GM 파파야 개발 및 생물안전성 평가 연구 동향

김호방 · 이 이 · 김창기

Research status of the development of genetically modified papaya (*Carica papaya* L.) and its biosafety assessment

Ho Bang Kim · Yi Lee · Chang-Gi Kim

Received: 10 April 2018 / Revised: 21 May 2018 / Accepted: 1 June 2018
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the crops widely planted in tropical and subtropical areas. The papaya fruit has low calories and are plentiful in vitamins A and C and in minerals. A major problem in papaya production is a plant disease caused by the papaya ringspot virus (PRSV). The first PRSV-resistant GM papaya expressing a PRSV coat protein gene was developed by USA scientists in 1992. The first commercial GM papaya cultivars derived from the event was approved by the US government in 1997. Development of transgenic papayas has been focused on vaccine production and limited agricultural traits, including insect and pathogen resistance, long shelf life, and aluminum and herbicide tolerance. Approximately 17 countries, including the USA and China, produced transgenic papayas and/or commercialized them, which provoked studies on biosafety assessment and development of GM-detection technologies. For the biosafety assessment of potential effects on human health, effects of long-term feeding to model animals have been studied in terms of toxicity and allergenicity. Studies on environmental safety assessment include influence on soil-

microbial biodiversity and transfer to soil bacteria of GM selection markers. Many countries, such as Korea, the European Union, and Japan, that have strict regulations for GM crops have serious concerns about unintended introduction of GM cultivars and food commodities using unauthorized GM crops. Transgene- and/or GM event-specific molecular markers and technologies for genomics-based detection of unauthorized GM papaya have been developed and have resulted in the robust detection of GM papayas.

Keywords *Carica papaya*, GM-detection technology, papaya, transformation, transgenic papaya, biosafety assessment

서 론

파파야(*Carica papaya* L.)는 파파야과(Family Caricaceae), 파파야속(Genus *Carica*)에 속하는 다년생의 상록성 초본식물이다. 파파야는 생육이 빠르고 높이가 7~10 m까지 자라며 익었을 때는 생과로써 먹고, 미국과 상태에서는 샐러드나 채소로 이용할 수 있는 작물이다(Morton 1987; Warnert 2004).

열대 아메리카와 멕시코 남부 원산인 파파야는 16세기 초에 스페인 탐험가들에 의해 처음 발견된 후 16세기 중반에 브라질과 인도, 17세기 초에는 중국, 18세기에는 아프리카 대륙에 전파된 것으로 알려지고 있다. 일본에서는 1905년에 하와이에서 우량품종이 도입되면서 재배가 시작되었다(Nakasone and Paull 1988; Garrett 1995; Aradhya et al. 1999; Australian Government 2008). 파파야는 2014년 기준 66개국에서 재배가 이루어지고 있으며 생산량은 2000년 725만톤에서 2007년 953만톤 그리고 2014년 1,267만톤으로 계속 증가하고 있다(FAOSTAT 2018). 우리나라에서도 최근 소비량이 증

H. B. Kim (✉)
(주)바이오메딕 생명과학연구소
(Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 14548, Korea)
e-mail: hobang@ibiomedic.co.kr

Y. Lee
충북대학교 특용식물학과
(Department of Industrial Plant Science and Technology,
Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)

C.-G. Kim
한국생명공학연구원 바이오평가센터
(Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Cheongju 28116, Korea)

가하면서 수입량은 2012년 54톤에서 2016년 116톤으로 급속히 증가하고 있다(Korea Customs Service, 2018). 파파야의 국내재배는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구소에서 2008년에 시작되었으며, 재배면적은 2012년 0.2 ha에서 2014년 2.0 ha, 그리고 2015년 3.4 ha (생산량 63톤)로 계속 증가하고 있다.

특히 파파야는 칼로리가 낮으면서 비타민과 미네랄이 풍부하고 파파인(papain)이라는 단백질 분해효소가 많아 전 세계적으로 의약품, 식품, 의류, 그리고 화장품 산업 등 다양한 분야에서 널리 이용되고 있다(Nakasone and Paull, 1988; Aravind et al. 2013; Hewajulige and Dhekney 2016; Yahaya et al. 2017).

전세계 파파야 산업에서 가장 문제가 되는 것은 papaya ring spot virus (PRSV)이다. 이 바이러스는 진딧물이나 감염된 종자에 의해 전이되며 과실에 둥근 반점이 나타나고 잎에도 영향을 미쳐서 생산량과 품질을 크게 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다(Purcifull et al. 1984; Tomas and Dodaman 1993; Tennant et al. 2007; Retuta et al. 2012). 이 바이러스는 파파야에서 아직까지도 효과적인 방제방법이 없기 때문에 파파야를 재배하는 국가에서는 형질전환기술을 이용한 저항성 품종 개발 등 다양한 연구가 이루어지고 있다 (Gonsalves 1998; Teixeira da Silva et al. 2007; Fermin et al. 2010).

미국은 1992년에 하와이대학과 코넬대학이 공동으로 소과형 ‘Solo’ 품종을 이용한 PRSV 저항성인 ‘SunUp’, ‘Rainbow’, 그리고 ‘Larie Gold’ 품종을 개발하였다. 이 품종들은 1997년 미국과 캐나다 시장 판매 승인을 받아 1998년부터 생산이 이루어졌으며, 오늘날 미국 전체 재배면적의 82%를 차지하고 있다. 중국에서는 2006년 South China Agricultural University에서 PRSV 저항성 품종 Huanong No. 1을 개발하여 2010년 이후부터 광둥 등 3개 지역에서 약 6,000 ha가 재배되고 있다. 또한 필리핀, 오스트레일리아, 말레이시아, 베트남 등에서도 형질전환 파파야의 포장시험이 이루어지고 있어 앞으로 GM (Genetically Modified) 파파야 재배 국가는 더욱 늘어날 것으로 예상되고 있다(Fuchs and Gonsalves 2007; Tecson-Mendoza 2008; Evans and Ballen 2012). 그러나 GM 작물 재배를 허용하고 있는 미국이나 중국과 달리 유럽과 일본, 그리고 우리나라에서는 GM 작물에 대한 재배나 수입을 강력히 규제하고 있다(Evans and Ballen 2012). 그러나 자국의 품종이 없어 수입종자에 의존하는 환경에서는 언제나 GM 종자의 위험에 노출되어 있다. 특히 파파야는 암그루, 수그루, 자웅동주 등 여러 가지 유전자형을 갖는 식물이기 때문에 자가수분이나 타가수분이 쉽게 일어날 수 있다(Teixeira da Silva et al. 2007). 따라서 기존의 GM 품종이 아니라도 GM 품종의 꽃가루에 의한 수분수정 등이 일어나 GM 종자가 만들어질 가능성이 크다고 할 수 있다. 일본의 경우에도 대만에서 1987년 Non-GM 품종으로 육성되어 수입된 ‘Tainung No. 5’가 GM 작물로 확인되어 재배중인 나무와 수입종자가 전량 폐기되

었고(Biosafety Clearing-House 2018a), 2014년에는 대만에서 들여온 ‘Tainung No. 2’의 경우 GM 양성반응을 나타내어 폐기되었으며(Biosafety Clearing-House 2018b), 2016년 6월에서 2017년 9월까지 태국, 대만, 베트남에서 수입된 종자나 묘목에 대한 검역 결과 98개의 시료 가운데 5개가 GM 양성반응을 나타냈다고 보고하였다(Biosafety Clearing-House 2018c). 이상의 결과들을 근거로 볼 때 우리나라의 경우에도 파파야 재배면적이 늘어나면서 파파야 종자의 수입이 계속되고 있기 때문에 GM 파파야의 국내유입 가능성이 매우 크다고 할 수 있다.

