masculina como el producto de la probabilidad de supervivencia a la etapa reproductiva por la fecundidad respectiva.

$$\text{Fertilidad femenina} = \frac{\text{Total de semillas}}{\text{Total de plantas en estado reproductivo}}$$

$$\text{Fertilidad masculina} = \frac{\text{Producción de flores masculinas} \times \text{granos de polen por flor} \times \text{viabilidad de polen}}{\text{Total de plantas en estado reproductivo}}$$

Antes de realizar los análisis, determiné si la presencia del transgene genera alguna diferencia en el desempeño entre los híbridos que portan el transgene y los que no lo llevan. Esto lo determiné realizando un análisis multivariado (MANOVA) en la generación F₁ y F₂ y un análisis de varianza para la generación de retrocruzantes. Adicionalmente, probé si hubo diferencias en el desempeño entre las progenies derivadas de los distintos tratamientos de polinización que se utilizaron para obtener la generación F₁ (saturación, 15:1, 7:1, 3:1). Para cumplir con los supuestos de normalidad transformé las variables cuantificadas: el tiempo de germinación de semillas (Log₁₀), la producción de flores masculinas (1/raíz cuadrada), de flores femeninas (Log₁₀), el número de semillas (Log₁₀) y la masa de las semillas (raíz cuadrada). Los factores de variación fueron la presencia/ ausencia del transgene y el tratamiento de polinización manual. El área foliar de las plántulas no se analizó, ya que sólo se contó con datos para el tratamiento de saturación. Para la generación F₂, el análisis multivariado incluyó como variables el tiempo de germinación de las semillas, el área foliar

(Log₁₀), la producción de flores estaminadas y de flores pistiladas en las cuales realicé la misma transformación que en la F₁. El modelo incluyó como factores de variación el tipo de cruce (HNT x HT) o (HT x HT) y la presencia/ausencia del transgene en los progenie. Para las retrocruzas, la pequeña cantidad de individuos obtenidos para ambos tipos de retrocruza, impidió realizar un análisis multivariado, por lo que realicé un análisis univariado (GLM) para el tiempo de germinación de las semillas, el área foliar, la producción de flores estaminadas y pistiladas; de nueva cuenta las fuentes de variación fueron los dos tipos de retrocruzas que realicé (HT x S) y (S x HT) y la presencia/ausencia del transgene de resistencia en la progenie.

RESULTADOS

La compatibilidad sexual entre *Cucurbita pepo* modificadas genéticamente y el pariente silvestre distante *C. argyrosperma* ssp. *sororia*, me permitió obtener frutos y semillas viables en todos los tratamientos de la generación F₁, en los dos tipos de cruces para obtener la F₂ y en los dos tipos de retrocruzas. Tabla 2. Para el tratamiento de saturación de la F₁ con sólo polen transgénico, alrededor de un tercio de las cruces que realicé fueron exitosas en el sentido de formar frutos con semillas. En los tratamientos de competencia de polen silvestre-transgénico, entre una tercera y una cuarta parte de las polinizaciones manuales produjo frutos maduros. Mientras que para la F₂ la formación de frutos maduros ocurrió entre una décima parte y una sexta parte de las cruces realizadas. Por otra parte, en los retrocruzamientos la maduración de frutos sucedió entre una y dos quintas partes del total de las cruces realizadas.

Tabla 2. Tipo y número de cruza manuales hechas para obtener las generaciones híbridas F₁, F₂ y de retrocruzamiento así como el número de semillas obtenidas por tipo de cruza.

Generación	Tipo de cruza	Éxito de polinizaciones	Total de semillas producidas
F ₁	S x T (saturación)	32% (181)	3273
	15:1 (transgénico: silvestre)	23% (120)	752
	7:1 (transgénico: silvestre)	24% (90)	568
	3:1 (transgénico: silvestre)	33% (87)	1016
F ₂	HNT x HT (saturación)	15% (225)	3364
	HT x HT (saturación)	10% (182)	2016
Retrocruzamientos	HT x S (saturación)	18% (48)	1002
	S x HT (saturación)	44% (9)	391

HERENCIA DEL TRANSGENE

Generación F₁

El análisis genético de la progenie en las diferentes generaciones (F₁, F₂ y retrocruzantes), reveló la presencia del promotor 35S, además, de confirmar la expresión del gen marcador NPTII. En los cuatro diferentes tratamientos de cargas de polen a partir de los cuales obtuve la progenie F₁, encontré que el transgene de resistencia a tres diferentes virus no segregó en la proporción mendeliana esperada, esto al analizar en conjunto los datos de cada tratamiento, ni en el tratamiento de saturación (sólo polen transgénico), ($G = 76.98$, g.l. = 39, $P < 0.05$), ni en el tratamiento con mezcla de polen transgénico-silvestre 15:1 ($G = 34.25$, g.l. = 15, $P < 0.05$), ni en el tratamiento 7:1 ($G = 63.03$, g.l. = 11, $P < 0.05$), finalmente tampoco en la progenie del tratamiento 3:1 ($G = 97.34$, g.l. = 16, $P < 0.05$; Figura 4).

Sin embargo, cuando analicé por familias (fruto) dentro de cada tratamiento para obtener la F_1 , encontré que para un porcentaje grande de familias, la proporción observada de híbridos transgénicos ajustó con la proporción esperada. Para el tratamiento de saturación, el 85% de las familias ajustó al teórico esperado de 1:1, mientras que el restante 15% de las familias no ajustó. En la progenie derivada del tratamiento con mezcla de polen de 15:1, el 82% de las familias ajustó a la frecuencia esperada (17:15), lo cual contrasta con el 18% de las familias donde no ajustó. En el tratamiento de mezcla de polen 7:1, el 50% de las familias ajustaron al teórico esperado (9:7). Finalmente, en el tratamiento con mezcla de polen de 3:1, sólo el 35% de las familias ajustó a la frecuencia esperada (5:3) para híbridos transgénicos.

Figura 4.

Es probable que la proporción del total de familias que no ajustó al teórico esperado, haya causado que el valor total del estadístico G, no ajuste con el modelo de herencia mendeliano esperado en la F_1 . Encontré en la progenie F_1 para los cuatro tratamientos una menor frecuencia de híbridos portadores del transgene que de plantas no portadoras. También observé entre los tratamientos, que al disminuir la proporción entre polen transgénico y polen silvestre depositado, la diferencia entre la frecuencia de híbridos transgénicos y plantas no transgénicas aumentó.

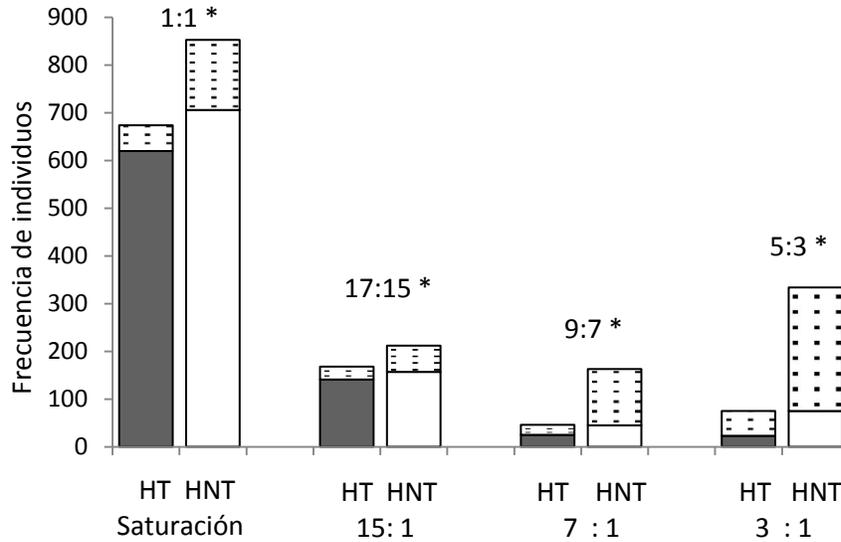


Figura 4. Herencia del transgene de resistencia a virus en la progenie F_1 derivada de cuatro tratamientos de polinización (saturación, 15:1, 7:1, 3:1). Las columnas sombreadas, indican los individuos con el transgene de resistencia a virus. Las columnas en blanco, indican los individuos sin el transgene. La parte superior punteada representa los individuos que no se ajustaron al esperado según la herencia mendeliana. Arriba de las barras se indica la proporción no transgénico:transgénico a prueba. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la herencia esperada y la observada.

F_2 y retrocruzas

Dentro de la generación F_2 , el transgene con resistencia a tres diferentes virus, no segregó en la proporción mendeliana considerando la totalidad de la progenie en los dos tipos de cruas. En las progenies derivadas de cruzamientos entre plantas híbridas F_1 no transgénicas receptoras de polen y plantas híbridas F_1 transgénicas donadoras (HNT x HT), no encontré un ajuste con la proporción teórica esperada 1:1 de híbridos F_2 con y sin el transgene ($G = 111.48$, g.l. = 25, $P < 0.05$). Tampoco dentro la progenie derivada de cruas con ambos

padres F_1 transgénicos (HT x HT) la herencia ajustó al esperado 3:1 ($G = 64.8$, g.l. = 18, $P < 0.05$). Figura 5.

Al igual que en la F_1 , un análisis por familias mostró que la mayoría de ellas ajustó con la herencia mendeliana. En la progenie F_2 derivada de la cruce (HNT x HT), el 71% de las familias ajustaron con la frecuencia esperada (1:1) de plantas con y sin el transgene. De manera semejante, el 63% de las familias de la cruce (HT x HT), ajustó con el teórico esperado de 3:1 de plantas con y sin el transgene. Figura 5. En este tipo de cruce F_2 , se observó un mayor número de híbridos transgénicos, debido a que el transgene segregó a partir de ambos padres; como consecuencia de este tipo de cruzamiento se podrían formar individuos F_2 homocigotos para la resistencia transgénica a virus.

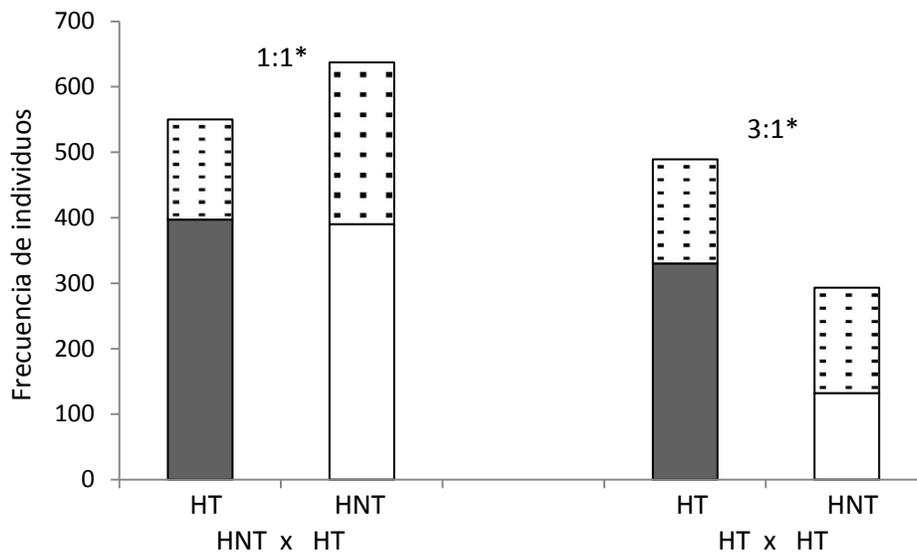


Figura 5. Herencia del transgene de resistencia a virus en la progenie F_2 derivada de dos tratamientos de polinización: uno con receptora F_1 no transgénica con donador híbrido F_1 transgénico y otro con ambos padres F_1 transgénicos. Las columnas sombreadas indican los individuos con el transgene de resistencia a virus. Las columnas en blanco indican los individuos sin el transgene. La parte superior punteada representa los individuos que no se ajustaron al esperado según la herencia mendeliana. Arriba de las barras se indica la proporción no transgénico:transgénico a prueba, los asteriscos indican diferencias significativas entre la herencia esperada y la observada.

En la progenie derivada de retrocruzamientos, el transgene segregó en forma mendeliana; tanto cuando los receptores fueron los híbridos transgénicos y los silvestres fueron donadores de polen (HT x S) ($G = 1.14$, g.l.= 2, $P > 0.05$), que cuando las plantas silvestres actuaron como receptoras de polen y los híbridos transgénicos como donadores de polen (S x HT) ($G = 3.5$, g.l.= 3, $P > 0.05$). Aquí el 100% de las familias ajustó con la proporción teórica 1:1 (con transgene: sin transgene). Figura 6.

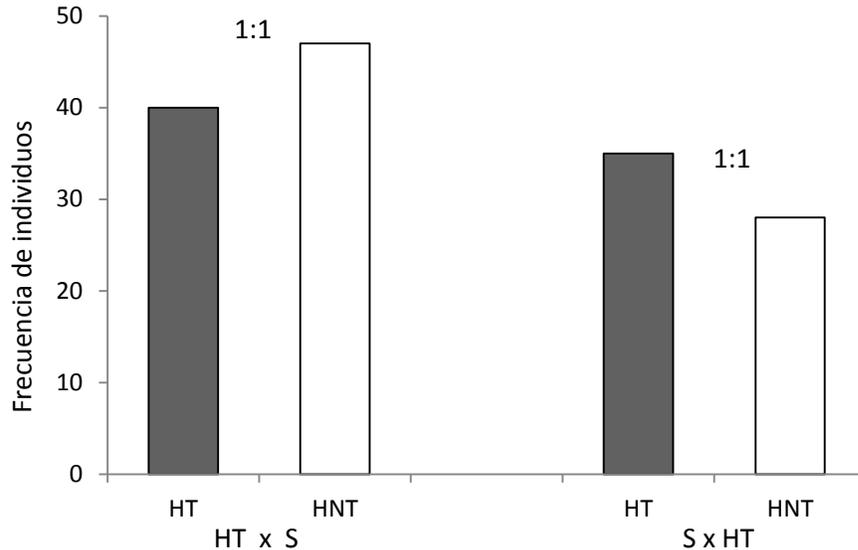


Figura 6. Herencia del transgene de resistencia a virus en la progenie derivada de dos tipos de retrocruzamientos. HT x S: plantas híbridas F₁ transgénicas como receptoras y silvestre como donadoras de polen. S x HT: plantas silvestres como receptoras y plantas híbridas F₁ como donadoras de polen. Las columnas sombreadas indican la frecuencia de individuos con el transgene de resistencia a virus, las columnas en blanco indican los individuos sin el transgene.

DESEMPEÑO DE LOS HÍBRIDOS Y RETROCRUZANTES

El análisis multivariado en la generación F_1 , no arrojó diferencias significativas entre el desempeño de los híbridos que heredaron el transgene y los que no lo heredaron (en términos de tiempo de germinación de la semilla, producción de flores masculinas y femeninas, número de semillas por fruto y masa de las semillas). Tampoco encontré, diferencias significativas entre las progenies de los distintos tratamientos de polinización (saturación, 15:1, 7:1 y 3:1), en el desempeño de las variables mencionadas arriba. Tabla 3. En la progenie F_2 , no hubo diferencias en el desempeño entre híbridos segregantes y no segregantes del transgene (tiempo de germinación de semillas, área foliar de las plántulas a los 14 días, la producción de flores masculinas y femeninas).

Tabla 3. Análisis multivariado de la generación F_1 y F_2 , para tiempo de germinación de semillas, la producción de flores masculinas, la producción de flores femeninas, el número de semillas por fruto y la masa de las semillas entre los tratamientos de polinización saturación, 15:1, 7:1, 3:1, además de la presencia o ausencia del transgene.

Generación	Factores	Estadístico Wilki λ	g.l.	F	P
F_1	Tratamiento de carga de polen	0.745	15, 97	0.727	0.751
	Presencia ausencia del transgene	0, 835	5, 35	1.382	0.255
F_2	Tipo de cruza	0.611	4, 17	2.69	0,066
	Presencia ausencia del transgene	0.713	4, 17	1.71	0,194

De la misma manera no detecté diferencias significativas en el vigor entre retrocruzantes transgénicos y no transgénicos (tiempo de germinación de semillas, el área foliar de las plántulas, la producción de flores masculinas y femeninas), en ambos tipos de recruzamientos que realicé (HT x S) y (S x HT). Tabla 4. Debido a que no encontré

Tabla 4. Análisis de varianza de la generación de retrocruzantes para el tiempo de germinación de semillas, el área foliar de las plántulas a los 14 días de germinación, de la producción media de flores pistiladas y estaminadas, así como de la presencia del transgene de resistencia a virus.

Factor	Días germinar				Área foliar				Flores femeninas				Flores masculinas			
	g.l.	CM	F	P	g.l.	CM	F	P	g.l.	CM	F	P	g.l.	CM	F	P
Tipo de cruza	1	0.015	1.50	0.222	1	0.039	0.73	0.401	1	0.0001	0.005	0.965	1	0.016	0.05	0.823
Presencia o ausencia del transgene	1	0.0009	0.09	0.758	1	0.149	2.80	0.108	1	0.001	0.02	0.892	1	0.186	0.59	0.446
Interacción	1	0.0013	0.13	0.721	1	0.012	0.23	0.639	1	0.004	0.06	0.804	1	1.033	3.28	0.078
Error	186				23	0.053			23	0.075			38	0.315		
Total	189				26				28				41			

diferencias significativas en el vigor entre la progenie portadora y la no portadora del transgene (F₁, F₂ y retrocruzantes), decidí agrupar los datos de las progenies con y sin el transgene de resistencia a virus para compararlos con las líneas parentales.

Desempeño vegetativo

Aunque encontré diferencias significativas entre las líneas parentales y las líneas derivadas en variables como los días a germinar ($F_{6,3942}=27.32$, $P < 0.010$, figura 7): área foliar a los 14 días ($F_{6,340}=73.34$, $P < 0.010$, figura 8), en la producción media de flores femeninas ($F_{6,928}=30.26$, $P < 0.010$, figura 9), la producción media de flores masculinas ($F_{6,906}=74.59$, $P < 0.010$, figura 10), el número de semillas por fruto ($F_{5,143}=15.89$, $P < 0.010$, figura 11) y la masa de las semillas ($F_{6,1957}=157.26$, $P < 0.10$, figura 12), ninguna de esas diferencias se expresó como vigor híbrido.

Durante la fase de establecimiento de las plántulas, las semillas híbridas F₁ requirieron un período mayor para germinar que el parental silvestre. Figura 7. En la generación F₂, no hubo diferencias significativas en el tiempo de germinación de semillas entre los dos tipos de cruza realizadas, tampoco hubo diferencias al contrastar esta generación con los parentales transgénicos. Sin embargo, si hubo diferencias significativas respecto a los parentales silvestres (período mayor de germinación en ambos tipos de cruza F₂), pero no respecto a la generación F₁. Por otra parte, las retrocruzas mostraron una diferencia significativa con la línea silvestre (período mayor para germinación) de las semillas, pero no hubo diferencia con relación a las generaciones F₁, F₂ y los parentales transgénicos.

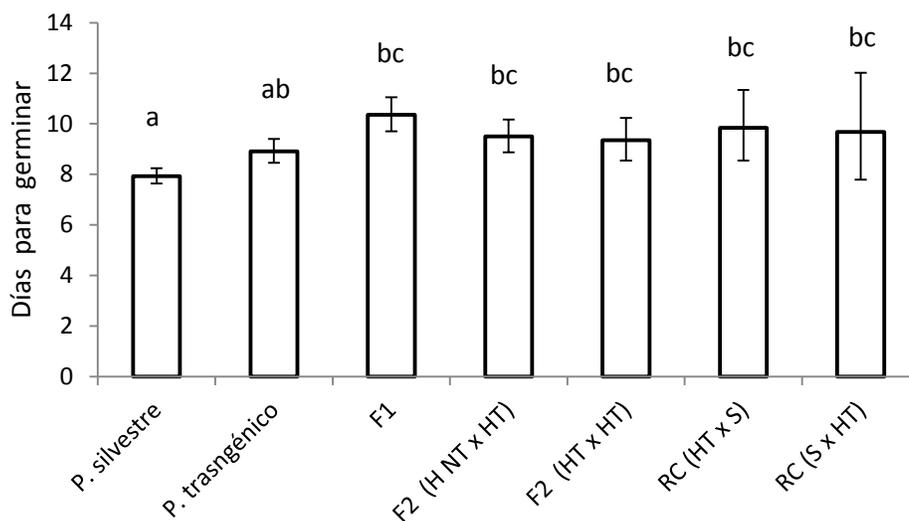


Figura 7. Días para germinar de generaciones parentales, generaciones híbridas y retrocruzantes. Barras de LSM con errores estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

En relación al área foliar de las plántulas a los 14 días de germinar, las generaciones híbridas F₁, F₂, y retrocruzantes tuvieron áreas foliares similares entre sí, pero sus áreas fueron intermedias en relación con las líneas parentales. Es decir el área foliar a los 14 días en ambas cruces F₂, fue menor al área del progenitor transgénico pero significativamente mayor que la del progenitor silvestre. Figura 8.

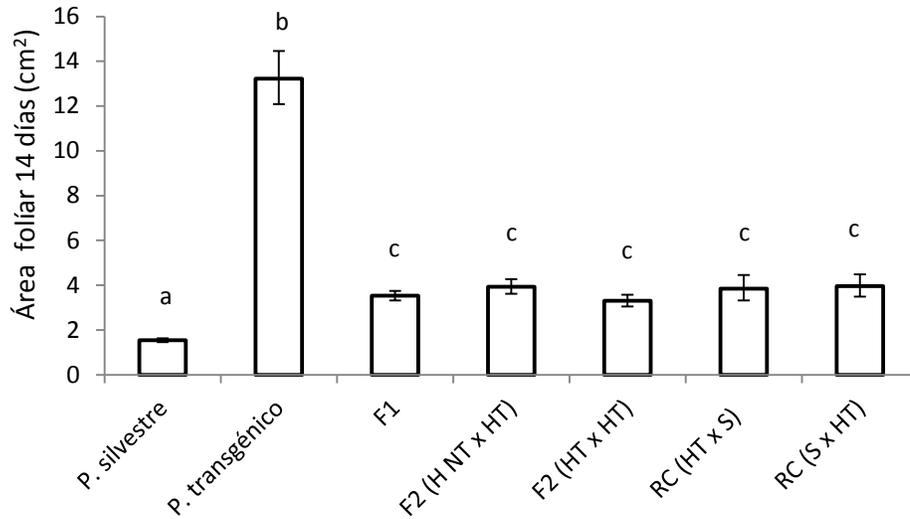


Figura 8. Área foliar de las plántulas 14 días después de germinar de generaciones parentales y generaciones híbridas y retrocruzantes. Barras de LSM con errores estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Ya en la fase reproductiva de las plantas, los resultados de la prueba de Tukey indicaron que la producción media de flores pistiladas en los híbridos F_1 , fue menor en relación de las líneas parentales y de las plantas híbridas F_2 , pero similar a las plantas retrocruzantes. La producción de flores femeninas de las plantas F_2 y de las retrocruzantes fue similar a la expresada por las plantas silvestres pero significativamente menor a la producción de flores del parental transgénico. Figura 9.

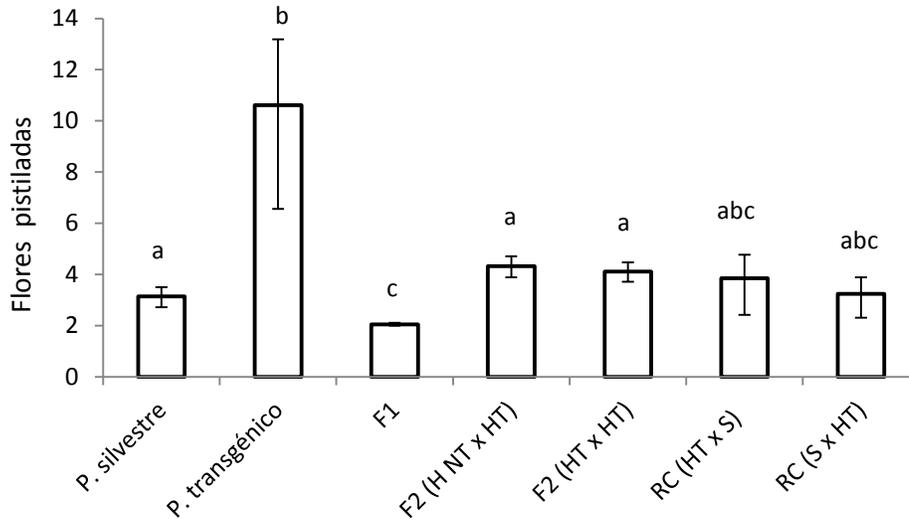


Figura 9. Producción de flores pistiladas de las especies parentales y generaciones híbridas y retrocruzantes. Barras de LSM con errores estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Por otra parte la producción de estructuras reproductivas masculinas de las líneas híbridas F_1 , F_2 fue intermedia a la producción de flores estaminadas de las líneas parentales. A diferencia de las líneas retrocruzantes, que tuvieron una producción similar al parental transgénico. La línea híbrida F_1 , ambas líneas F_2 y las retrocruzantes no fueron diferentes significativamente entre sí en la producción media de flores estaminadas. Fue notoria la disminución en la producción de flores macho en las líneas híbridas y retrocruzantes respecto al parental silvestre. Figura 10.

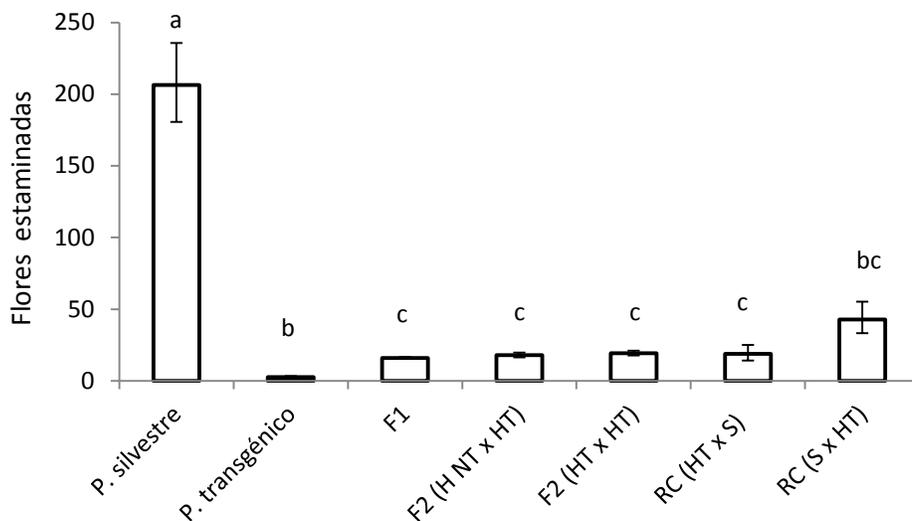


Figura 10. Producción de flores estaminadas de las especies parentales y generaciones heterogéneas y retrocruzantes. Barras de LSM con errores estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Por derechos de patente y sus efectos legales, la producción de semillas por fruto de las generaciones híbridas y retrocruzantes no fueron comparadas con el parental transgénico, únicamente las contrasté con la línea parental silvestre. La prueba de Tukey indicó que todas las líneas híbridas F_1 , F_2 y las retrocruzas, fueron significativamente distintas del silvestre, todas ellas mostraron una reducción importante en la cantidad de semillas producidas por fruto. Entre las líneas sintéticas F_1 , F_2 y retrocruzantes las diferencias en la producción de semillas no fueron significativas. Figura 11.

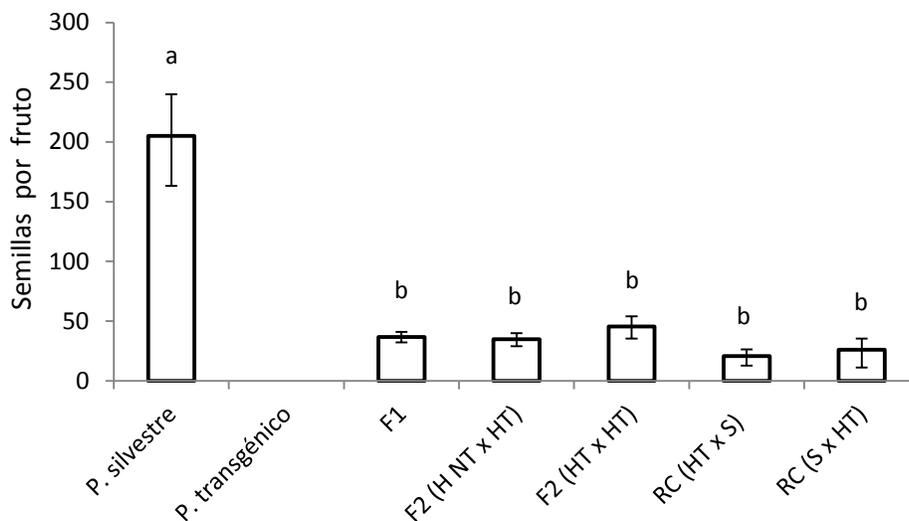


Figura 11. Semillas por fruto de silvestre parental y generaciones híbridas y retrocruzantes. Barras de LSM con errores estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Por otra parte la masa promedio de las semillas de la generación F_1 y F_2 fue intermedia en relación a la masa de las líneas parentales, además de ser significativamente diferente. La masa de las semillas no fue diferente entre híbridos F_1 y la retrocruza con madre híbrida y padre silvestre (HT x S). Mientras que, las líneas híbridas F_2 no tuvieron diferencias significativas entre sí, pero expresaron una masa mayor que las F_1 y los retrocruzantes. Por su parte la masas de las semillas de la retrocruza de madre silvestre con padre híbrido transgénico (S x HT), no fue diferente de la línea parental silvestre. Figura 12.

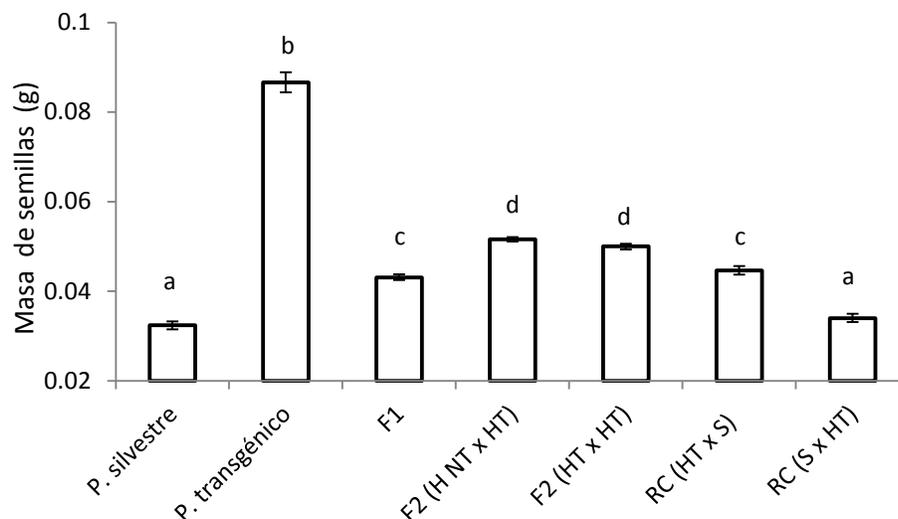


Figura 12. Masa de semillas de las especies parentales y generaciones híbridas y retrocruzantes. Barras de LSM con errores estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Seguí la floración diariamente para cada generación, a partir de la primera flor. El periodo de floración masculina del parental silvestre fue el segundo más largo (90 días) después de la generación F₁. Mientras que, el periodo del parental transgénico fue el más breve. La generación F₂ (H NT x HT y HT x HT) y la generación de retrocruzantes (HT x S, S x HT) tuvieron periodos similares de floración (≈ 80 días), y más cortos que en la generación F₁. Figura 13.