따라서 본 논문에서는 형질전환을 통한 GM 파파야 개발 현황, 생물안전성 평가 및 GM 판별 기술과 관련된 연구결과들을 체계적으로 정리함으로써 안전성 평가 기준에 따라 향후 GM 파파야의 국내 유입을 차단하고, 우리 고유의 품종을 개발할 수 있는 기초자료를 제공하고자 하였다.

파파야 조직배양 및 형질전환 체계

파파야에서는 배주 유래 캘러스, 미숙 교잡배 등으로부터 체세포 배 발생을 유도하고 이로부터 식물체를 재분화시키는 조직 배양 체계가 구축되었으며(Litz and Conover 1982; Fitch and Manshardt 1990), 이를 바탕으로 한 형질전환 체계의 확립을 통해 PRSV에 저항성을 갖는 GM 파파야 품종(‘SunUp’, ‘Rainbow’ 등)의 상업화가 가능하게 되었다(Gonsalves 1998). 90년대 초반에 조직배양 체계가 확립됨으로써 다양한 품종과 방법을 통한 파파야 형질전환 및 재분화가 성공적으로 이루어지게 되었다(Tecson-Mendoza et al. 2008). 최초의 안정적인 파파야 형질전환은 미숙 교잡배, 하배축 절편 및 체세포 배를 재료로 텅스텐 입자를 이용한 유전자총(particle bombardment) 방법을 통해 이루어졌으며(Fitch et al. 1990), 효율성이 크게 개선된 방법이 보고되었다(Cai et al. 1999). 유전자총 방법의 경우, 도입 대상 유전자가 완전한 형태의 단일 사본으로 식물 염색체내로 삽입될 수 있는 효율이 매우 낮다. 따라서 단일 사본의 표적 유전자를 식물 염색체내로 효율적으로 도입하기 위하여 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환이 이루어졌다(Zhu et al. 2006). *A. tumefaciens*를 이용한 초기의 파파야 형질전환은 잎 절편으로부터 캘러스 선발까지만 수행되었으며(Pang and Sanford 1988), 최초의 완전한 재분화 형질전환체의 확보는 체세포 배를 이용한 형질전환을 통해 이루어졌다(Fitch et al. 1993). 이후 유전체 해독에 따른 유전자 기능의 대량 검정을 위하여 연마제로 상처를 입힌 체세포배 캘러스를 이용한 *Agrobacterium*-매개 형질전환을 통해 기존의 형질전환 방법에 비해 수율이 10~100배 정도 개선된 고속 대량(high throughput) 형질전환 방법이 확립되었다(Cheng et al. 1996; Zhu et al. 2006).

파파야 형질전환 체계 구축을 비롯하여 다양한 형질을 부여하기 위한 유전자의 발현을 위하여 현재까지는 cauliflower

mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터가 대부분 사용되고 있다 (Tecson-Mendoza et al. 2008). 초기에는 선발마커로 항생제 카나마이신에 저항성을 부여하는 *nptII* (neomycin phosphotransferase II) 유전자, 리포터 유전자로 *uidA* (β -glucuronidase) 유전자가 주로 사용되었다 (Fitch and Manshardt 1990; Mahon et al. 1996). 이 외에도 항생제 하이그로마이신 저항성 유전자(*hph*, hygromycin B phosphotransferase), 제초제 저항성 유전자(*bar*, phosphinothricin acetyl transferase), GFP (green fluorescent protein) 등도 활용되고 있다 (Zhu et al. 2004a; Tecson-Mendoza et al. 2008). Phosphomannose isomerase (PMI)는 mannose-6-phosphate와 fructose-6-phosphate의 가역적 전환을 촉매한다. 이 효소를 암호화하는 *pmi* 유전자를 갖고 있지 않는 식물세포는 mannose 당을 함유하는 인공배지에서 생존할 수 없다. 파파야 캘러스는 PMI 활성이 거의 없어서 탄소원으로 mannose 당을 사용할 수 없으며, 고농도의 mannose 당이 배지에 함유되더라도 체세포 배 발달에 영향을 미치지 않음이 확인되었다 (Souza et al. 2001). Zhu 등(2005)은 *pmi* 유전자를 대사 길항물질 선발마커로 활용한 파파야 형질전환 방법을 확립하였다.

GM 파파야 개발

GM 파파야 개발을 위한 주요 농업형질은 해충 및 병 저항성(곰팡이, 바이러스), 수확 후 저장성 증대, 알루미늄과 제초제 저항성 등을 들 수 있다. 이 외에도 백신을 포함한 동물 단백질 생산을 위한 식물공장으로써 파파야를 활용하기 위한 연구가 이루어지고 있다 (Table 1).

해충 및 곰팡이 병 저항성

잎응애(carline spider mite; *Tetranychus cinnabarinus* Boisd.)와 매미충류(leafhopper; *Empoasca* sp.)는 파파야에 심각한 피해를

를 야기하는 주요 해충에 속한다. 다양한 잡초를 숙주로 삼는 진딧물류(*Aphis* sp.)는 잡초가 마른 후 파파야를 공격하며, 치명적 병원균인 PRSV를 매개할 수 있다 (Tecson-Mendoza et al. 2008). *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* 등은 파파야 유식물에 모잘록병을 유발하고, *Colletotrichum gloeosporioides*은 엽병과 과일에 침투하여 탄저병을 일으킨다. 수확 후 발생하는 병으로는 *Phytophthora* stem-end rot (*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*), *Phomopsis* rot (*Phomopsis caricae-papayae*), 탄저병(*C. gloeosporioides*), black stem-end rot (*Phoma caricae-papayae*, *Lasiodiplodia theobromae*), *Alternaria* rot (*Alternaria alternata*) 등을 들 수 있다.

잎응애의 발생을 억제하기 위하여 담배 박각시나방(*Manduca sexta*) 유래의 chitinase 유전자를 파파야에서 발현시켰다 (McCafferty et al. 2006). 실험실 조건에서 생물 검정을 수행한 결과, chitinase를 발현하는 파파야 형질전환체는 잎응애의 증식을 크게 억제하였으며, 자연 실험 포장 조건에서도 동일한 결과를 보였다. 파이토알렉신 중의 하나인 resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxy-stilbene)은 곰팡이병에 저항성을 부여하는 천연물질 중의 하나로 알려져 있으며, trihydroxystilbene synthase (stilbene synthase, EC 2.3.1.95)에 의해 합성된다 (Delaunoy et al. 2009). 포도로부터 분리된 stilbene synthase 유전자(*VstI*)를 이용하여 곰팡이병에 대한 저항성을 증가시키기 위한 많은 시도가 이루어졌다 (Delaunoy et al. 2009). *In vitro* 상에서 1 mM resveratrol이 *P. palmivora* 균사체의 생장을 억제한 결과를 바탕으로 병원균-유도 프로모터 조절하에 *VstI* 유전자를 파파야에서 발현시킨 결과, 병원균 감염 직후에 *VstI* 전사체의 발현이 증가하며, 형질전환체는 *P. palmivora*에 대한 저항성이 증가함을 보였다 (Zhu et al. 2004b). Defensin은 식물계에 보편적으로 존재하는 저분자량(5 kDa 이하)의 단백질로써 미생물의 세포막을 파괴하거나 미생물 세포질 내 표적 단백질에 결합함으로써 세균과 곰팡이의 생장을 억

Table 1 Major target traits for genetic modification of papaya

Target traits	References
Papaya ringspot virus (PRSV) resistance	Fitch et al. 1993; Cheng et al. 1996; Cai et al. 1999; Chen et al. 2001; Lines et al. 2002; Tennant et al. 2002; Davis and Ying 2004; Jiang et al. 2004; Souza et al. 2005; Kung et al. 2009; Kung et al. 2010; Jia et al. 2017
Papaya leaf-distortion mosaic virus (PLDMV) resistance	Kung et al. 2009; Kung et al. 2010
<i>Phytophthora</i> resistance	Zhu et al. 2004b; Zhu et al. 2007
Insect resistance	McCafferty et al. 2006
Aluminum resistance	de la Fuente et al. 1997
Long shelf life/delayed ripening	Laurena et al. 2002; Magdalita et al. 2002; Magdalita et al. 2003; López-Gómez et al. 2009; Che Radziah et al. 2011; Sekeli et al. 2014; US patent 6495743B1 (2002); US patent 7084321B2 (2006)
Herbicide resistance	Cabrera-Ponce et al. 1995
Vaccine production	Zhang et al. 2003; Hernández et al. 2007; Fragoso et al. 2017

제하는 항미생물제로 작용한다(Menegueti et al. 2017). 파파야는 뿌리, 줄기, 열매 등에 부패성 질병을 야기하는 *P. palmivora*에 높은 감수성을 갖는데, 이를 억제하기 위하여 *Dahlia merckii* 유래의 defensin 유전자(*DmAMP1*)를 파파야에 도입하였다(Zhu et al. 2007). 형질전환체 유래의 단백질 추출물은 *in vitro* 상에서 *Phytophthora*의 생장을 억제하였으며, 잎 절편을 이용한 생물 검정에서도 동일한 결과를 보였다. 온실 조건에서의 감염실험 결과, *P. palmivora*에 대한 병저항성의 증가는 감염 부위에서 균사체의 생장이 억제되는 것과 관련이 있음이 확인되었다. 파파야 열매, 줄기, 잎에는 병원균, 선충, 곤충에 대한 방어기작을 매개하는 것으로 알려져 있으며, cysteine protease의 일종인 papain이 풍부하다(Misas-Villamil et al. 2016). *P. palmivora*는 파파야의 모든 조직을 감염시키는 강력한 병원균인데, papain 활성을 억제하는 cysteine protease inhibitor를 진화시킴으로써 강력한 병원성을 갖게 된 것으로 예측되었다(Gumtow et al. 2018). *P. palmivora*에 대한 전사체 데이터로부터 5개의 분비성 cystatin-like cysteine protease inhibitors (PpalEPICs)가 존재함이 확인되었다. 이들 중에서 PpalEPIC8 유전자가 *P. palmivora* 특이적이며, 파파야 감염시에 발현이 강하게 유도되었다. PpalEPIC8 재조합 단백질은 papain 효소 활성을 강력하게 억제하였다. CRISPR/Cas9-매개 유전자 편집을 사용하여 확보된 PpalEPIC8에 대한 상동접합 돌연변이체는 야생형에 비해 papain에 의한 *in vitro* 생장이 억제되었으며, 파파야 열매에 대한 병원성이 감소하였다(Gumtow et al. 2018). 이러한 결과는 병원성 기작에서 파파야-*P. palmivora* 상호작용에 대한 연구뿐만 아니라, 숙주에서 papain 활성의 조절을 통해 *P. palmivora* 저항성 파파야 개발에 대한 가능성도 아울러 제시하여 준다.

바이러스 병 저항성

PRSV는 경제적으로 가장 중요한 *Potyvirus* 속에 속하며, 자연상태에서는 주로 진딧물에 의해 전파된다. PRSV는 파파야를 감염시키는 유형(PRSV-P)과 파파야 이외의 숙주를 공격하는 유형(PRSV-W)으로 나뉘어진다. PRSV는 1948년에 하와이에서 처음으로 발견되어 하와이 파파야 산업에 매우 심각한 피해를 입힌 이래, 전세계적으로 파파야 생산에 매우 심각한 위협이 되고 있다. 아직까지 PRSV에 대한 유전적 저항성은 파파야 유전자원에서 발견되지 않고 있다. 약독 바이러스를 이용한 시도가 이루어졌으나 균주 특이성, 바이러스의 쉬운 변이 등으로 인해 실용적이지 않음이 제시되었다(Bau et al. 2003; Tecson-Mendoza et al. 2008). 파파야와 파파야과 *Vasconcellea* sp. 간의 속간 교배를 통한 PRSV 저항성 육종 노력이 이루어지고 있으나, 불화합성, 교잡 품종의 불임 문제 등이 파파야 전통 육종에 있어서 주요 걸림돌이 되고 있다(Tecson-Mendoza et al. 2008). 1980년대 중반에 옥수수과 콩을 비롯한 주요 작물에 대한 GM 품종이 개발됨으로써 코

넬대학교와 하와이대학교에서 GM 파파야 개발을 위한 시도가 이루어져 PRSV-저항성인 이벤트 ‘55-1’이 만들어졌다(Fitch et al. 1992).

형질전환 식물체에서의 바이러스 저항성은 Sanford와 Johnston (1985)에 의해 정립된 병원균-유래 저항성(parasite-derived resistance) 개념을 기반으로 하며, Abel 등(1986)이 담배 모자이크 바이러스(TMV)의 coat protein (CP) 유전자를 발현시킴으로써 최초로 바이러스 저항성 담배 형질전환체를 제작하였다. 파파야의 병저항성 도입을 위한 병원균 유래 유전물질로는 CP 유전자와 이와 인접하여 존재하며 바이러스 유전체 복제에 관여하는 replicase (RP or NIb, nuclear inclusion protein b) 유전자가 주로 사용되고 있다(Tecson-Mendoza et al. 2008; Fitch 2010). CAMV 35S 프로모터에 의해 이들 2가지 유전자를 단독 혹은 융합하여 발현시킴으로써 post-transcriptional gene silencing (PTGS) 기반의 PRSV 저항성을 도입하고 있다(Bau et al. 2003; Fitch 2010; Table 1). 하와이의 ‘Sunset’ 품종에 CP 유전자가 도입된 GM 품종인 ‘SunUp’ (R₀ 이벤트명 ‘55-1’)을 Non-GM 소과종인 ‘Kapaho’와 교배하여 나온 품종이 ‘Rainbow’이며, ‘Larie Gold’는 대과종인 ‘Kamiya’와 ‘Rainbow’ F2를 교배하여 만들어진 품종이다. 중국 광저우의 South China Agricultural University에서 개발된 ‘Huanong No. 1’(소과형 ‘Solo’ 품종)은 RP 유전자가 도입된 GM 품종이다(Chen et al. 2001). 하와이에서 분리된 HA 바이러스의 돌연변이 유래 약독 바이러스인 HA 5-1 균주에 대해 저항성을 갖는 최초의 GM 이벤트인 ‘55-1’ 계통이 만들어졌으나(Fitch et al. 1992), 분리 균주간 CP 유전자 서열에서의 빈번한 변이가 보고되었으며(Jain et al. 2004; Fernández-Rodríguez et al. 2008), 이로 인해 하와이 이외의 지역에서 유래한 다양한 균주들에 대해 완전한 저항성을 보여주지 않았다(Chiang et al. 2001; Tennant et al. 2001; Bau et al. 2003; Davis and Ying 2004). PRSV에 대한 광범위 저항성을 유도하기 위하여 다양한 서열 변이를 보여주는 중국 하이난 지역 PRSV 균주들의 CP 유전자 서열간에 보존된 부위를 발굴하고, 이를 바탕으로 RNAi 기술을 이용한 PRSV 저항성 파파야 개발 시도가 이루어졌다(Jia et al. 2017). PRSV-저항성 GM 품종에서 저항성 분자기작을 이해하기 위하여 저항성인 ‘SunUp’과 감수성인 ‘Sunset’ 품종에 대해 PRSV 감염 전의 건강한 어린 잎을 대상으로 전사체 비교 분석을 수행하였다(Fang et al. 2016). 전사체 비교 분석 결과, 스트레스와 병저항성 연관 유전자(MYB, WRKY, ERF, NAC 등) 및 스트레스 호르몬(앱시스산, 살리실산, 에틸렌) 신호 전달 관련 유전자들이 저항성인 ‘SunUp’ 품종에서 강하게 발현되었다.