Respecto al periodo de flores pistiladas, éste fue más prolongado en la generación F₁ comparada con otras generaciones. El tiempo de expresión de flores femeninas fue semejante entre generaciones F₂ y retrocruzantes (≈80 días). La expresión máxima de flores pistiladas ocurrió de forma más tardía en los parentales silvestres que en las generaciones F₁ y F₂. Figura 14.

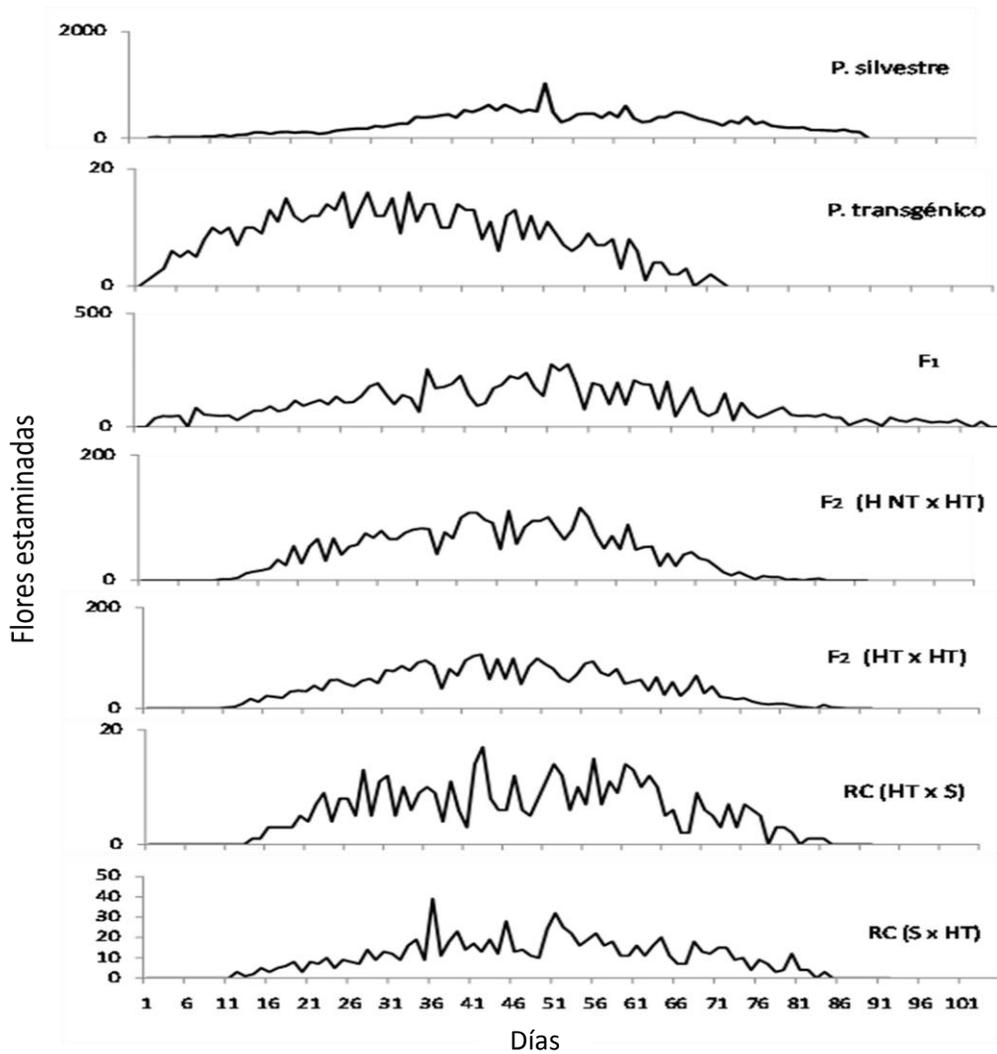


Figura 13. Número total de flores producidas por día durante el periodo de floración masculina en las líneas parentales (silvestre, transgénica), líneas híbridas (F_1 y F_2) y retrocruzantes. Conteo realizado en 30 individuos de cada línea genética.

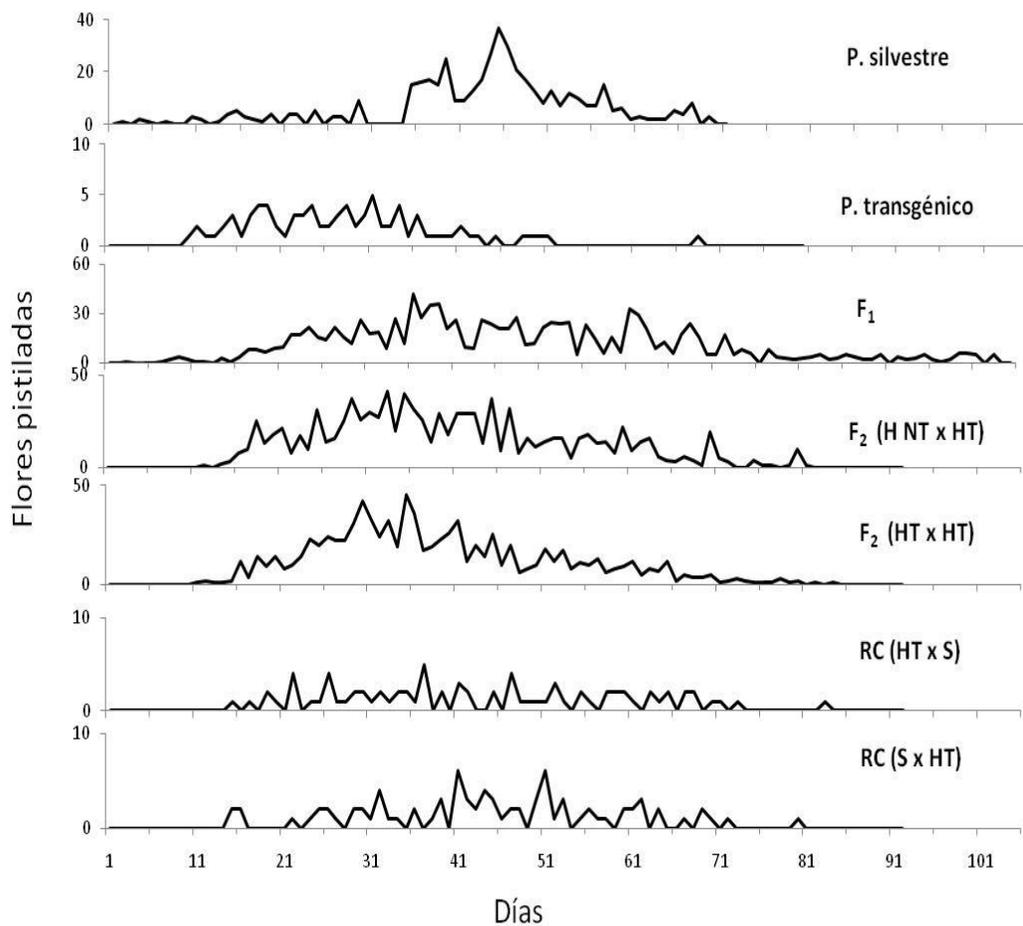


Figura 14. . Número total de flores producidas por día durante la duración de la floración femenina en las generaciones parentales (silvestre, transgénica), híbridas (F_1 y F_2) y retrocruzantes. Conteo realizado en 30 individuos de cada línea genética.

Encontré diferencias significativas entre generaciones en la germinación de semillas ($X^2= 286.95$, g.l.= 6, $P<0.05$), en la supervivencia de las plantas a la mitad de la etapa reproductiva ($X^2= 93.68$, g.l.= 6, $P<0.05$) y en la viabilidad del polen ($X^2= 4254.95$, g.l.= 4, $P<0.05$). Tabla 5.

Respecto a la porción de semillas que germinaron, las generaciones híbridas y retrocruzantes siempre lo hicieron en menor proporción que el parental silvestre. Los híbridos de la F_1 tuvieron una reducción del 26% en la proporción de germinación de semillas, los híbridos F_2 (HNT x HT) 8% menos, mientras que en la progenie F_2 (HT x HT) la disminución fue del 11%. En la retrocruza (HT x S) la reducción de la germinación fue del 29% y para la retrocruza (S x HT) fue del 36%. Tabla 5. Las proporciones de germinación de semillas entre las cruza híbridas F_2 no fueron diferentes entre sí y tampoco lo fueron con el parental transgénico. Por su parte la proporción de semillas germinadas de la retrocruza (HT x S) no fue diferente de la cruza F_1 , de las cruza F_2 , y de la retrocruza (S x HT). Tabla 5.

La supervivencia de los adultos F_1 fue 22% menor respecto al parental silvestre. Igualmente, los híbridos F_2 (HNT x HT) y (HT x HT) tuvieron una supervivencia menor en relación al silvestre del 13% y 11% respectivamente. Las proporciones de supervivencia entre los híbridos F_1 , híbridos F_2 y los individuos retrocruzantes no difirieron significativamente entre sí. Tabla 5.

Encontré en las generaciones híbridas F_1 , F_2 y retrocruzantes, una menor viabilidad del polen respecto al parental silvestre, en individuos F_1 la reducción fue del 44%, en plantas F_2 (HT x HT) fue del 37% y en la retrocruza (S x HT) la reducción fue del 19%. Cabe resaltar que los retrocruzantes (S x HT) mostraron una mayor proporción de polen viable que los híbridos F_1 . Tabla 5.

Tabla 5. Tasa de germinación de semillas, de supervivencia y de viabilidad de polen en las generaciones de parentales (silvestres y transgénicas), de híbridos (F_1 , F_2) y retrocruzanter (RC).

Variable	Parental silvestre	Parental transgénico	F_1 Saturación	F_2		RC		X^2
				HNT x HT	HT x HT	HT x S	S x HT	
Germinación de semillas	0.88 (224)	0.90 (55)	0.62 (3273)	0.80 (1697)	0.77 (1119)	0.69 (165)	0.52 (172)	$X^2 = 286.95$ g.l. =6, $P < 0.05$
Supervivencia	0.85 (110)	0.54 (55)	0.63 (1832)	0.73 (1282)	0.74 (816)	0.79 (112)	0.93 (85)	$X^2 = 93.68$ g.l. =6, $P < 0.05$
Viabilidad del polen	0.97 (16)	0.96 (21)	0.53 (34)	—	0.60 (14)	—	0.78 (19)	$X^2 = 4254$ g.l. =4, $P < 0.05$

Tabla 6. Tasa reproductiva de la función femenina y masculina de las generaciones de parental silvestre, híbridos F_1 , F_2 y retrocruzanter (RC).

Generación	Tasa supervivencia	Función femenina		Función masculina	
		Fertilidad	Tasa reproductiva	Fertilidad	Tasa reproductiva
Parental silvestre	0.85	59.67	50.72	59671.4	50720.7
F_1 (saturación)	0.62	2.8	1.75	344.2	215
F_1 (15:1)	0.62	1.98	1.24	---	---
F_1 (7:1)	0.69	3.37	2.32	---	---
F_1 (3:1)	0.66	5.05	3.31	---	---
F_2 (HNT x HT)	0.73	0.63	0.46	---	---
F_2 (HT x HT)	0.74	1.07	0.79	532.8	394.3
RC (S x HT)	0.93	1.05	4.77	11845	11015.8

Desempeño reproductivo

La tasa reproductiva de las generaciones híbridas F_1 , F_2 fue mínima respecto al parental silvestre. La función femenina de la generación F_1 únicamente representó entre el 2% y el 6% de total de la función femenina del parental silvestre. Tabla 6. La tasa reproductiva de la generación F_2 representó el 1%, mientras que en la retrocruza (S x HT) alcanzó el 9% en relación al parental silvestre. La función masculina de la generación F_1 representó 6%, en la generación F_2 (HT x HT) representó el 0.9% mientras que en los retrocruzantes (S x HT) alcanzó el 20% de valor del parental silvestre. Finalmente, la función reproductiva femenina y masculina de los retrocruzantes (S x HT) fueron 2.5 y 51 veces mayor que el respectivo valor en la generación F_1 . Tabla 6.

DISCUSIÓN

En este capítulo demostré mediante un experimento de cruzamientos manuales que *Cucurbita pepo* TRV tiene la capacidad de formar híbridos con *C. argyrosperma* ssp. *sororia* y que el transgene de resistencia a virus segrega en la progenie híbrida. También muestro evidencia de la transferencia del transgene de resistencia a virus desde los híbridos F_1 hacia la progenie resultante de cruzamientos con otros individuos híbridos F_1 (generación F_2), y hacia retrocruzantes con plantas silvestres de *C. argyrosperma* ssp. *sororia*. En esta sección también discuto sobre la transferencia del transgene de resistencia a virus en calabazas en un contexto de hibridación interespecífica y su posible introgresión en poblaciones silvestres de calabaza.

Herencia del transgene

El análisis de la segregación del transgene en la generación F₁ originada de cruzamientos con sólo polen de plantas transgénicas, revela que casi la mitad (44%) de toda la progenie porta el transgene de resistencia a virus. Adicionalmente muestra que la mayor parte de las familias (más del 80%) ajustan con la proporción esperada (1:1 con el transgene: sin el transgene). Este resultado muestra cómo la hibridación entre genotipos domesticado-silvestre de estas especies, permite una estabilidad para la segregación del transgene de resistencia a virus. Este resultado amplía la posibilidad de escape del transgene de resistencia a virus a otras especies del género *Cucurbita*, más allá de los cruzamientos intraespecíficos en *Cucurbita pepo* (Spencer y Snow 2001; Fuchs et al. 2004; Laughlin et al. 2009), ya que *C. argyrosperma* ssp. *sororia* es la especie más lejana a *C. pepo* dentro del clado *Cucurbita* (Sanjur et al. 2002).

Este trabajo es avanzado respecto a investigaciones previas de herencia del transgene debido a que es el primero en determinar la segregación de transgene cuantificando polen conoespecífico y heteroespecífico. Este método me permitió observar cómo en la F₁ proveniente del tratamiento de polen mixto, al disminuir la diferencia entre polen transgénico y silvestre, el patrón de herencia mendeliana en las familias es menos frecuente. Lo cual sugiere un efecto denso-dependiente sobre la capacidad de fertilización de los microgametófitos de plantas modificadas en competencia con polen silvestre. Esto concuerda con lo observado en trabajos de competencia de polen; donde la fertilización conoespecífica es favorecida como en *C. pepo* (Quesada et al. 1993; Quesada et al. 1995). Esta parte del trabajo demuestra que los tubos polínicos de plantas transgénicas tienen la capacidad de crecer en los estigmas de plantas silvestres aún en presencia de polen silvestre. De esta manera, la hibridación interespecífica entre *C. pepo* GM y *C. argyrosperma* ssp. *sororia* puede ocurrir y

no representa un impedimento para el escape y la expresión del transgene de resistencia a virus en este pariente silvestre.

La segregación del transgene de resistencia a virus también fue evaluada en generaciones avanzadas. Para ello desarrollé la generación F_2 a partir de cruzamientos manuales entre plantas F_1 además de hacer retrocruzamientos controlados entre plantas híbridas F_1 y plantas silvestres. Este trabajo logró determinar la presencia o ausencia del transgene, específicamente en aquellas plantas F_1 que serían utilizadas como madre y padre y con ello determinar la herencia en la generación F_2 .