상기 언급한 바와 같이, CP나 RP 유전자와 같은 바이러스 유래 유전물질의 발현을 통한 RNA-매개 PRSV-저항성 유도 외에 다양한 방법이 개발되고 있다. PRSV에 대한 광범위 저항성을 확보하기 어려운 이유들 중의 하나가 바이러스 유래의 silencing 억제 단백질(suppressor protein)의 존재이다.

Mangrauthia 등(2010)은 *in vitro* 실험을 통해 PRSV의 silencing 억제 단백질(PRSV-HcPro, helper component proteinase)이 microRNA (miRNA)에의 결합을 통해 RNA silencing의 억제자로 작용할 수 있음을 보여주었다. 또한 PRSV-HcPro의 *in planta* 발현을 통해 miRNA 기반 조절 경로의 억제자로 작용하여 식물의 발달에 영향을 미칠 뿐만 아니라, PRSV와 이중 바이러스의 감염도 촉진함을 보여주었다. Kung 등(2015)은 재조합된 바이러스 RNA 유전체를 이용한 감염 실험과 일시 발현 실험 등을 통해 고병원성 유래 HcPro가 엽기서열 비의존적으로 PTGS를 강력하게 억제함으로써 CP 유전자 도입에 의한 PRSV-저항성을 파괴할 수 있음을 제시하였다. 이 결과를 바탕으로 고병원성 PRSV 유래 HcPro의 3'-비해독부위를 발현하는 파파야 형질전환체를 제작한 결과, 해당 고병원성 PRSV 뿐만 아니라, 지리적으로 다양한 곳에서 분리한 균주들에 대해서도 완전한 저항성을 가짐을 제시하였다. 바이러스 저항성을 유도하기 위하여 형질전환을 통한 방법 이외에 이중가닥 RNA (dsRNA)나 hairpinRNA (hpRNA)를 외부에서 식물체로 직접 주입하는 방법이 사용되고 있다(Tenllado and Díaz-Ruiz 2001; Robinson et al. 2014). Shen 등(2014a)은 PRSV CP 유전자의 보존된 3'-비해독 부위에 대해 인트론 함유 hairpin dsRNA (ihpRNA) construct (ihpRNA-CP279)를 제작하고 이를 RNase III-결핍 대장균 균주에서 발현시켰다. 이로 부터 추출한 ihpRNA-CP279와 PRSV를 동시에 접종한 결과, 접종 후 2개월까지 PRSV에 대한 저항성이 유지되었다.

대만을 비롯한 동아시아에서는 PRSV 외에도 또 다른 potyvirus인 PLDMV (papaya leaf-distortion mosaic virus)에 의해 파파야 산업이 심각한 위협을 받고 있다(Bau et al. 2008). Kung 등(2009)은 PLMDV P-TW-WF 균주의 CP 암호화 영역의 부분 절편과 대만에서 분리된 PRSV YK 균주의 완전한 3'-비해독 부위를 포함하는 CP 암호화 영역의 부분 절편을 동시에 함유하는 비해독 키메라 DNA를 발현하는 형질전환체를 제작하였다. 파파야 형질전환 계통들은 PRSV와 PLMDV에 대한 저항성을 보였으며, 일부 계통은 하와이, 태국, 멕시코에서 유래한 이중의 PRSV 균주들에 대해 강한 저항성을 가졌다. 또한 Kung 등(2010) PRSV와 PLMDV coat protein (CP) 유전자 절편에 대한 키메라 재조합 발현 벡터를 제작하여 자웅동주 품종들에 대한 형질전환체를 개발하였는데, 자웅동주 형질은 육종기간 단축에 있어서 중요한 형질 중의 하나이다.

Geminivirus의 일종인 papaya leaf curl virus (PLCV)는 geminivirus와 PRSV가 파파야 생산을 저해하는 인도 북부 지방에서 발생하는 중요 식물병의 하나이다. CP와 RP 유전자를 융합한 construct를 발현시켜 PLCV 저항성 파파야를 개발하기 위한 노력이 인도 연구자들에 의해 이루어지고 있다(Fitch 2010).

수확 후 저장성 증대 관련

병원균 감염 외에도 파파야 산업에서 매우 중요한 문제 중의 하나가 저장과 수송 과정 등에서 과숙에 의한 수확 후 손실인데, 생산량의 30~40%에 이를 수도 있다고 보고되었다(Tecson-Mendoza et al. 2008). 파파야는 25~28도의 상온에서는 4~5일, 10~12도의 저온에서는 3주까지의 짧은 유통기한(shelf life)을 갖는다. 파파야와 같은 전환성 과일(climacteric fruit)에서 숙기 초기 단계에서 급격한 호흡의 증가는 자가촉매에 의한 에틸렌 생성과 동반된다. 따라서 토마토를 비롯한 다양한 전환성 과일 작물에서 ACC synthase (ACS)나 ACC oxidase (ACO)와 같은 에틸렌 생합성 유전자들의 조절을 통한 숙기 조절 연구가 이루어졌다. Tecson-Mendoza 등(2008)은 파파야 열매에서 분리한 2개의 ACS 유전자(*acs1*, *acs2*) 중 *acs2* 유전자의 antisense 발현을 통해 비형질전환체 대비 숙기가 지연되며, 완숙 상태에서도 과실의 경도가 유지되는 파파야 형질전환체를 얻었다. 또한 영양성분에 대한 생화학적 분석 결과, 형질전환체는 비타민 C 등을 비롯한 주요 영양성분에서 비형질전환체와 실질적 동등성을 보였다. *acs2* 유전자 발현 조절에 의해 숙기가 지연된 GM 파파야 이벳트들에 대해서는 호주 Queensland 지역과 필리핀 Laguna 지역에서 포장 시험도 수행되었다. ACO 유전자의 cosuppression이나 antisense 발현에 의해 에틸렌 생성과 호흡을 억제함으로써 파파야 숙기를 조절하기 위한 시도도 이루어졌다(López-Gómez et al. 2009; Che Radziah et al. 2011). Sekeli 등(2014)은 RNA 간섭(RNA interference) 기술을 이용하여 *aco1* 혹은 *aco2* 유전자 발현을 억제함으로써 대조구(벡터 도입 형질전환체 또는 비형질전환체)에 비해 수확 후 유통기한을 최장 20일까지 연장 가능하며, 과일의 당도도 대조구와 차이가 없음을 보고하였다. 이 외에도 세포벽 분해와 관련된 pectin methylesterase, β -galactosidase, polygalacturonase, xylanase의 발현 조절을 통해 과일 물러짐을 방지하기 위한 연구가 이루어졌다(US patent 6495743B2; US patent 7084321B2).

알루미늄과 제초제 저항성

전 세계 경작지의 40%가 산성토양에 속하며, 산성 토양에 존재하는 Al^{3+} 는 많은 작물에 독성 효과를 갖는다. 식물에 의해 분비되는 유기산은 알루미늄 저항성과 밀접하게 연관되어 있으며, 전통 육종을 통한 유기산 다량 생성 계통의 선발이나 GM 기술을 이용함으로써 작물에 미치는 알루미늄 독성 문제를 해결할 수 있다. *Pseudomonas aureginosa* 유래의 citrate synthase (*cs*) 유전자를 과다발현하는 파파야 형질전환체는 대조구에 비해 시트르산을 2~3배 더 많이 분비하였으며, 300 μ M의 알루미늄 농도에서도 뿌리가 자라나며 정상적인 생육을 보였다(de la Fuente et al. 1997). Cabrera-Ponce 등(1995)

은 유전자총을 이용한 효율적인 파파야 형질전환 방법을 구축하는 과정에서 phosphinothricin 저항성 *bar* 유전자를 도입함으로써 제초제 저항성 파파야를 개발하였다. 형질전환 파파야는 실제 사용 농도보다 3~4배 높은 농도에서도 제초제 phosphinothricin에 대해 저항성을 보였다.

백신 생산

항체를 비롯한 다양한 동물성 재조합 단백질을 식물세포에서 안정적으로 발현시켜 상업적으로 활용하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 일부 단백질의 경우(예, 고서병 치료제) 판매 승인을 확보하였다. 동물성 재조합 단백질을 생산하기 위한 식물공장으로써 형질전환 파파야를 이용하기 위한 시도들이 이루어졌다. 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)의 분비 단백질 중의 하나인 ESAT-6를 파파야에서 발현시키기 위한 연구가 시도되었다(Zhang et al. 2003). 촌충(*Taenia solium*)에 의해 유발되는 낭충증(cysticercosis)은 가축(돼지, 소 등)뿐만 아니라 사람에도 영향을 미치는 질병이다. Hernández 등(2007)은 돼지 낭충증에 대한 백신을 생산하기 위하여 촌충류(*T. crassiceps*)에서 확인된 3가지 합성 펩티드를 파파야에서 발현시켰다. 형질전환 식물체와 캘러스의 수용성 추출물을 이용하여 생쥐 암컷에 피하 주사한 결과, 항체가 *T. crassiceps*에 조직들에서 확인이 되었으며, 백신 투여된 생쥐의 90%가 낭충증을 보이지 않았다. Fragoso 등(2017)은 기존에 확보된 3가지 낭충증 펩티드를 발현하는 캘러스 계통들을 활용하여 캘러스 상태에서의 안정적이며 장기적인 백신 발현 플랫폼을 구축하였다. 또한 쥐와 돼지를 재료로 투여되는 백신의 양, 다양한 백신 운반체와의 배합 조건 등의 탐색으로부터 구강 투여를 통한 최적 백신 접종 시스템을 확보하였다.

GM 파파야 안전성 평가

2016년 기준 세계 GM 종자 시장 규모는 158억 달러에 이르고 있으며, 28 개국에서 1.85억 ha에 GM 작물이 재배되고 있다. GM 파파야의 경우, 상업적인 재배 승인을 확보한 PRSV-저항성 품종이 미국 하와이(약 1,000 ha; 'SunUp', 'Rainbow' 품종 등)와 중국(약 8,550 ha; 'Huanong No. 1' 품종)에서 재배되고 있다(James, 2016). 소비자들이 GM 식품에 대해 가장 우려하는 부분은 GM 작물 개발에 사용된 유전자에서 기인하는 잠재적 독성 혹은 알레르기 유발 문제이다. 따라서 많은 국가들은 GM 작물을 식품에 사용하는 문제에 있어서 법적 인 규제를 갖고 있으며[일본-Standards for the Safety Assessment of GM Foods (Seed Plants), 2004; 한국-Good Review Practice for Safety of Genetically Modified Food, 2011], GM 식품의 안전성 평가는 각 국가별 평가기준에 따라 의무적으로 수행되고 있다. GM 식품의 안전성 평가에 대한 법적 기준을 가지고 있는

나라에서는 비인간 GM 식품이 유통되지 못하도록 하고 있으나, 일부 국가에서 다양한 식품에서 비인간 GM 검출이 보고된 바 있다(Nakamura et al. 2016). 파파야의 경우, 일본에서 PRSV 저항성을 갖는 비인간 GM이 다양한 가공품에서 검출된 바 있다(Nakamura et al. 2011; Nakamura et al. 2013; Nakamura et al. 2014). GM 파파야 안전성 평가와 관련해서 인체 위해성과 환경 위해성에 관하여 제한된 분석이 수행되었다. 인체 위해성에 관해서는 주로 동물 모델을 이용한 분석이 이루어졌고, 환경 위해성에 대해서는 토양 미생물 군집에 미치는 영향에 관한 분석이 주로 이루어졌다.

PRSV CP 유전자를 갖는 GM 파파야에 장기간, 반복적으로 노출되었을 때 장관 조직과 생화학적 변수들에 미치는 영향을 파악하기 위하여 Powell 등(2010)은 3개월 동안 쥐를 대상으로 식이섭취 실험을 수행하였다. 위와 장 조직의 전체 및 현미경적 수준, 장내 세균 수, 전반적인 장내 효소 활성 등에 있어서 GM 섭취군과 Non-GM 섭취군 간에 유의미한 차이가 없었다. 두 그룹간에 미세 용모의 Ca^{2+} 및 Na^{+}/K^{+} ATPase 효소 활성은 유의미한 차이를 보였으나, 장 점막의 형태 변화는 관찰되지 않았다. 저자들은 결론적으로 GM 파파야의 장기적인 섭취가 생물학적으로 중요하면서도 의도되지 않은 효과를 유발하지는 않았다고 보고하였다. GM 식이가 면역 반응에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Chen 등(2011)은 대만에서 개발된 PRSV/PLDMV 동시 저항성 파파야와 Non-GM 대조구를 ovalbumin (OVA)-sensitised mouse 모델에 5주간 경구 투여하였다. 두 식이 그룹간에 체형, 내장 기관의 형태와 무게, 전체 IgE 항체 수준, OVA-특이 IgE와 IgG1 항체 농도 또는 OVA-유도 interferon- γ , interleukin 분비 등에 있어서 유의미한 차이를 보이지 않았으나, IgM 항체 농도가 GM 식이 그룹에서 현저히 증가하였다. 상업 재배가 승인된 PRSV CP 유전자 도입 'Rainbow'와 'SunUp' 품종은 하와이, 미국 본토, 캐나다에서 소비되고 있다. Fermin 등(2011)은 도입된 CP 단백질의 알레르기항원성 여부를 조사하였다. PRSV-저항성을 위해 도입된 CP 단백질은 기존에 알려진 알레르기항원에 존재하는 8개의 연속된 아미노산 서열을 갖고 있지 않으며, 기존 알레르기항원과도 35% 미만의 서열 상동성을 갖는다고 보고하였다. 단백질 안정성 비교 결과에서도 비알레르기항원과 동일한 수준으로 위액과 장액 조건에서 분해되었다. 이 외에도 알레르기항원성에 대한 안정성 기준에 따라 다양한 비교 분석을 통해 최종적으로 도입 유전자 유래 PRSV CP에 의한 식품 알레르기 위험은 없는 것으로 평가되었다. Lin 등(2013)은 대만에서 새로 개발된 PRSV-저항성 GM 계통들에 대해 쥐를 대상으로 비교 독성 분석을 수행하였다. PRSV CP의 단백질 안정성을 분석한 결과, Fermin 등(2011)의 연구 결과와 유사하게 CP 단백질은 위액에서 빠르게 가수분해되어 위 내용물과 소화기 장기들에서 검출되지 않았다. 유전 독성을 분석한 결과, Non-GM과 GM에서 모두 음성 결과를 나타내었다. 28일간 반복적인 식이 섭취를 수행한 결과,