Al igual que en la generación F_1 , la segregación del transgene no ajustó a la herencia mendeliana en la F_2 , de la misma forma que en la generación previa; ésta desviación ocurrió en sólo una fracción de las familias. El transgene ajustó a la herencia mendeliana en el 71% de las familias en la cruce HNT x HT y en el 63% de las familias ajustó al 3:1 esperado en las cruces HT x HT. La herencia en ese porcentaje de familias concuerdan con el resultado del cruzamiento intraespecífico entre la acelga (*Beta vulgaris*) modificada con resistencia a herbicida y una acelga silvestre; la segregación de ese transgene ajustó al esperado 3:1 (resistente: susceptible al herbicida) en una segunda generación de híbridos (Diezt- Pfeilstetter y Kirchner, 1998). Individuos híbridos F_2 provenientes de la cruce entre padres F_1 HT, podrían ser homocigotos para el transgene. No queda claro si una condición homocigótica puede generar un mayor nivel de expresión del transgene, comparado con los híbridos hemicigóticos (Halfhill et al. 2003) y si ello se traduce en una mayor resistencia contra virus.

En la generación de plantas retrocruzantes el transgene segregó de forma mendeliana. Ya sea que el híbrido F_1 transgénico funcione como donador o como receptor de polen; la herencia del transgene ajustó a la frecuencia mendeliana esperada 1:1. Estos resultados concuerdan con la herencia observada en dos generaciones consecutivas de retrocruzantes

intraespecíficos obtenidos en parcelas con polinización abierta entre *C. pepo* y *C. pepo* ssp. *texana* (Fuch et al. 2004b, Sasu et al. 2009). Mis resultados con la generación F₂ y de retrocruzantes sugieren que el transgene de resistencia a virus es heredado de manera estable a través de varias generaciones, es decir que la introgresión del transgene de resistencia a virus puede suceder también con especies silvestres no directamente emparentadas a *C. pepo* como lo es *C. argyrosperma* ssp. *sororia*.

El riesgo del escape del transgene puede ser real si consideramos otros factores. Si pensamos en un escenario futuro en donde concurren cultivares de *C. pepo* GM y plantas silvestres de *C. argyrosperma* ssp. *sororia*, podríamos encontrar sembradas en una hectárea hasta 12,000 plantas de calabazas transgénicas con resistencia a virus (TRV), mientras que en los caminos adyacentes, las poblaciones del pariente silvestre habría una decena de plantas en un tramo de 100 metros. Bajo este escenario habría sobre-representación de polen del cultivar GM, que favorecería el flujo de polen hacia el pariente silvestre. Así, algunas abejas llevarían cargas con sólo polen transgénico, mientras otras tendrían una carga mixta pero con una mayor proporción de polen transgénico que silvestre. Esto es factible, ya que las abejas llevan cargas mixtas que pueden conducir a la formación de híbridos como se corroboró en un análisis entre cultivares y plantas silvestres de *C. pepo* (Kirkpatrick y Wilson 1988). Así, la condición que simulé en este trabajo en la cual el polen transgénico compite en mayor número con el polen conespecífico de las calabazas silvestres, puede ocurrir naturalmente.

Desempeño híbrido

No observé vigor híbrido en el desempeño vegetativo de las generaciones híbridas. Los híbridos F₁ obtenidos de cruzamientos controlados entre *C. pepo* GM con resistencia a virus y *C. argyrosperma* ssp. *sororia* presentaron un bajo desempeño. Así; los híbridos F₁ produjeron

menos flores que el parental silvestre, lo cual concuerda con lo observado en cruzamientos intraespecíficos entre *C. pepo* TRV y *C. pepo* de vida libre (Spencer y Snow 2001). La producción de flores estaminadas fue reducida en relación al parental silvestre, la producción de semillas por fruto también fue afectada y sólo representó una quinta parte de las semillas producidas por el parental silvestre. La misma tendencia ocurrió en híbridos intraespecíficos entre *C. pepo* TRV con resistencia a virus y *C. pepo* de vida libre, los cuales sólo produjeron un tercio de las semillas comparado con las plantas silvestres.

El desempeño reproductivo de los híbridos F₁ fue malo. La función reproductiva de los híbridos reflejó un bajo nivel de fecundidad (3%) y de fertilidad masculina (0,4%) en relación al parental silvestre. Estos valores sugieren que el proceso de hibridación afectaría la adecuación por la vía femenina y masculina de forma diferente (Pertl et al. 2002), como consecuencia el transgene de resistencia a virus tendría mayor oportunidad de pasar a la segunda generación cuando el híbrido funciona como madre. El desempeño reproductivo de híbridos F₁ interespecíficos (*C. pepo* TRV x *C. argyrosperma* ssp. *sororia*) fue tres veces menor que en híbridos intraespecíficos (*C. pepo* TRV x *C. pepo* de vida libre, Spencer y Snow 2001), esto posiblemente influido por la lejanía filogenética entre estas dos especies (Rieseberg y Wendel 1993).

El desempeño de los híbridos de la generación F₂ también fue bajo, pero con una ligera mejoría en relación a la generación F₁. El desempeño que expresaron los híbridos F₂ fue independiente del tipo de planta madre: transgénica o no transgénica. Mis resultados concuerdan con lo observado en híbridos F₂ derivados de plantas de *Brassica napus* GM con resistencia a herbicidas, los cuales también expresaron un vigor pobre (Hauser et al. 1998, Zhang et al. 2003). A pesar de la baja adecuación de los híbridos F₂ TRV, las plantas permanecieron viables, por lo tanto esta generación podría funcionar como fuente de gametos

en retrocruzamientos, es decir pueden ser otra vía para la permanencia del transgene de resistencia a virus en las poblaciones silvestres de calabaza.

La introgresión de un transgene en poblaciones silvestres dependerá también del vigor de los retrocruzantes (Hails y Morley 2005). Si bien los retrocruzantes expresaron en general un desempeño inferior al parental silvestre, algunas variables -a diferencia de la generación F₁- en los retrocruzantes presentaron valores similares al parental silvestre (producción de flores pistiladas, la supervivencia y la masa de las semillas). Esta ligera mejoría en el desempeño respecto a la generación F₁ puede favorecer la persistencia del transgene. Además recordemos que los retrocruzantes heredaron el transgene de forma mendeliana.

La probabilidad de persistencia del transgene en la población silvestre puede variar según la dirección del retrocruzamiento con los híbridos F₁. La posibilidad de transferir el transgene hacia la siguiente generación de retrocruzantes podría no ser igual para la función masculina y femenina de la generación retrocruzante. Encontré que los retrocruzantes provenientes de cruza de plantas silvestres receptoras de polen híbrido TRV, produjeron significativamente más flores estaminadas y sus semillas fueron menos pesadas (parecidas al fenotipo silvestre) que los retrocruzantes derivados de híbrido receptores TRV y de padres silvestres. Es importante resaltar que los retrocruzantes derivados de plantas silvestres como receptoras de polen de híbridos TRV, alcanzaron una fecundidad del 9.4% y una fertilidad masculina del 19.9% relativa a *C. argyrosperma* ssp. *sororia* en condiciones experimentales. Mis datos sugieren que la introgresión del transgene de resistencia a virus en una población silvestre puede verse favorecida por la función masculina de los retrocruzantes, pero no podemos olvidar que en condiciones ambientales puede haber variación en el desempeño y esta ventaja podría cambiar en otro ambiente, e.g. en un experimento de trasplante recíproco entre *Iris fulva*, *I. hexagona* y sus híbridos, estos últimos presentaron mayor crecimiento del

rizoma que los parentales en tres de los cuatro sitios de trasplante (Emms y Arnold 1997, Campbell et al. 2006).

Para la persistencia del transgene en una población de parientes silvestres deben considerarse otros factores. Por ejemplo factores ambientales como la magnitud de la incidencia de virus; suponiendo que la expresión del TRV en híbridos o retrocruzantes les otorga una ventaja en ambientes con alta incidencia, ello facilitaría la introgresión (Laughlin et al. 2009). Otro elemento a considerar sería la presencia de costos por la expresión del transgene. Si la expresión del transgene de resistencia a los virus en generaciones híbridas tuviera un efecto negativo en la adecuación, la secuencia introducida sería depurada del conjunto genético de la población. En *C. pepo* ssp. *texana* por ejemplo el transgene de resistencia a virus genera un costo indirecto en los introgresantes portadores; si bien la expresión de la resistencia reduce las infecciones virales también los hace más susceptibles al ataque de herbívoros que transmiten la bacteria mortífera *Erwinia* (Sasu et al. 2009). Queda pendiente estudiar el efecto que tienen estos factores en ambientes tropicales que comprende la zona de distribución natural de estas calabazas silvestres, allí las relaciones ecológicas serían más complejas que las que ocurren en los campos experimentales.

LITERATURA CITADA

- Ammitzbøll, H., T. N. Mikkelsen, y R. B. Jørgensen. 2005. Transgene expression and fitness of hybrids between GM oilseed rape and *Brassica rapa*. *Environmental Biosafety Research* 4:3–12.
- Arnold, M. L., M. R. Bulger, J. M. Burke, A. L. Hempel, y J. H. Williams. 1999. Natural hybridization: how low can you go and still be important? *Ecology* 80:371–381.
- Arnold, M. L., y S. A. Hodges. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution* 10:67–71.
- Arriaga, L., E. Huerta, R. Lira-Saade, E. Moreno, y J. Alarcón. 2006. Assessing the risk of releasing transgenic *Cucurbita* spp. in Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112:291–299.
- Artz, D. y B.A. Nault. 2011. Performance of *Apis mellifera*, *Bombus impatiens* and *Peponapis pruinosa* (Hymenoptera; Apidae) as pollinators of pumpkin. *Journal of Economic Entomology*. 104: 1153-1161.
- Bicar, E. H. 2009. Characterizing transgene inheritance. *Methods in molecular biology; Transgenic Maize* 526:147–159.
- Burke, J. M., y M. L. Arnold. 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* 35:31–52.
- Chapman, M. A., y J. M. Burke. 2006. Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. *The New Phytologist* 170:429–43.
- Chèvre, A.-M., F. Eber, A. Baranger y M. Renard. 1997. Gene flow from transgenic crops. *Nature* 389:924.
- CIBIOGEM. 2014. Liberación al ambiente de Organismos Genéticamente Modificados. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/liberaciones-al-ambiente-por-cultivo-anual>
- Cummings, C. L., H. M. Alexander, A.A. Snow, L. H. Rieseberg, M.J. Kim y T.M. Culley. 2002. Fecundity selection in sunflower crop-wild study: can ecological data predict crop alleles changes? *Ecological Applications*. 12: 1661-1671.

- Dale, P. J. 1994. The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: general considerations. *Molecular Ecology* 3:31–36.
- Decker-Walters, D. S. 1990. Evidence for multiple domestications of *Cucurbita pepo*. Páginas 96- 101 en D. M. Bates, R. W. Robinson, and C. Jeffrey, eds. *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Dietz-Pfeilstetter, A., y M. Kirchner. 1998. Analysis of gene inheritance and expression in hybrids between transgenic sugar beet and wild beets. *Molecular Ecology* 7:1693–1700.
- Ellstrand, N. C., P. Meirmans, J. Rong, D. Bartsch, A. Ghosh, T. J. de Jong, P. Haccou, B.-R. Lu, A. A. Snow, C. Neal Stewart, J. L. Strasburg, P. H. van Tienderen, K. Vrieling, y D. Hooftman. 2013. Introgression of crop alleles into wild or weedy populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 44:325–345.
- Emms, S. K., y M.L. Arnold. 1997. The effect of habitat on parental and hybrid fitness: transplant experiments with Louisiana irises. *Evolution*, 1112-1119.
- Gepts, P., y R. Papa. 2003. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Environmental Biosafety Research* 2:89–103.
- Hails, R. S., y K. Morley. 2005. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology & Evolution* 20:245–52.
- Hauser, T. P., R. B. Jørgensen, y H. Østergård. 1998. Fitness of backcross and F₂ hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81:436–443.
- Hooftman, D. A. P., J. G. B. Oostermeijer, E. Marquard, y H. J. C. M. den Nijs. 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* 45:1094–1103.
- Hurd Jr., P. D., E. G. Linsley, y T. W. Whitaker. 1971. Squash and gourd bees (*Peponapis*, *Xenoglossa*) and the origin of the cultivated *Cucurbita*. *Evolution* 25:218–234.
- James, C. 2013. Global status of commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA 46 Ithaca, NY, USA.
- Jenczewski, E. J. Ronfort y A-M. Chèvre. 2003. Crop to wild gene flow, introgression and possible fitness effects of transgenes. *Environmental Biosafety Research* 2: 9-24.

- Jorgensen, R.B., T. Hauser, T.D Hertefeldt, N.Steen, y D. Hooftman.2009. The variability of processes involved in transgene dispersal- case studies from *Brassica* and related genera. *Environment Science Pollution Research*. 16: 389-395.
- Kirkpatrick, K. J., y H. D. Wilson. 1988. Interspecific gene flow in *Cucurbita*: *C. texana* vs. *C. pepo*. *American Journal of Botany* 75:519.
- Kwit, C., H. S. Moon, S. I. Warwick, y C. N. Stewart. 2011. Transgene introgression in crop relatives: molecular evidence and mitigation strategies. *Trends in Biotechnology* 29:284–93.
- Laughlin, K. D., A. G. Power, A. A. Snow, y L. J. Spencer. 2009. Risk assessment of genetically engineered crops: fitness effects of virus-resistance transgenes in wild *Cucurbita pepo*. *Ecological Applications* 19:1091–1101.
- Lecoq, H., G. Wisler, y M. Pitrat. 1998. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. Páginas 126–142 en Mc-Creight J.D, editor. *Cucurbitaceae, 1998: Evaluation and Enhancement of Cucurbits Germplasm*. ASHS press, Alexandria, VA, Pacific Grove, USA.
- Lipp, M., P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels, E. Anklam, T. Borchers, G. Braunschweiger, U. Busch, E. Eklund, F. D. Eriksen, J. Fagan, A. Fellingner, H. Gaugitsch, D. Hayes, C. Hertel, H. Hörtnner, P. Joudrier, L. Kruse, R. Meyer, M. Miraglia, W. Müller, P. Phillipp, B. Pöpping, R. Rentsch, y A. Wurtz. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International* 82:923–8.
- Lira-Saade, R. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica. IPGRI, Rome Italy.
- Lynch, M. 1991. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*:622-629.
- Mariano B.N. 2001. Efecto de la herbivoría sobre la adecuación masculina y femenina de *Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia*. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología-UNAM. México. D.F.
- Marvier, M y R.C Van Acker. 2005. Can crop transgene be kept on a leash? *Frontiers in Ecology Environment* 3:99-106.
- Merrick, L. C. 1990. Systematics and evolution of a domesticated squash, *Cucurbita argyrosperma*, and its wild and weeds relatives. Páginas 77–95 en D. M. Bates, W. R.

- Robinson, y C. Jeffrey, editors. *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press. Ithaca. USA.
- Metcalf, R.L., R. A. Metcalf y A.M. Rhodes. 1980. Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles. *Proceedings of National Academy of Science*. 77: 3769-3772.
 - Metz, P. L. J., E. Jacobsen, J. P. Nap, A. Pereira, y W. J. Stiekema. 1997. The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa* x *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theoretical and Applied Genetics* 95:442–450.
 - Montes-Hernández, S., y L. E. Eguiarte. 2002. Genetic structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) in western Mexico. *American Journal of Botany* 89:1156–63.
 - NRC, National Research Council. 2002. *Environmental effects of transgenic plants: The scope and adequacy of regulation*. The National Academies Press. Washington, USA.
 - Pertl, M., T. P. Hauser, C. Damgaard, y R. B. Jørgensen. 2002. Male fitness of oilseed rape (*Brassica napus*), weedy *B. rapa* and their F₁ hybrids when pollinating *B. rapa* seeds. *Heredity* 89:212–8.
 - Pilson, D., y H. R. Prendeville. 2004. Ecological effects of transgenic crops and the escape of transgenes into Wild populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35:149–174.
 - Piñeyro-Nelson, A., J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernández, A. Rangel, M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante, y E. R. Alvarez-Buylla. 2009. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology* 18:750–61.
 - Quesada, M., J. A. Winsor, y A. G. Stephenson. 1993. Effects of pollen competition on progeny performance in a heterozygous cucurbit. *The American Naturalist* 142:694–706.
 - Quesada, M., K. Bollman, y A. G. Stephenson. 1995. Leaf damage decreases pollen production and hinders pollen performance in *Cucurbita texana*. *Ecology* 76:437.
 - Quist, D., e I. H. Chapela. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414:541–3.
 - Reichman, J. R., L. S. Watrud, E. H. Lee, C. A. Burdick, M. A. Bollman, M. J. Storm, G. A. King, y C. Mallory-Smith. 2006. Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping

- bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagronomic habitats. *Molecular Ecology* 15:4243–55.
- Rhode J.M. y Michelle B Cruzan. 2005. Contributions of heterosis and epistasis to hybrid fitness. *The American Naturalist* 166: e 124-e139.
 - Sanjur, O. I., D. R. Piperno, T. C. Andres, y L. Wessel-Beaver. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:535–40.
 - Sasu, M. A., M. J. Ferrari, D. Du, J. A. Winsor, y A. G. Stephenson. 2009. Indirect costs of a nontarget pathogen mitigate the direct benefits of a virus-resistant transgene in wild *Cucurbita*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:19067–71.
 - SIAP-SAGARPA. 2014. Cultivos de interés. <http://www.siap.gob.mx/calabacita/>.
 - Simmons, H. E., E. C. Holmes, y A. G. Stephenson. 2008. Rapid evolutionary dynamics of Zucchini Yellow Mosaic Virus. *The Journal of General Virology* 89:1081–5.
 - Singh, A. K. 1990. Cytogenetics and evolution in the Cucurbitaceae. Páginas 10-28 en D. M. Bates, W. R. Robinson, y C. Jeffrey, editores. *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press. Ithaca. USA.
 - Snow, A. A., B. Andersen, y R. B. Jørgensen. 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecology* 8:605–615.
 - Snow, A. A., D. A. Andow, P. Gepts, E. M. Hallerman, A. Power, J. M. Tiedje, y L. L. Wolfenbarger. 2005. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecological Applications* 15:377–404.
 - Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Co., New York, USA.
 - Spencer, L. J., y A. A. Snow. 2001. Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 86:694–702.
 - Stewart, C. N., M. D. Halfhill, y S. I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews. Genetics* 4:806–17.

- Tepfer, M. 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annual Review of Phytopathology* 40:467–91.
- Tricoll, D. M., K. J. Carney, P. F. Russell, J. R. McMaster, D. W. Groff, K. C. Hadden, P. T. Himmel, J. P. Hubbard, M. L. Boeshore, y H. D. Quemada. 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to Cucumber Mosaic Virus, Watermelon Mosaic Virus 2, and Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Nature Biotechnology* 13:1458–1465.
- Warwick, S.I., M-J, Simmard, A.Légère, H.J. Beckle, L. Braun, B. Zhu, P. Mason, G.Séguin-Swartz, y C.N Stewart. 2003. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives *Brassica rapa* L, *Raphanus raphanistrum* L. *Sinapis arvensis* L. and *Erucastrum gallicum* (Wild) O.E. Schulz. *Theoretical Applied Genetics*. 107:528-539.
- Warwick, S. I., A. Légère, M.-J. Simard, y T. James. 2008. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17:1387–95.
- Wegier, A., A. Piñeyro-Nelson, J. Alarcón, A. Gálvez-Mariscal, E. R. Alvarez-Buylla, y D. Piñero. 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* 20:4182–94.
- Whitaker, T. W., y W. P. Bemis. 1964. Evolution in the genus *Cucurbita*. *Evolution* 18:553–559.
- Wilson, H. D. 1990. Gene flow in squash species. Domesticated *Cucurbita* species may not represent closed genetic systems. *Bioscience* 40:449–455.
- Wolfenbarger, L. L., y P.R. Phifer. 2000. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* 290:2088–2093.
- Zhang, N., S. Linscombe, y J. Oard. J. 2003. Out-crossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide-resistant rice and the weed, red rice. *Euphytica* 130:35–45.

CAPÍTULO III

INCIDENCIA DE VIRUS EN POBLACIONES NATURALES DE *Cucurbita argyrosperma* *ssp. sororia*

INTRODUCCIÓN

Después de los hongos, los virus son el grupo de patógenos que más pérdidas causan en los cultivos (Reddy et al. 2009). Las enfermedades causadas por virus en plantas cultivadas generan una importante reducción en la producción por superficie sembrada, lo cual resulta en pérdidas económicas de billones de dólares a nivel mundial (Sastry 2013). Las plantas cultivadas de la familia Cucurbitaceae (pepino, sandía, calabaza, etc.) son uno de los principales grupos que sufren infecciones por agentes virales. La calabacita (*Cucurbita pepo* L.), representa un buen ejemplo de la diversidad de infecciones virales que pueden atacar a las plantas domesticadas, esta especie puede ser infectada por: el virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV), el virus mosaico del pepino (CMV), el virus mosaico de la sandía (WMV-2), el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) o el virus mosaico de la calabaza (SqMV), entre otros (Lecoq et al. 1998). La pérdida económica debida a las infecciones virales en la calabacita está asociada a la magnitud de la infección en las plantaciones, se conoce que la propagación del virus al interior de un plantío puede abarcar desde un 20% hasta el 80% del área cultivada (Gianessi et al. 2002). Para el centro de origen de este cultivo: México, no existen datos sobre las pérdidas económicas causadas por virus, pero si en otros sitios como en Georgia (EUA), donde las pérdidas por estos patógenos en la calabacita fueron

estimadas en 2.6 millones de dólares durante 1997, (el valor de producción de este cultivo en USA en el 2013, fue estimado en 237.1 millones de dólares, Gianessi et al. 2002, AGMRC 2014).

La incidencia de virus (entendida como la proporción de plantas infectadas en una población) en calabacitas cultivadas en México está menos estudiada, existen datos para algunas localidades del norte y centro del país (Sinaloa y Guanajuato). Los virus detectados allí fueron: el virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV), el virus mosaico de la sandía (WMV), el virus de la mancha anular de la papaya variante sandía (PRSV-W), el virus mosaico del pepino (CMV), y el virus mosaico de la calabaza (SqMV) (Félix-Gastélum et al. 2007, Pérez-Moreno et al. 2004, Nelson et al. 1966). La incidencia puede ser del 44% para el ZYMV en lotes comerciales de calabaza en Sinaloa (Félix-Gastélum et al. 2007).

Existen varias estrategias para contrarrestar los efectos negativos de los virus en los cultivares; incluyendo las mecánicas, las químicas, hasta el uso de variedades resistentes incluidas las plantas transgénicas (Reddy et al. 2009). Cualquier estrategia de control necesariamente debe considerar la escala en la cual ocurre de manera natural la enfermedad o las epidemias (Gilligan 2008), sin embargo realmente conocemos poco de la dinámica poblacional de los virus fuera de los ambientes agrícolas (Jones 2014). De hecho, la epidemiología de los virus, entendida como el estudio de los patrones de distribución en tiempo y espacio de la enfermedad, en los cultivares está ampliamente estudiada (Waggoner y Aylor 2000, Wren et al. 2006, Hull 2009), mientras que en las poblaciones silvestres recién comenzamos a entender la distribución natural de los virus (Raybound et al. 1999, Gilbert 2002) y el efecto que pueden tener en la adecuación de esas poblaciones (Prendeville et al. 2014).

Empezamos a entender que las infecciones virales en las poblaciones silvestres de plantas parecen ser frecuentes (Prendeville et al. 2014), por lo tanto las plantas silvestres pueden ser importantes para la persistencia de los virus en los cultivares entre temporadas de siembra. El desconocimiento de la dinámica poblacional de los virus en las poblaciones naturales puede volver ineficaces los programas de control (García-Arenal y Mc Donald 2003, Rodoni 2009).

Conocemos todavía menos la dinámica de los virus en los sitios centro de domesticación de cultivos, esos sitios son importantes, ya que allí los virus y sus principales plantas hospederas (excepto nuevos encuentros) tienen centros de origen en común (Lovisolo et al. 2003). Las plantas silvestres pueden servir como reservorio importante para los virus (Tomlinson 1970). Adicionalmente, las poblaciones naturales de plantas pueden ser una de las principales fuentes de diversidad genética para los virus, además de fuente de genes de resistencia contra virus (Cooper y Jones 2006). Por ejemplo en poblaciones silvestres de Chile (*Capsicum annuum* var. *aviculare*) en México, hay diferente susceptibilidad al virus del mosaico amarillo del chiltepín (ChYMV) lo que sugiere un polimorfismo en la resistencia a ese virus en esas poblaciones (Pagan et al. 2010).

En los centros de origen de los cultivos, la interacción entre patógenos y hospederos pudo ocurrir a largo plazo, y si las infecciones afectaron negativamente la adecuación del hospedero, estos últimos pudieron desarrollar resistencia, lo cual pudo desencadenar un proceso coevolutivo (Parker y Gilbert 2004). Actualmente en esos sitios donde concurren cultivares y sus parientes silvestres, los virus pueden continuar infectando simultáneamente a ambos grupos de plantas. Es en esos centros de origen donde se vuelve imperativo conocer cómo los patrones espaciales en las relaciones hospedero-patógeno afectan la incidencia del virus durante las epidemias (aminorando o exacerbando su desarrollo), y cómo el componente

temporal afecta la probabilidad de emergencia de nuevas características patógenas debido a la continua asociación con el hospedero (Burdon y Thrall 2014). Uno de los escasos trabajos que considera patrones espacio-temporales, describe cómo la incidencia del hongo *Triphragmium ulmarie* está influida por el aislamiento entre poblaciones naturales de la planta hospedera *Filipendula ulmaria*, en dicho trabajo la incidencia (en dos de cuatro años de evaluación), estuvo explicada por la cercanía a poblaciones infectadas (Burdon, Ericson y Muller 1995).

Es notoria la falta de información de la prevalencia de virus -entendida como el cociente del número de poblaciones que presentan un virus en particular entre el total de poblaciones muestreadas-, en las poblaciones de parientes silvestres de cultivos en los centros de origen. La evaluación de la incidencia y prevalencia de estos virus en poblaciones silvestres adquiere relevancia en temas de bioseguridad sobre la liberación de organismos genéticamente modificados, ya que para los ZYMV, CMV, WMV2, PRSV y SqMV, además de ser los principales virus que infectan cucurbitáceas, se desarrollaron cultivares de calabaza y papaya con resistencia a esos virus (Tricoll et al. 1995, Lius et al. 1997, Lecoq et al. 1998). En el pasado se establecieron ensayos con variedades GM de calabaza y papaya con resistencia a virus en México (CIBIOGEM 2014). Bajo un escenario de un supuesto escape del transgene de resistencia hacia plantas silvestres de *C. argyrosperma*, el casete insertado podría estar expuesto a la interacción con virus que ocurren naturalmente en esas poblaciones silvestres. Un estudio reciente demostró que el pariente silvestre *Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia* es capaz de asimilar y expresar el transgene de resistencia a virus (ZYMV, CMV, WMV) vía hibridación con *Cucurbita pepo* GM (Cruz-Reyes et al. 2015). En ese contexto se abriría la posibilidad para que se presenten otros riesgos como la posible heterocapsidación de la secuencia de resistencia por otro virus o una posible recombinación entre genomas de virus

(Tepfer 2002). Sin embargo desconocemos si tales virus ocurren naturalmente fuera de las áreas de los cultivos, de manera específica: si utilizan a la *C. argyrosperma* ssp. *sororia* como un hospedero natural. Así estos datos son relevantes para determinar si el transgene de resistencia a virus puede tener interacción con otros virus en poblaciones silvestres de calabazas.

En este trabajo me pregunto si las poblaciones silvestres de calabacita son hospederos comunes de virus que infectan a cultivares de calabaza. Para abordar esta cuestión evaluamos la epidemiología de diferentes virus en poblaciones naturales, específicamente la incidencia y la prevalencia de los virus ZYMV, CMV, WMV2, PRSV y SqMV en poblaciones naturales de la calabaza silvestre *C. argyrosperma* ssp. *sororia* en el sitio centro de origen y domesticación del género *Cucurbita*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hospederos y patógenos

Cucurbita argyrosperma ssp. *sororia* (Cucurbitaceae) es una calabaza silvestre, herbácea rastrera o trepadora con crecimiento indeterminado, es una planta monoica, protándrica, autocompatible. Se distribuye desde el sur de Norteamérica hasta Centroamérica (de México a Nicaragua) en áreas de selva baja caducifolia (Merrick 1990). Esta calabaza silvestre se encuentra comúnmente en sitios perturbados, asociada a ambientes agrícolas, es una especie oportunista que coloniza rápidamente los espacios abiertos al inicio de la temporada de lluvias. Florece en la época de lluvia y su fructificación ocurre principalmente entre noviembre y diciembre (Lira, 1995). Al igual que otras especies del género *Cucurbita* es atacada por herbívoros coleópteros (*Acalymma vittata*, *Diabrotica undecimpunctata*, Metcalf y Rhodes 1990, Mariano 2001) así como por áfidos (*Myzus persicae*, Brunt et al. 1996).

Se conoce que las plantas domesticadas del género *Cucurbita* son hospederos comunes de virus. Los principales vectores de transmisión para el ZYMV, el CMV, el WMV-2 y del PRSV son insectos áfidos, mientras que el SqMV tiene como vectores a coleópteros además de poder ser transmitido mediante semillas (Freitag 1956, Lecoq et al. 1998). El ZYMV puede ser transmitido verticalmente vía semillas (Lecoq et al. 1998). Algunos de estos virus (ZYMV, el CMV, del WMV-2) tienen una distribución mundial y otros están restringidos localmente (SqMV, Paris 2008). Estos virus además de presentar una sola cadena de ARN (excepto el SqMV que presenta una doble cadena), pueden expresar una sintomatología común (malformaciones de hojas, decoloraciones, enanismo, etc.), además son transmitidos de forma semipersistente (son transmisores del virus durante un periodo breve) entre los hospederos (Brunt et al. 1996).

Distribución del hospedero

La ubicación geográfica y localización de las poblaciones silvestres de *C. argyrosperma* spp. *sororia* fue obtenida en el 2007 de los registros de colecta del Herbario Nacional de México (MEXU), de la página electrónica de la CONABIO, del Missouri Botanical Garden, así como de los registros de poblaciones que generamos durante este estudio. Durante tres años, colectamos muestras de 46 poblaciones silvestres de *C. argyrosperma* ssp. *sororia* a lo largo de 760 km de la costa mexicana del Pacífico, abarcando los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Las distintas poblaciones estuvieron separadas por al menos 10 km en la región de Chamela y hasta por 60 kilómetros en el resto de la distribución. Elegimos poblaciones que tuvieron al menos 6 individuos y tomamos muestras de tejido de cada individuo de tres diferentes guías.