Non-GM과 GM 식이 그룹 간에 생물학적으로 독성학적으로 차이가 없었다. 이상의 결과는 식품 안전성 측면에 있어서 GM 파파야가 전통적인 일반 파파야와 실질적으로 동등함을 제시하여준다. Roberts 등(2014)은 Non-GM과 GM 파파야에 대해 식품 자체의 측면에서 과일의 물리화학 및 생화학적 특성(경도, 산도, pH, 과육색, 크기 등)에 대한 비교 분석을 수행하였으며, 형질전환이 파파야 열매의 물리화학적 특성을 변화시키지 않음을 보여주었다. Lin 등(2015)은 Lin 등(2013)의 실험에서 사용한 것과 동일한 GM 계통을 사용하여 유럽 식품 안전 기준[Regulation (EC) No 1829/2003, 2003]에 따라 쥐를 대상으로 90일간의 GM 식이에 따른 식품 안전성 분석을 수행하였다. 그 결과, GM 파파야는 식품 안정성 측면에서 non-GM과 실질적 동등성이 있음을 보고하였다.

GM 파파야의 환경 위해성에 대한 연구는 2006년에 처음으로 이루어졌다. Hsieh와 Pan (2006)은 GM과 Non-GM 재배지 토양 시료를 채취하여 PRSV-저항성 GM 파파야가 토양 미생물에 미치는 영향을 분석하였다. AFLP를 비롯하여 다양한 분자생물학적인 분석을 수행한 결과, 두 개 토양 시료의 미생물 군집은 80% 이상 유사함을 보여 GM 파파야 재배는 토양 미생물에 매우 제한적인 영향을 미침을 확인하였다. Iwaki와 Arakawa (2006)는 GM 식물 유래의 항생제 저항성 유전자(*npII*)가 토양 미생물로 전이 되는지를 확인하는 실험을 수행하였다. 이를 위하여 *npII* 유전자가 불활성화된 플라스미드를 갖는 *Acinetobacter* sp. BD413 균주를 GM 파파야에서 추출한 DNA로 형질전환하였다. 실험 결과, 실제 자연 환경에서 발생하기에는 매우 낮은 빈도이나, 파파야 genomic DNA 60,000 ~ 90,000 분자당(10 ~ 30 µg DNA) 한 개의 카나마이신 저항성 콜로니가 형성되었다. Lo 등(2007)은 GM 파파야 재배 토양에서 도입 유전자의 잔존율을 분석하였다. 유전자의 크기나 염기 조성에 따라 분해 속도는 다르게 나타나며, 초기의 급격한 분해 후 서서히 분해되고, 토양 미생물에 의한 효소적 분해와 토양에 의한 흡착이 잔존율에 영향을 미친다고 보고하였다. 한편, Iwaki와 Arakawa (2006)의 보고와는 달리 2종의 *Acinetobacter* sp. 균주를 토양에서 추출한 DNA로 처리한 결과 형질전환이 일어나지 않았다(Lo et al. 2007). Sheu 등(2008)은 다양한 토양 조건에서 추출한 DNA에 대한 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 수행하여 GM 파파야 식재 토양의 미생물 다양성을 조사하였다. 식재 초기에는 박테리아 다양성에 다소 차이가 났으나 식재 6개월 후에는 차이가 감소하였다고 보고하였다.

GM 파파야 검출 및 전망

적육, 암그루 품종인 ‘Sunset’을 재료로 최초의 GM 이벤트인 R₀ ‘55-1’ 계통이 만들어졌다. 이 계통을 비형질전환 ‘Sunset’과 교배하여 R₁ 계통이 확보되었고, 이를 자가수분시켜 얻은 상동접합 R₄ 계통이 확립됨으로써 최초의 PRSV-저항성 GM

품종인 ‘SunUp’이 만들어졌다. ‘SunUp’ 품종과 비형질전환 ‘Kapoho’ 품종과의 교배로부터 F₁ 품종인 ‘Rainbow’가 만들어졌다. ‘SunUp’과 ‘Rainbow’에 대해 PRSV-저항성 확인을 위한 포장 실험이 1992 ~ 1995년에 하와이에서 수행되었고, 1997년 미국 정부에 의해 GM 파파야의 상업화에 대한 승인이 이루어졌다. 이후, 중국을 비롯하여 호주, 방글라데시, 브라질, 캐나다, 인도, 인도네시아, 자메이카, 일본, 말레이시아, 멕시코, 필리핀, 대만, 태국, 베네수엘라, 베트남 등에서 CP와 RP 유전자의 해독 및 비해독 부위를 이용한 형질전환체가 개발되고 포장 실험이 이루어졌다. 2006년에 중국 정부는 South China Agricultural University에서 개발한 PRSV-저항성 GM 품종(‘Huanong No. 1’)의 상업화를 승인하였다(Tecson-Mendoza et al. 2008; Fitch 2010). 이상과 같이, 다양한 국가에서 다양한 지역 품종들에 대한 형질전환체의 제작 및 포장 실험이 수행되고 있다. 우리나라의 경우, 국내 재배 및 육종을 위해 상업 품종과 유전자원 등을 전량 해외로부터 도입을 해야 한다. 따라서 상업적 재배 승인을 받지 않은 GM 파파야의 도입이 언제든지 발생할 수 있는 상황이므로, 도입 품종/자원의 GM 모니터링 및 식품 안전성 평가를 위한 효율적 판별 기법이 확립되어야 한다.