Detección de virus

Determinamos la presencia de virus en las poblaciones silvestres utilizando una prueba serológica comercial (DAS Elisa, AGDIA®). Colectamos y congelamos 5 hojas de cada individuo en cada una de las poblaciones muestreadas que tuviera al menos 6 individuos y las llevamos al laboratorio para realizar la prueba de detección. Las muestras fueron utilizadas para la detección por separado de cinco virus; el virus mosaico de la sandía (WMV-2), el virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV), el virus mosaico del pepino (CMV), el virus mosaico de la calabaza (SqMV) y el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV).

La prevalencia de los virus en las poblaciones de *C. argyrosperma* ssp. *sororia*, fue obtenida dividiendo el número de poblaciones que presentan un virus en particular entre el total de poblaciones muestreadas (Nutter 1997). Mientras que la incidencia viral se definió a nivel de organismo, dividiendo el número de plantas infectadas por un virus en particular, entre el total de plantas muestreadas (Nutter 1997).

Por otra parte, la tasa de colonización y la tasa de extinción de los virus en las poblaciones de *C. argyrosperma* ssp. *sororia*, fue obtenida como:

$$\text{tasa de colonización} = \frac{(Ni_t)(Vi_{t-1})}{S_t}$$

$$\text{tasa de extinción} = \frac{S_t}{Vi_{t-1}}$$

donde Ni es el número de poblaciones infectadas que no estaban infectadas en el censo anterior, Vi es el número de poblaciones infectadas, S es el número de poblaciones sanas, y t es el censo (Antonovics 2004). Un evento de colonización se refiere a la condición donde un

virus está presente en una población que el año o censo previo no lo presentaba. Por otra parte la extinción hace referencia a la ausencia de un virus en una población que en el censo previo tuvo individuos infectados con él.

RESULTADOS

Encontramos que la *C. argyrosperma* ssp. *sororia* es hospedero común de tres (ZYMV, PRSV, SqMV) de los cinco virus comúnmente encontrados en las especies cultivadas de calabazas. Esos tres virus fueron detectados en la calabacita silvestre a lo largo de todo el rango latitudinal del muestreo (desde Sinaloa hasta Oaxaca). Encontramos poblaciones silvestres sin virus y poblaciones con uno, dos virus (ZYMV-SqMV y SqMV-PRSV) y hasta tres virus (ZYMV-SqMV-PRSV). Figura 1.

La tercera parte de las poblaciones muestreadas de la planta hospedera, presentaron infección por algún virus (ZYMV o PRSV, o SqMV). El ZYMV tuvo una prevalencia promedio de 0.32, el SqMV de 0.31 y el PRSV de 0.29 durante tres años. De estos tres virus, el ZYMV tuvo mayor cambio en la prevalencia entre años, casi duplicó el número de poblaciones infectadas, le siguió el virus PRSV mientras que el SqMV mostró mayor estabilidad en la prevalencia en estos tres años (Tabla 1). Sin embargo no hubo diferencias significativas en la prevalencia entre años para ninguno de los tres virus (ZYMV, $X^2=2.093$, g.l.=2, $P>0.05$, para el PRSV, $X^2=0.746$, g.l.=2, $P>0.05$ y para el SqMV, $X^2=0.042$, g.l.=2, $P>0.05$). Finalmente, la prevalencia entre virus dentro de cada año, no varió de manera significativa ($X^2=1.04$, g.l.=2, $P>0.05$).

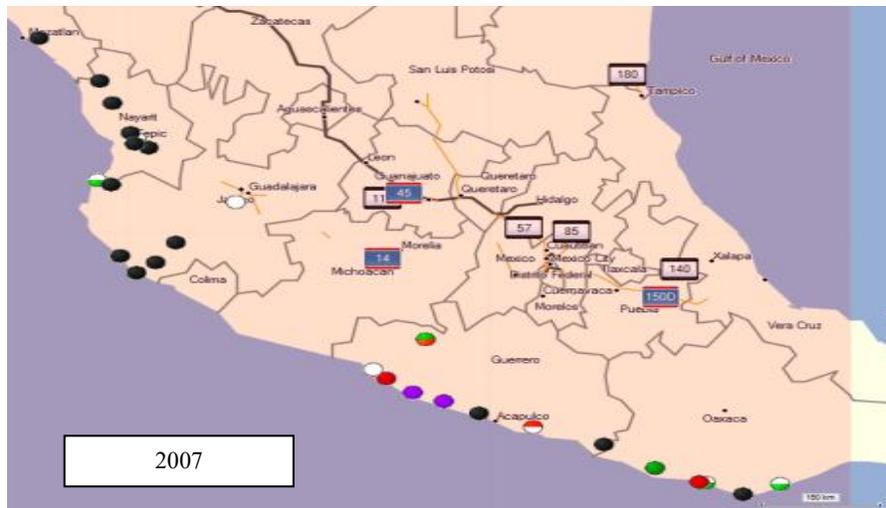


Figura 1. Mapas de ubicación de poblaciones de C. argyrosperma ssp. sororia donde se evaluó incidencia viral en tres años consecutivos. Círculo negro= sin virus, círculo rojo= ZYMV, círculo verde= SqMV, círculo blanco= PRSV. Círculo combinado con verde/rojo = ZYMV-SqMV, círculo blanco/verde= SqMV-PRSV, círculo rojo/blanco= ZYMV-PRSV, círculo morado= tres virus (ZYMV-PRSV-SqMV). ZYMV= virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini, SqMV = virus mosaico de la calabaza, PRSV =virus de la mancha anular de la papaya.

Tabla 1. Prevalencia de tres virus (ZYMV, PRSV, SqMV) en poblaciones silvestres de C. argyrosperma ssp. sororia en tres años. Poblaciones infectadas/total de poblaciones muestreadas.

Virus	Poblaciones infectadas		
	2007 n=27	2008 n=25	2009 n=22
ZYMV	0.22	0.4	0.36
PRSV	0.33	0.32	0.22
SqMV	0.29	0.32	0.31

En relación a las infecciones por más de un virus por población, en promedio durante los tres años, el 13% de las poblaciones presentaron dos virus. La prevalencia durante los tres años para la combinación de infección de SqMV y PRSV estuvo entre 0.22 y 0.5, para el ZYMV y el PRSV de 0.11 a 0.17 y para el par de virus ZYMV-SqMV fue de 0.09 a 0.20. Mientras que, la presencia de tres virus (ZYMV-SqMV-PRSV) en promedio fue del 5% de las poblaciones, con un rango del 0% al 8%, aunque el último año no detectamos poblaciones con tres virus (Figura 1).

Respecto a la incidencia, encontramos que el promedio de plantas de la calabacita silvestre infectadas en este periodo fue de 15.2% (n=114 individuos), del 9.4% (n=197), 9.2% (n=162) y para los virus del SqMV, del ZYMV y del PRSV respectivamente. También observamos cambios en la incidencia viral entre años. Los cambios más pronunciados entre años continuos, ocurrieron en la incidencia del virus mosaico de la calabaza que pasó de 8% a 24 % (SqMV), mientras que los cambios para el ZYMV y el PRSV fueron más suaves, ya que pasaron del 5% al 13% y de 10% al 7% respectivamente (Figura 2).

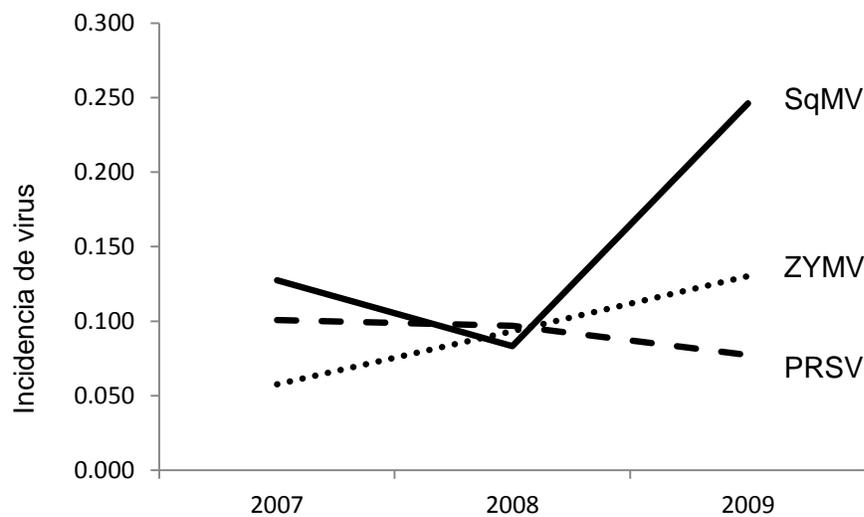


Figura 2. Incidencia de los virus del ZYMV, PRSV y SqMV virus en individuos de C. argyrosperma ssp. sororia en su rango de distribución de la costa pacífica mexicana en un lapso de tres años.

Determinamos la probabilidad de encontrar poblaciones con más del 50% de los individuos infectados por un mismo virus, y ésta fue de 0.47, del 0.25 y 0.17 para SqMV, PRSV y ZYMV respectivamente (Figura 3).

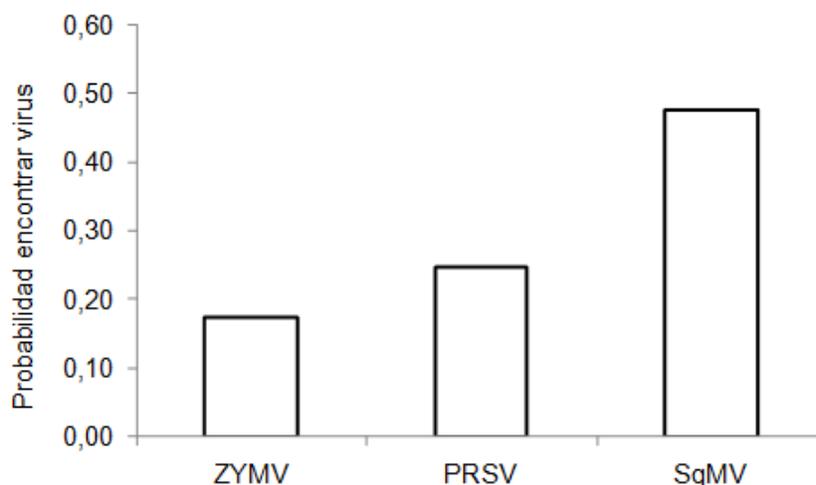


Figura 3. Probabilidad de encontrar poblaciones en las que más de la mitad de las plantas presentan virus. Virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV), virus de la mancha anular de la papaya (PRSV), virus mosaico de la calabaza (SqMV).

Algunas poblaciones de *C. argyrosperma* ssp. *sororia* pueden estar infectadas por dos o más virus, ocasionalmente esas infecciones recaen sobre un mismo individuo. La incidencia por múltiples virus en las poblaciones de la calabacita silvestre fue mínima. El rango de la frecuencia de infección para la combinación de los virus PRSV-SqMV fue del 0.8% al 4%, para la combinación PRSV-ZYMV fue del 0.05% al 3% y para ZYMV-SqMV fue de 0.05% al 4% en los tres años de muestreo. Encontramos que algunas infecciones múltiples en las plantas silvestres de calabaza, pueden ser más comunes y estar asociadas significativamente durante dos años consecutivos; el PRSV estableció infecciones mixtas con el SqMV y con el ZYMV de (Tabla 2). Mientras que, la infección en esta calabacita silvestre por el ZYMV y el SqMV podría ser menos frecuente, ya que la infección múltiple que incluye a estos dos virus no fue significativa (Tabla 2).

Tabla 2. Odds ratio de la probabilidad para detectar infecciones múltiples para dos virus en una misma planta de *C. argyrosperma* ssp. *sororia*.

Combinación de virus	Odds ratio	P	Intervalo de confianza		año
			mínimo	máximo	
SqMV - PRSV	3.42	0.017	1.25	9.36	2007
SqMV - PRSV	15.44	0.000	4.44	53.68	2008
SqMV - PRSV	0.47	0.499	0.05	4.08	2009
PRSV - ZYMV	0.59	0.624	0.07	4.77	2007
PRSV - ZYMV	6.18	0.004	1.79	21.30	2008
PRSV - ZYMV	16.50	0.001	3.13	86.89	2009
SqMV - ZYMV	0.44	0.444	0.06	3.54	2007
SqMV - ZYMV	1.73	0.502	0.35	8.59	2008
SqMV - ZYMV	2.32	0.182	0.67	7.99	2009

En relación a la colonización de nuevas poblaciones de calabacitas por los tres virus (ZYMV, PRSV, SqMV), no encontramos diferencias significativas en la tasa de colonización de esos virus en el 2008 ($X^2=1.417$, g.l.=2, $P>0.05$) ni en el 2009 ($X^2=0.210$, g.l.=2, $P>0.05$). Respecto a la tasa de extinción, encontramos diferencias significativas entre los tres distintos virus en el 2008 ($X^2=25.004$, g.l.=2, $P<0.05$) y en el 2009 ($X^2=14.400$, g.l.=2, $P<0.05$, Tabla 3). En ese periodo, la tasa de extinción siempre fue mayor que la tasa de colonización para los tres virus, exceptuando al SqMV que durante el 2008 infectó las mismas poblaciones que en el 2007 (Tabla 3). Específicamente para el ZYMV, la tasa de extinción fue tres veces mayor que la tasa de colonización en el primer periodo ($Z=-2.74$, $P<0.05$, dos colas), para el segundo la diferencia aumentó hasta 14 veces ($Z=-4.56$, $P<0.05$, dos colas). Esa tendencia se repitió con

el PRSV: la diferencia fue de 11 veces ($Z=-4.312$, $P<0.05$, dos colas) y 14 veces ($Z=-4.56$, $P<0.05$, dos colas) entre la tasa de extinción y la tasa de colonización en el segundo y tercer año respectivamente. Para el SqMV, la tasa de extinción fue mayor (15 veces) que la tasa de colonización ($Z=-2.58$, $P<0.05$, dos colas) sólo en el segundo año (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de colonización y extinción de virus en poblaciones de C. argyrosperma ssp. sororia para el segundo y tercer años de muestreo. El primer cálculo fue realizado con 17 poblaciones y el segundo con 9 poblaciones re-muestreadas durante dos años consecutivos.

Virus	2008		2009	
	Tasa colonización	Tasa extinción	Tasa colonización	Tasa extinción
ZYMV	0.200	0.667	0.071	1.0
PRSV	0.067	0.800	0.071	1.0
SqMV	0.111	0.0	0.033	0.5

DISCUSIÓN

En este trabajo describimos la dinámica de un sistema patógeno-hospedero; en particular estudiamos la incidencia y distribución de cinco virus en poblaciones de la calabaza silvestre *C. argyrosperma ssp. sororia* en el centro de domesticación. Mostramos que hay variación en la prevalencia de infecciones virales en las poblaciones silvestres durante tres años. Además, nuestros datos sugieren que ciertas combinaciones de infecciones virales mixtas son más comunes en esta calabaza silvestre. *C. argyrosperma ssp. sororia* es un hospedero común de los virus del ZYMV, del PRSV y del SqMV. Estos tres virus se encuentran asociados temporal y espacialmente a las poblaciones de esta calabacita silvestre en la costa del Pacífico mexicano. En esas poblaciones esos virus tienen una prevalencia

importante; aproximadamente una tercera parte de las poblaciones muestreadas los presentan. Esto indica que en el centro de origen y domesticación del género Cucurbita, se estableció una relación ecológica importante entre estas plantas silvestres como hospederas con los virus del ZYMV, PRSV (Potivirus) y del SqMV (Comovirus) y sus vectores, la cual permitió a esos virus dispersarse en las poblaciones silvestres distribuidas en la vertiente de la costa del Pacífico mexicano.

La incidencia de estos tres virus en las poblaciones de la calabacita silvestre muestreadas es baja. En general la presencia de virus en condiciones silvestres es poco evidente (Prendeville et al. 2012), nosotros detectamos que una sexta parte de los individuos muestreados en las poblaciones están infectados con los virus de ZYMV, del PRSV o del SqMV. Nuestros datos coinciden con la incidencia de patógenos en otros sistemas naturales, en los que se observó una incidencia menor al 15% (Burdon y Thrall 2014, Prendeville et al. 2012).

Por otra parte, los virus de WMV-2 y CMV no fueron detectados en las poblaciones de esta calabacita silvestre. Se considera que el WMV-2 es un patógeno más activo en cultivos de ambientes templados y para el CMV se tiene una baja incidencia en cultivos en Latinoamérica (Romay et al. 2014). Ambos virus han sido detectados en poblaciones norteñas de vida libre de *C. pepo* ssp. *texana* (Prendeville et al. 2012). No está claro cuáles son los factores que han impedido la dispersión de este par de virus en las poblaciones de esta calabacita silvestre.

Este trabajo muestra que la infección por virus al interior de las poblaciones silvestres de calabaza es un proceso dinámico. Por ejemplo, el SqMV, aumentó su incidencia hasta tres

veces entre el segundo y el tercer año de muestreo; para el ZYMV y el PRSV, el cambio ocurrió pero fue menos acentuado. Además, el virus del SqMV, logró infectar la mayoría de los individuos de un parche en casi la mitad de las veces (47%) que fue detectado, en contraste con los ZYMV y PRSV, que sólo lo pudieron hacer en menos de una cuarta parte de las poblaciones en las que se encontraron.

Es probable que esas diferencias entre virus estén ligadas a los tipos de vectores y su comportamiento de forrajeo así como la forma de transmisión en el caso del SqMV. Los áfidos (*Myzus*), vectores de transmisión del ZYMV y del PRSV son polípagos, con un amplio rango de hospederos (Lecoq et al. 1998, Ng y Perry 2004), mientras que los coleópteros (*Acalymma* y *Diabrotica*) que transmiten el SqMV son casi monófagos del género *Cucurbita* debido posiblemente a una historia coevolutiva con estas plantas (Freitag 1956, Metcalf 1986). Además, estos escarabajos, tienden a moverse rápidamente entre parches de plantas (Lawrence y Bach 1989). En la especie *Diabrotica virgifera* se documentó un desplazamiento de insectos machos de 200m (Marquardt y Krupke 2009), mientras que en condiciones de poco viento, los áfidos tienen un rango de dispersión entre 20m hasta 100m de distancia (Loxdale y Lushai 1999). Integrar la información acerca de los vectores es importante para entender la dinámica de las poblaciones de virus, que desde el punto de vista de la teoría del parásito hospedero, sugiere que la tasa de transmisión así como la presencia de hospederos susceptibles, representan factores importantes para el éxito del virus (Power 1996).

Aunque en los centros de origen y domesticación de plantas pudieron ocurrir procesos coevolutivos entre plantas silvestres -que a la larga fueron domesticadas- y virus (Jones 2009), parece que no fue lo que sucedió en el centro mesoamericano de domesticación de cultivos para virus como el PRSV y el ZYMV. Las evidencias sugieren que el PRSV tuvo su origen

hace unos 400 años en Asia (Olarte Castillo et al. 2011). Según un análisis genético, el virus llegó a América hace unos 300 años, posiblemente a través del comercio de semillas de especies de cucurbitáceas infectadas (Gibbs et al. 2008). Al parecer, México tuvo un papel de pivote en la diseminación de la variante *P* del PRSV (que infecta a la papaya) hacia EUA y Australia. Es importante subrayar que México es centro de origen y domesticación de especies de los géneros *Carica* (papaya) y *Cucurbita* (Bateson et al. 2002). Para la otra variante del PRSV (*W* PRSV) que infecta únicamente a la *Cucurbita* no existen datos genéticos que permitan aclarar su origen. Análisis de muestras de plantas silvestres como *C. argyrosperma* ssp. *sororia* podrían ayudar a determinar relaciones del origen de la variante *W* PRSV.

En relación al ZYMV, un análisis de la tasa molecular de evolución de 55 accesiones, sugiere que los linajes tienen una ancestría menor a los 800 años. En cuanto a su propagación en tiempos recientes, se plantea que el comercio facilitó su llegada al continente americano desde Europa en donde infectó varios cultivos de *Cucurbita* (Simmons et al. 2008, Gibs y Ohshima 2010). Para el grupo de potivirus al que pertenece ZYMV se sugiere un origen Asiático (Gibs y Ohshima 2010). Hasta donde sabemos no existen datos que permitan identificar el origen del SqMV.

Las evidencias antes mencionadas sugieren que los PRSV y ZYMV, tuvieron su encuentro con esta calabacita silvestre recientemente. Una condición donde los virus colonizan un nuevo hospedero puede representar una oportunidad para estudiar la evolución de la resistencia a virus, en particular el modo y la tasa en que se generan los genes de resistencia en el hospedero (Gibbs et al. 2010). También se puede estudiar el papel que tiene el hospedero en la epidemiología de los virus en la llamada fase agroecológica (un tema en auge) en la que crecen las poblaciones de esta calabacita silvestre (Vincent et al. 2015). El que *C.*

argyrosperma ssp. *sororia* sea susceptible a infecciones múltiples de más de un tipo de virus puede resultar en infecciones antagónicas o sinérgicas con consecuencias epidemiológicas impredecibles (Syller 2012). Nuestros resultados sugieren que el virus del PRSV puede establecer infecciones múltiples con el ZYMV y con SqMV; mientras que, la infección simultánea de ZYMV y SqMV es menos común. Otro caso ocurre en los géneros *Lagenaria* y *Cucumis* de cucurbitáceas donde la presencia simultánea de proteínas virales de ZYMV y CMV pueden retrasar de manera recíproca la aparición de los picos de acumulación viral al interior de las células (Zeng et al. 2007). Por otra parte se conoce que la emergencia de enfermedades infecciosas en zonas tropicales puede deberse a relaciones sinérgicas entre virus (Fargette et al. 2006).

Los resultados de la incidencia y la prevalencia del ZYMV, PRSV y SqMV en *C. argyrosperma* ssp. *sororia* sugieren que puede haber un proceso continuo de infección de individuos al interior de una población, pero también puede haber transferencia entre las poblaciones, lo cual resulta en una amplia dispersión de esos patógenos en las poblaciones silvestres. En particular la presencia de ZYMV en poblaciones de *C. argyrosperma* ssp. *sororia* es importante para la determinación del riesgo de liberación de calabazas transgénicas con resistencia a virus.

Las infecciones mixtas son de particular relevancia en la determinación del riesgo ecológico de los cultivos genéticamente modificados con resistencia a virus mediada por proteínas de cubierta viral, específicamente en esta calabacita silvestre, porque es capaz de asimilar secuencias del transgene de resistencia a virus mediante hibridación con el cultivar de zucchini (*C. pepo*) modificado genéticamente (Cruz et al. 2015). Bajo una condición de

infección mixta, la posibilidad de recombinación entre el genoma de los virus presentes de manera natural y las secuencias del transgene puede ocurrir (Roosnick 1997).

La resistencia a virus en plantas GM conferida mediante proteína de cubierta (CP), abre la posibilidad de heterocapsidación entre CP y el ARN perteneciente a otros virus que infecten esa planta (Tepfer 2002). Esta posibilidad se abordó en un campo experimental (con calabazas GM y no GM), se evaluó el movimiento de una cadena no transmisible por áfidos del ZYMV (MV) a través de la CP del virus del WMV, la cual sucedió posiblemente por heterocapsidación o recombinación, sin embargo la transmisión no alcanzó niveles epidémicos (2%) y su ocurrencia se restringió a las plantas modificadas (Fuchs et al. 1999).

Por otra parte, la recombinación es importante en la evolución de los virus, ya que implica cambios en el material genético (Tepfer 2002, Worobey y Holmes 1999, Rubio et al. 1999). En un trabajo experimental Torturo et al. (2008), encontraron que la tasa de recombinación entre el virus mosaico del pepino CMV y el virus de la aspermia del tomate (TAV) es similar entre plantas GM y plantas no GM de tabaco (*Nicotiana tabacum*), esto indicaría que las nuevas partículas virales surgidas a partir de la recombinación con el transgene de resistencia a virus (TRV) serían cualitativamente similares a las que surgieran de forma natural (Roosnick 1997). Un análisis de hipótesis de riesgo sobre la recombinación del virus CMV en plantas GM con el ARN de un virus que infecte naturalmente esas plantas, concluyó que la posibilidad de generar un nuevo virus es baja (Tepfer et al. 2015)

La introgresión del transgene de resistencia a virus en un pariente silvestre puede volverlo una maleza, si el transgene otorga una ventaja sobre algún virus que limite el crecimiento de la población (Tepfer 2002). En un trabajo reciente se analizó el efecto de la

inoculación del virus del ZYMV sobre la tasa de crecimiento en poblaciones silvestres de *C. pepo*, el efecto fue variable e incluyó desde incrementos en la tasa de crecimiento hasta otras poblaciones que sufrieron una disminución (Prendeville et al. 2014). Esos efectos en la tasa de crecimiento ocurrieron aunque, la fecundidad de los individuos no se vio reducida. Desconocemos cuál es el efecto del ZYMV en la tasa de crecimiento de poblaciones silvestres de *C. argyrosperma*, mismas que pueden asimilar el TRV y que a la vez presentan infecciones naturales por el ZYMV. Por otra parte se sabe que la característica transgénica de resistencia a virus no impide la transmisión vertical del virus a través de semillas y polen en plantas retrocruzantes de *C. pepo* (Simmons et al. 2015, Harth et al. 2016).

Faltan estudios ecológicos que aborden varias incógnitas sobre los efectos del transgene durante el proceso de hibridación; por ejemplo si en un contexto de genotipos híbridos, puede haber cambios en la preferencia de los polinizadores (Prendeville y Pilson 2009), o ¿cuál podría ser la participación del TRV en la interacción entre el vector de un virus y el hospedero híbrido? La interacción entre el huésped y el virus puede influir en la distribución de este último (Hall et al. 2010), por ejemplo el virus mosaico del pepino (CMV) puede provocar emisión de compuestos volátiles en *C. pepo*, para atraer vectores como los áfidos con lo cual facilita su dispersión (Mauck et al. 2010). Por otra parte las calabazas transgénicas pueden alterar la dinámica epidémica de los virus, ya que previenen la dispersión entre plantas del ZYMV y WMV (Klas et al. 2006), sin embargo, no impiden la transmisión vertical del ZYMV vía polen, que puede ser otra manera de dispersar este virus (Harth et al. 2016). Cabe preguntarse si estos procesos que fueron estudiados en condiciones experimentales también pueden ocurrir en condiciones naturales y en un contexto híbrido, en el cual los parásitos pueden presentar diversas respuestas ante hospederos híbridos (Fritz et al. 1999).

LITERATURA CITADA

- AGMRC 2014. Agricultural marketing resources center. <http://www.agmrc.org/commodities-products/vegetables/squash/>
- Antonovics J. 2004. Long-term study of a plant-pathogen metapopulation. En Hanski I y Gaggiotti eds. Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations. Academic Press.
- Antonovics, J., Thrall, P. H., Jarosz, A., y Stratton, D. (1994). Ecological genetics of metapopulations: the *Silene-Ustilago* plant-pathogen system. Ecological Genetics: 146-170.
- Bateson, M. F., R. E. Lines, P. Reville, W. Chaleeprom, C. V Ha, A. J. Gibbs, y J. L. Dale. 2002. On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus Papaya ringspot virus. The Journal of general virology 83:2575–85.
- Brunt, A.A., K.Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs, L. Watson y E.J. Zurcher (editores). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. URL www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/
- Burdon, J. J., y P. H. Thrall. 2008. Pathogen evolution across the agro-ecological interface: implications for disease management. Evolutionary Applications 1:57–65.
 - Burdon, J. J., y P. H. Thrall. 2014. What have we learned from studies of wild plant-pathogen associations?—the dynamic interplay of time, space and life-history. European Journal of Plant Pathology 138:417–429.
 - Burdon, J. J., L. Ericson, y W. J. Muller. 1995. Temporal and spatial changes in a metapopulation of the rust pathogen *Triphragmium ulmariae* and its host, *Filipendula ulmaria*. The Journal of Ecology 83:979-989.
 - Cooper, I., y R. A. C. Jones. 2006. Will plants and viruses: under-investigated ecosystems. Advances in Virus Research. 67:1-47.
 - Fargette D., G. Konate, C. Fauquet, Muller, E. Peterschmitt y J. M. Thresh. 2006. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. Annual. Review of Phytopathology. 44: 235-260.

- Félix-Gastélum, R., M. A. Magallanes-Tapia, J. Méndez-Lozano, H. Huet, J. Á. Trigueros-Salmerón, y R. M. Longoria-Espinoza. 2007. Detección del Virus Mosaico Amarillo de la Calabaza Zucchini (ZYMV) y su coinfección con otros virus en Cucurbitáceas cultivadas y plantas silvestres en el valle del Fuerte, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:95–101.
- Fereres, A., y A. Moreno. 2009. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research* 141:158–168.
- Freitag, J. H. 1956. Beetle transmission, host range and properties of squash mosaic virus. *Phytopathology* 46: 73-81.
- Fritz, R. S., Moulia, C., y Newcombe, G. 1999. Resistance of hybrid plants and animals to herbivores, pathogens, and parasites. *Annual review of ecology and systematics*, 565-591.
- Fuchs, M., A. Gal-On, B. Raccah, y D. Gonsalves. 1999. Epidemiology of an aphid nontransmissible potyvirus in fields of nontransgenic and coat protein transgenic squash. *Transgenic Research*, 8, 429-439.
- Gámez-Virúés, S., and A. Eben. 2005. Comparison of beetle diversity and incidence of parasitism in diabroticina (Coleoptera: Chrysomelidae) species collected on cucurbits. *Florida Entomologist* 88:72–76.
- García-Arenal, F. y B.A. McDonald. 2003. An analysis of the durability of the resistance to plant viruses. *Phytopathology*, 93, 941–952.
- Gianessi, L.P. Silvers, C.S. Sankula y J.E. Carpenter. 2002. *Plant biotechnology: Current and potential impact for improving pest management in U.S. agriculture an analysis of 40 case studies*. Washington, DC, USA: National Center for Food and Agricultural Policy.
- Gibbs, A. y K. Ohshima. 2010. Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology* 48:205-223.
- Gibbs A.J, D.Fargette, F. Garcia-Arenal y M.J. Gibbs. 2010. Time-the emerging dimension of plant virus studies. *Journal of general virology* 91:13-22.
- Gilbert, G. S. 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 40:13–43.

- Gilligan, C.A. 2008. Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science* 363: 741–759.
- Harth, J.E., H.E, Simmons y A.G. Stephenson. 2016. Vertical infection of Zucchini yellow mosaic virus via pollen transmission occurs at a lower frequency than ovule transmission. *European Journal of Plant Pathology*. doi:10.1007/s10658-016-1024-5.
- Hammond, J., Lecoq, H., & Raccach, B. 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Advances in Virus Research*, 54, 189-316.
- Holman, J. 1971. Factors influencing the host range of the aphids in the tropics. 13th International. Congress of Entomology. Proc. 2:339-340.
- Hull, R. 2009. *Comparative Plant Virology*. 2^a edición. Academic Press.
- Jones, R. A. C. 2014. Plant virus ecology and epidemiology: historical perspectives, recent progress and future prospects. *Annals of Applied Biology* 164:320–347.
- Klas, F. E., M. Fuchs, y D. Gonsalves. 2006. Comparative spatial spread overtime of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) and Watermelon Mosaic Virus (WMV) in fields of transgenic squash expressing the coat protein genes of ZYMV and WMV, and in fields of nontransgenic squash. *Transgenic Research* 15:527–541.
- Klueken, A. M., B. Hau, B. Ulber, y H.-M. Poehling. 2009. Forecasting migration of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) in autumn and spring. *Journal of Applied Entomology* 133:328–344.
- Lawrence W. S. y C. E. Bach 1989. Chrysomelid beetle movements in relation to host-plant size and surrounding non-host vegetation. *Ecology* 70:1679–1690.
- Lecoq, H., Wisler, G., Pitrat, M. 1998. Cucurbit viruses : the classics and the emerging. Páginas 126-142 en *Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm*, ASHS Alexandria, USA :
- Lira-Saade, R. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica. IPGRI, Rome Italy.
- Lovisolo, O., R. Hull, y O. Rösler. 2003. Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible paleontology. *Advances in Virus Research* 62:325–379.