GM 판별 및 정량을 위한 다양한 기법들이 개발되어 활용되고 있는데, 주로 DNA나 단백질을 검출하는 방법이 광범위하게 사용되고 있으며, 그 예로는 일반 PCR, real-time PCR, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), LAMP (loop-mediated isothermal amplification), microarray, MIPC (microdroplet PCR implemented capillary gel electrophoresis)를 들 수 있다(Wei et al. 2016). Wakui 등(2004)은 ‘55-1’ 이벤트 유래의 GM 파파야를 검출하기 위하여 종자로부터 배(embryo)를 채취한 후 조직화학적 방법을 통해 도입된 β-glucuronidase (GUS) 유전자를 검출하였다. PCR 방법(일반 또는 real-time)을 통한 GM 검출 과정에서 파파야 특이 endogenous reference gene으로 chymopapain (CHY)이 선발되었다(Guo et al. 2009a; Wei et al. 2013). ‘SunUP’과 ‘Huanong No. 1’을 비롯하여 다양한 GM 파파야 개발 과정에서 사용된 프로모터, 터미네이터, 선발 마커 및 도입 유전자 특이 분자표지와 T-DNA 삽입 위치 파악을 통한 이벤트 특이 분자표지가 개발되었으며, 이들 분자표지를 활용하여 다양한 식물 조직 또는 환경 시료로부터 GM 여부 또는 GM 유래 유전 물질 검출을 위한 일반 PCR, real-time PCR, LAMP 및 reverse transcription-LAMP 방법이 확립되었다(Lo et al. 2007; Fan et al. 2009; Guo et al. 2009b; Nakamura et al. 2011; Nageswara-Rao et al. 2013; Nakamura et al. 2014; Nakamura et al. 2016; Wei et al. 2016). Xu 등(2012)은 일반 multiplex PCR 시스템에서 종종 발생하는 낮은 감도, 프라이머별 증폭 차이 등의 문제를 해결하기 위하여 universal primer-multiplex-PCR (UP-M-PCR)과 sequencing gel electrophoresis를 융합한 방법을 확립하였다. Kim 등(2010)과 Nakamura 등(2013)은 PCR 방법(일반 및 real-time)을 통해 시중 유통되는 파파야

가공품(통조림, 피클, 건과, 잎차, 잼, 푸레, 주스, 냉동 후식 등)에 이벤트 '55-1'이 사용되었음을 보고하였다. Shen 등 (2014b, 2014c)은 현장에서 PLDMV와 PRSV의 신속하고 정확한 진단을 위하여 one-step RT-PCR에 비해 10배 이상 감도가 높은 reverse transcription-LAMP 방법을 구축하였다. Next generation sequencing (NGS) 기법의 발달에 따라 전사체 (RNA-seq 또는 public ESTs) 또는 유전체 분석을 통해 변형의 실체가 불분명한 생물체가 GMO (genetically modified organism) 인지의 여부를 파악하기 위한 시도가 이루어지고 있다. Tengs 등(2009)은 애기장대 형질전환체에 대한 전사체 분석을 수행한 후, 애기장대 유전체 정보와의 *in silico* 차감 (subtraction)을 수행하였다. 애기장대 유전체에 mapping 되지 않는 sequence tags에 대해 NCBI nr database에 대한 검색을 수행한 결과, 상당수가 형질전환체 제작에 사용된 pBI121 벡터와 높은 서열 유사도를 보였다. 동일한 접근 방식을 'SunUp' 파파야 EST sequence 컬렉션에 적용하여 PRSV *cp*, *uidA*, *nos terminator*와 일치하는 cDNA 서열을 찾아내었다. 2008년에 GM 파파야인 'SunUP'에 대한 초안 수준의 유전체 정보가 해독되었다(Ming et al. 2008). Nakamura 등(2016)은 GM 판별 과정에서 양성 반응을 보인 미지의 GM 파파야 신선과를 재료로 유전체 기반 re-sequencing을 수행하고, 해당 재료의 유전체 정보를 상세 분석하였다. 분석된 유전체 정보를 기반으로 GM 제작에 사용된 construct 서열, T-DNA 삽입 위치를 파악함으로써 도입 유전자 및 이벤트 특이 서열 정보를 확보하였으며, 그 결과를 real-time PCR을 통해 입증하였다.

1992년 최초의 GM 파파야 이벤트가 만들어지고, 1997년부터 과수 작물로는 처음으로 PRSV-저항성 GM 품종의 상업적 재배가 이루어지기 시작했다. 현재까지 GM 파파야 개발의 주요 방향은 파파야 생산에 있어서의 2가지 주요 문제 (PRSV 저항성, 수확 후 저장성 증대) 해결에 초점이 맞추어져 왔다. 건강한 노년의 삶이 핵심 화두로 자리잡은 현 시점에서 향후 GM 파파야 품종 개발은 기능성과 영양 성분 강화, 고부가가치 의료용 단백질 생산 등이 핵심 주제가 될 것으로 전망된다(Abu Bakar et al. 2005; Frago et al. 2017). 최근 식물 유전자 기능 연구 및 농업 형질 개선 등에 유전체 교정(genome editing) 기술이 핵심 기술로 활용되고 있으나(Gaj et al. 2013; Woo et al. 2015), 아직까지 GM 파파야 품종 개발에 활용된 사례는 전무하다. 파파야는 유전체 교정을 위한 핵심 기술인 조직 배양 및 고효율 형질전환 체계가 잘 갖추어져 있고(Cheng et al. 1996), 파파야 유전체 정보도 확보되었으므로(Ming et al. 2008), 유전체 교정 기술은 파파야 표적 육종에 있어서 핵심 기술이 될 것으로 전망된다. 또한 유전체 교정 기반의 표적 육종이 활발히 이루어질 것으로 전망되는 것과 더불어 유전체학(genomics) 기반의 GM 판별 기술도 더욱 정교하게 발전할 것으로 전망된다.

적 요

파파야는 열대와 아열대 지역에서 광범위하게 재배되고 있는 주요 작물 중의 하나이다. 파파야 열매는 칼로리가 낮고 비타민 A와 C, 미네랄이 풍부하며, 미숙과에는 단백질 분해 효소인 파파인이 풍부하여 의약품, 화장품, 식품 가공 산업 등에 널리 활용되고 있다. 전세계 파파야 산업에서 가장 중요한 제한 요인 중의 하나가 potyvirus에 속하는 papaya ringspot virus (PRSV)에 의해 야기되는 식물병이다. 1992년에 미국 연구자들에 의해 PRSV의 coat protein (cp) 유전자를 발현하는 최초의 PRSV-저항성 GM 파파야 이벤트(R_0 '55-1')가 만들어졌으며, 1997년에는 이로부터 유래한 GM 품종('SunUp', 'Rainbow')에 대해 미국 정부가 상업적 재배를 승인하였다. 현재까지 GM 파파야 개발은 해충 저항성, 병 저항성(곰팡이, 바이러스), 수확 후 저장성 증대, 알루미늄과 제초제 저항성 등의 형질에 초점을 맞추어 왔다. 아울러 파파야를 동물 단백질(백신 등) 생산을 위한 식물공장으로 활용하기 위한 시도도 이루어졌다. 현재, 미국과 중국을 비롯한 약 17개 국가에서 GM 파파야 개발과 포장 실험 또는 상업적 재배가 이루어지고 있다. GM 파파야의 개발과 더불어 생물안전성 평가 및 GM 판별 기술 개발에 관한 연구도 이루어지고 있다. 생물안전성 평가와 관련하여 주로 인체 위해성과 환경 위해성에 관한 분석이 수행되고 있다. 인체 위해성의 경우, 동물 모델을 대상으로 장기간 식이섭취를 통해 일반 및 유전 독성, 알레르기항원성, 면역 반응, GM 유래 단백질의 안정성에 관한 연구가 수행되었다. 환경 위해성의 경우, GM 재배가 토양 미생물 다양성에 미치는 영향, GM 유래 유전물질의 토양 잔류 및 토양 미생물의 전이 여부에 관한 연구가 이루어졌다. 우리나라, 유럽 및 일본을 비롯한 많은 나라에서는 상업적 재배를 위한 GM 품종 도입이나, 파파야 가공 식품 제조에 비승인 GM 파파야의 사용을 규제하고 있다. 도입 유전자 특이적 또는 이벤트 특이적인 분자표지를 개발하고, PCR (일반, real-time) 또는 loop-mediated isothermal amplification 방법을 통해 GM 여부를 판별하고 있다. 파파야에 대한 초안 수준의 유전체 정보가 2008년에 해독되었으며, 최근에는 차세대 유전체 분석 기술로 확보된 유전체와 전사체 정보를 활용하여 GM 여부를 판별하는 기술도 확립되었다.