- Loxdale, H.D., y G. Lushai. 1999. Slaves of the environment: the movement of herbivorous insects in relation to their ecology and genotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 354:1479-1498.
- Lius S, R.M. Manshardt, M.M.M. Fitch, J.L. Slightom, J.C. Sanford, et al. 1997. Pathogen derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Mol. Breed.* 3:161–68.
- Maríano, B. N. 2001 Efecto de la herbivoría sobre la adecuación masculina y femenina de *Cucurbita argyrosperma* ssp. *sororia*. Tesis de Doctorado en Ecología. Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.
- Marquardt, P. T., y C. H. Krupke. 2009. Dispersal and mating behavior of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Bt cornfields. *Environmental Entomology* 38: 176-182.
- Mauck, K. E., C. M. De Moraes, y M. C. Mescher. 2010. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:3600–3605.
- Merrick, L. C. 1990. Systematics and evolution of a domesticated squash, *Cucurbita argyrosperma*, and its wild and weeds relatives. Páginas 77–95 D.M. Bates, R.W. Robinson y C. Jeffrey, editores. *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca.
- Metcalf, R.L. y A.M. Rhodes. 1990. Co-evolution of the Cucurbitaceae and Luperini (Coleoptera: Chrysomelidae): basic and apply aspect., en D.M. Bates, R.W. Robinson y C. Jeffrey, eds. *Biology and Utilization of Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca.
- Ng, J. C. K., y K. L. Perry. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology* 5:505–511.
- Nelson, M.R., J.A. Laborde, y H.H. McDonald, 1966. Cucurbit viruses on the west coast of Mexico. *Plant Disease Reporter* 50:947-950.
- Noa-Carrazana, J. C., D. González-de-León, y L. Silva-Rosales. 2007. Molecular characterization of a severe isolate of papaya ringspot virus in Mexico and its relationship with other isolates. *Virus Genes* 35:109–117.
- Nutter, F. W. 1997. Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. *Crop Protection* 16:603–618.

- Olarte Castillo, X. A., G. Fermin, J. Tabima, Y. Rojas, P. F. Tennant, M. Fuchs, R. Sierra, A. J. Bernal, y S. Restrepo. 2011. Phylogeography and molecular epidemiology of Papaya ringspot virus. *Virus Research* 159:132–140
- Paris, H.S. 2008. Summer squash. en Prohens J, F. Nuez y M. J. Carena eds. Handbook of plant breeding, Vegetables I. New York: Springer.
- Pérez-Moreno L., R Díaz, E. Rico, J.R. Sánchez, R. F. Rivera, J.T. Ascencio, 2004. Identificación de Virus Fitopatógenos en Cultivos Hortícolas de Importancia Económica en el Estado de Guanajuato, México *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 2.
- Power A.G. y A.S. Flecker 2003. Virus specificity in disease systems: Are species redundant? En Levin S.A., y P. Kareiva, eds. *The importance of species: perspectives on expendability and triage*. Princeton University Press, Princeton.
- Power, A. G. 1991. Virus spread and vector dynamics in genetically diverse plant populations. *Ecology* 72:232.
- Power A.G. 1996. Competition between viruses in complex plant-pathogen system. *Ecology* 77:1004-1010.
- Prendeville H.R., B.Tenhumberg y D. Pilson. 2014. Effects of virus on plant fecundity and populations dynamics. *New Phytologist* 1-11.
- Prendeville, H. R., X. Ye, T. J. Morris, y D. Pilson. 2012. Virus infections in wild plant populations are both frequent and often unapparent. *American Journal of Botany* 99:1033–42.
- Raybould, A. F., L. C. Maskell, M-L. Edwards, J. I. Cooper, y A. J. Gray. 1999. The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. *New Phytologist* 141:265–275.
- Reddy D.V.R., M.R. Sudarshanaw, M. Fuchs, N.C. Rao y G. Thottappilly. 2009. Genetically engineered virus-resistant plants in developing countries: current status and future prospects. *Advances in Virus Research* 75:185-220.
- Rodoni, B. 2009. The role of plant biosecurity in preventing and controlling emerging plant virus disease epidemics. *Virus Research* 141:150–157.
- Roossinck, M. J. 2005. Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3:917–924.

- Sacristán, S., A. Fraile, y F. García-Arenal. 2004. Population dynamics of Cucumber Mosaic Virus in melon crops and in weeds in central Spain. *Phytopathology* 94:992–8.
- Sastry, K. S. 2013. *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Simmons, H. E., H. R. Prendeville, J. P. Dunham, M. J. Ferrari, J. D. Earnest, D. Pilson, G. P. Munkvold; E. C. Holmes y A. G. Stephenson. 2015. Transgenic virus resistance in crop-wild *Cucurbita pepo* does not prevent vertical transmission of zucchini yellow mosaic virus. *Plant Disease*, 99: 1616-1621.
- Sisterson, M. S. 2008. Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: insights from a model. *Journal of Economic Entomology* 101:1–8.
- Syller, J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* 13:204–216.
- Tepfer, M. 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annual Review of Phytopathology* 40:467–91.
- Tomlinson, J. A., A. L. Carter, W. T. Dale, y C. J. Simpson. 1970. Weed plants as sources of cucumber mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 66:11–16.
- Turturo, C., A. Friscina, S. Gaubert, M. Jacquemond, J. R. Thompson y M. Tepfer. 2008. Evaluation of potential risks associated with recombination in transgenic plants expressing viral sequences. *Journal of General Virology*. 89: 327-335.
- Vincent S.J., B. A. Coutts, R.A.C. Jones. 2014. Effects of introduced and indigenous viruses on native plants; exploring their disease causing potential at the agro-ecological interface. *Plos One* 9(3) e91224
- Waggoner, P.E., y Aylor D.E. 2000. Epidemiology: a science of patterns. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 71–94.
- Wren, J. D., M. J. Roossinck, R. S. Nelson, K. Scheets, M. W. Palmer, y U. Melcher. 2006. Plant virus biodiversity and ecology. *PLoS biology* 4:e80.
- Zeng, R., Q. Liao, J. Feng, D. LI, y J. Chen. 2007. Synergy between Cucumber Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus on Cucurbitaceae hosts Tested by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39:431–437.

DISCUSIÓN GENERAL

Y CONCLUSIONES

La introgresión de secuencias transgénicas en poblaciones de parientes silvestres es uno de los principales riesgos ambientales de la utilización de cultivos genéticamente modificados (Snow et al. 2005). Dado que el flujo génico entre plantas cultivadas y parientes silvestres ocurre, el proceso también es posible entre las variedades de cultivos modificados genéticamente (GM) y los parientes silvestres. Para que ocurra el escape tiene que completarse el flujo génico. Primero el cultivo GM y el pariente silvestre deben crecer en cercanía, pero además tiene que suceder un traslape temporal en la fase reproductiva. Estas condiciones permitirían un entrecruzamiento entre ambos genotipos; para que el proceso continúe, la progenie producida tiene que ser viable y fértil (Gepts y Papa 2004). Cumplidas estas condiciones la introgresión del transgene puede iniciar si las plantas híbridas portadoras logran entrecruzarse con las plantas silvestres por varias generaciones (Kwit et al. 2011). La introgresión dependerá también del efecto que tenga la expresión del transgene en la adecuación de los portadores y de la constancia del flujo génico a través de varias temporadas (Stewart et al. 2003). Así, la formación de híbridos fértiles entre cultivos GM y parientes silvestres (o razas locales) es un punto clave para la posible introgresión de un transgene en poblaciones de parientes silvestres.

No obstante lo anterior, la determinación del riesgo ambiental debido a la hibridación con los parientes silvestres, enfrenta dificultades al momento de su evaluación. Durante varias de las fases del flujo génico, la transferencia del transgene hacia los parientes silvestres puede verse interrumpida y cada fase puede evaluarse para determinar la probabilidad de

introgresión. Adicionalmente, el proceso de hibridación no siempre produce el mismo resultado en el desempeño de los híbridos, así que una generalización en relación al posible establecimiento de secuencias transgénicas considerando únicamente un bajo desempeño puede ser errónea. Es decir, es necesaria la evaluación del riesgo de introgresión caso por caso. Uno de los objetivos del análisis de riesgo es la evaluación de algún posible peligro para el ambiente debido a la liberación de OGM. Cumplir con ello representa un reto, debido a lo complicado de eliminar completamente la incertidumbre de la persistencia del transgene durante el proceso de hibridación (de Jong y Rong 2013).

Por otra parte, el análisis de riesgo ambiental enfrenta una dificultad en la definición del concepto de daño ambiental. Esto se refleja en la falta de un mecanismo claro y generalizable, que se pueda aplicar en el diseño de una prueba de hipótesis para probar un daño ambiental. La determinación del riesgo ambiental es específica debido a las distintas características transgénicas desarrolladas para diversos cultivos aprobados para su liberación: resistencia a herbicidas, expresión de pesticidas o resistencia a enfermedades (James 2013). La determinación del riesgo ambiental puede ser compleja si se considera el número de relaciones ecológicas en las que pueden participar los individuos portadores del transgene fuera de los ambientes agrícolas, esto aumenta las variables a considerar en el análisis de riesgo; por ejemplo los costos indirectos por la expresión del transgene (Sasu et al. 2009).

El caso de la liberación comercial de calabacitas transgénicas resistentes a virus muestra cómo la evaluación de algunos cultivos GM fuera de los centros de origen, está desfasada con la investigación en los sitios considerados centro de origen. Para varios eventos de modificación transgénica, el análisis del escape de estas secuencias hacia los parientes silvestres en sitios de domesticación, puede estar atrasado en relación al proceso de liberación comercial en otras regiones del mundo.

La posibilidad de introgresión de secuencias transgénicas de resistencia a virus (TRV) en parientes silvestres directa y no directamente emparentados a la variedad de calabaza modificada (*C. pepo*), está influida en parte por la segregación mendeliana del transgene en las generaciones híbridas y por el desempeño de esos híbridos (Spencer y Snow 2001, Cruz-Reyes et al. 2015). En el caso de los híbridos de primera y segunda generación entre la calabacita silvestre (*C. argyrosperma ssp. sororia*) no directamente emparentado con el cultivar de *C. pepo* TRV, la herencia del transgene ocurre en una frecuencia menor a la esperada sin embargo, al interior de algunas familias la segregación del TRV es del 50%. Por otra parte, en la primera generación de retrocruzantes con el pariente silvestre, la herencia del transgene ajusta al modelo mendeliano.

Mientras que la persistencia del transgene de resistencia virus en estas plantas silvestres puede verse favorecida por el modo de herencia, el desempeño de los híbridos podría no favorecerle. Aunque el desempeño y la fertilidad de los híbridos F₁ y F₂ son mínimos, los individuos son capaces de producir gametos viables en menor proporción. Mientras que en la generación de retrocruzantes se observa una pequeña mejoría en la función masculina comparado con la generación F₁, esto podría aumentar la probabilidad de que el transgene de resistencia a virus pase a la siguiente generación. Así la posibilidad de introgresión del transgene en el pariente silvestre *C. argyrosperma sororia* puede ser mínima en las primeras generaciones de híbridos, pero podría incrementar en las generaciones avanzadas de retrocruzantes (Cruz-Reyes et al. 2015). En este punto, algunos factores como la magnitud del flujo del transgene o la ventaja adaptativa que otorgue a los portadores la expresión de la secuencia pueden ser decisivos para su establecimiento en las poblaciones silvestres (Stewart et al. 2003).

Una condicionante para que se presente una ventaja adaptativa en los portadores del transgene es que las poblaciones silvestres sean infectadas por virus contra los que es resistente la variedad transgénica. Como resultado de este trabajo, ahora sabemos que el virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV), que es uno de los virus que resiste la calabacita transgénica (los otros son CMV, WMV), está presente en las poblaciones silvestres de *C. argyrosperma* ssp. *sororia*. En un escenario imaginario de escape del transgene de resistencia a virus hacia esta calabacita silvestre, la posibilidad de interacción con los virus que inciden naturalmente, se acotaría al ZYMV. Mientras que, la interacción entre los genes de resistencia al WMV y al CMV, parece poco probable, ya que los virus del WMV y CMV no se encontraron en las poblaciones silvestres en los tres años de estudio. En términos de bioseguridad es importante analizar la posibilidad de interacción con el ZYMV ya que, este puede reducir la tasa de crecimiento de las poblaciones silvestres de *C. pepo* (Prendeville et al. 2014). Así, el transgene escapado podría liberar a las poblaciones de *C. argyrosperma* ssp. *sororia* de la restricción impuesta por el ZYMV. El siguiente paso debería ser la evaluación del efecto del ZYMV sobre la tasa de crecimiento poblacional de esta calabacita silvestre en el centro de origen del género Cucurbita.

Por otra parte conocer la epidemiología de estos virus en ambientes naturales es importante, ya que la introducción de nuevos genotipos resistentes a virus puede favorecer la evolución de variantes virales con una tasa de transmisión secundaria mayor, lo que favorece la emergencia de nuevas enfermedades virales (Jeger et al. 2005). Parcelas experimentales con calabazas transgénicas resistentes al virus y no transgénicas sirvieron para demostrar que las primeras pueden alterar la transferencia del ZYMV en cultivares (Klas et al. 2006), aunque la transmisión vertical del ZYMV puede contrarrestar este efecto, al permitir la dispersión del virus ZYMV mediante semillas y polen (Harth et al. 2016). Además, la introducción de

nuevos genotipos agrícolas es uno de los principales factores involucrados en la emergencia de virus de plantas tropicales (Fargette et al. 2006). Futuros análisis de riesgo por el escape del transgene de resistencia a virus hacia poblaciones silvestres de *C. argyrosperma* ssp. *sororia* en el centro de origen de las calabacitas, deberían evaluar la influencia de la secuencia transgénica en la ecología del virus del ZYMV tanto en ambientes agrícolas como en los naturales.

LITERATURA CITADA

- Fargette, D., Konate, G., Fauquet, C., Muller, E., Peterschmitt, M., y Thresh, J. M. 2006. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. Annual. Review of Phytopathology. 44: 235-260.
- Harth, J.E., H.E, Simmons y A.G. Stephenson. 2016. Vertical infection of Zucchini yellow mosaic virus via pollen transmission occurs at a lower frequency than ovule transmission. European Journal of Plant Pathology. doi:10.1007/s10658-016-1024-5.
- Jeger, M. J., Seal, S. E., y Van den Bosch, F. 2005. Evolutionary epidemiology of plant virus disease. Advances in virus research 67: 163-203.
- Klas, F. E., Fuchs, M., y Gonsalves, D. 2006. Comparative spatial spread overtime of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) and Watermelon mosaic virus (WMV) in fields of transgenic squash expressing the coat protein genes of ZYMV and WMV, and in fields of nontransgenic squash. Transgenic research 15: 527-541.
- Prendeville H.R., B. Tenhumberg y D. Pilson. 2014. Effects of virus on plant fecundity and populations dynamics. New Phytologist 1-11.
- Zeng, R., Q. Liao, J. Feng, D. LI, y J. Chen. 2007. Synergy between Cucumber Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus on Cucurbitaceae hosts tested by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39:431–437.