References

- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffman N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743
- Abu Bakar UK, Pillai V, Hashim H, Daud HM (2005) Sharing Malaysian experience with the development of biotechnology-derived food crops. *Food Nutr Bull* 26:432-435

- Aradhya Mk, Manshardt RM, Wee F, Morden CW (1999) A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genet Resour Crop Evol* 46:579–586
- Aravind G, Bhowmik D, Duraivel S, Harish G (2013) Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*. *J Medi Plants Studi* 1:7–15
- Australian Government (2008) The Biology of *Carica papaya* L. (papaya, papaw, paw paw). [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/papaya-4/\\$FILE/biology-papaya08.rtf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/papaya-4/$FILE/biology-papaya08.rtf)
- Bau HJ, Cheng YH, Yu TA, Yang JS, Yeh SD (2003) Broad-spectrum resistance to different geographic strains of papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathol* 93:112–120
- Bau HJ, Kung YJ, Raja JA, Chan SJ, Chen KC, Chen YK, Wu HW, Yeh SD (2008) Potential threat of a new pathotype of Papaya leaf distortion mosaic virus infecting transgenic papaya resistant to Papaya ringspot virus. *Phytopathol* 98:848–856
- Biosafety Clearing-House (2018a) GM papaya in Japan (Decision Document).pdf. <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=103897>
- Biosafety Clearing-House (2018b) 201400904 JPN report on GM papaya.pdf. <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=103897>
- Biosafety Clearing-House (2018c) 171018 BHC GM papaya.pdf. <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=103897>
- Cabrera-Ponce JL, Vegas-Garcia A, Herrera-Estrella L (1995) Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Rep* 15:1–7
- Cai W, Gonsalves C, Tennant P, Fermin G, Souza M, Sarindu N, Jan F, Zhu H, Gonsalves D (1999) A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35:61–69
- Che Radziah CMZ, Nurul Shahnadz AH, Naziratul Ain AN, Zainal Z (2011) Genetic transformation of antisense ACC oxidase in *Carica papaya* L. cv. Sekaki via particle bombardment. *Malays Appl Biol* 40:39–45
- Chen G, Ye CM, Huang JC, Yu M, Li BJ (2001) Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of the PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. *Plant Cell Rep* 20:272–277
- Chen YN, Hwang WZ, Fang TJ, Cheng YH, Lin JY (2011) The impact of transgenic papaya (TPY10-4) fruit supplementation on immune responses in ovalbumin-sensitised mice. *J Sci Food Agric* 91:539–546
- Cheng YH, Yang JS, Yeh SD (1996) Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. *Plant Cell Rep* 16:127–132
- Chiang CH, Wang JJ, Jan FJ, Yeh SD, Gonsalves D (2001) Comparative reactions of recombinant papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. *J Gen Virol* 82:2827–2836
- Davis MJ, Ying Z (2004) Development of papaya breeding lines with transgenic resistance to *Papaya ringspot virus*. *Plant Dis* 88:352–358
- Delaunoy B, Cordelier S, Conreux A, Clément C, Jeandet P (2009) Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol J* 7:2–12
- de la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566–1568
- Evans EA, Ballen FH (2012) An overview of global papaya production, trade, and consumption. EDIS#FE913. UF/IFAS Extension, Gainesville, FL.
- Fan MJ, Chen S, Kung YJ, Cheng YH, Bau HJ, Su TT, Yeh SD (2009) Transgene-specific and event-specific molecular markers for characterization of transgenic papaya lines resistant to Papaya ringspot virus. *Transgenic Res* 18:971–986
- Fang J, Lin A, Qiu W, Cai H, Umar M, Chen R, Ming R (2016) Transcriptome profiling revealed stress-induced and disease resistance genes up-regulated in PRSV resistant transgenic papaya. *Front Plant Sci* 7:855
- FAOSTAT (2018) <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Fermin GA, Castro LT, Tennant PF (2010) CP-transgenic and non-transgenic approaches for the control of papaya ringspot: current situation and challenges *Transgenic Plant J* 4:1–15
- Fermín G, Keith RC, Suzuki JY, Ferreira SA, Gaskill DA, Pitz KY, Manshardt RM, Gonsalves D, Tripathi S (2011) Allergenicity assessment of the papaya ringspot virus coat protein expressed in transgenic rainbow papaya. *J Agric Food Chem* 59:10006–10012
- Fernández-Rodríguez T, Rubio L, Carballo O, Marys E (2008) Genetic variation of papaya ringspot virus in Venezuela. *Arch Virol* 153:343–349
- Fitch MM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC (1990) Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* 9:189–194
- Fitch MM, Manshardt R (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Rep* 9:320–324
- Fitch MMM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC (1992) Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology* 10:1466–1472
- Fitch MM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL (1993) Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 12:245–249
- Fitch MMM (2010) *Papaya Ringspot Virus* (PRSV) coat protein gene virus resistance in papaya: Update on progress worldwide. *Transgenic Plant J* 4:16–28
- Fragoso G, Hernández M, Cervantes-Torres J, Ramírez-Aquino R, Chapula H, Villalobos N et al (2017) Transgenic papaya: a useful platform for oral vaccines. *Planta* 245:1037–1048
- Fuchs M, Gonsalves D (2007) Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu Rev Phytopathol* 45:173–202

- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31:397–405
- Garrett A (1995) The Pollination biology of papaw (*Carica papaya* L.) in central Queensland. PhD thesis, Central Queensland University, Tockhampton
- Gonsalves D (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annu Rev Phytopathol* 36:415–437
- Gumtow R, Wu D, Uchida J, Tian M (2018) A *Phytophthora palmivora* extracellular cystatin-like protease inhibitor targets papain to contribute to virulence on papaya. *Mol Plant Microbe Interact* 31:363–373
- Guo J, Yang L, Liu X, Zhang H, Qian B, Zhang D (2009a) Applicability of the chymopapain gene used as endogenous reference gene for transgenic huanong no. 1 papaya detection. *J Agric Food Chem* 57:6502–6509
- Guo J, Yang L, Liu X, Guan X, Jiang L, Zhang D (2009b) Characterization of the exogenous insert and development of event-specific PCR detection methods for genetically modified Huanong No. 1 papaya. *J Agric Food Chem* 57:7205–7212
- Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García A, Rosas G, León-Ramírez C, Juárez P, Sánchez-García G, Cervantes J, Acero G, Toledo A, Cruz C, Bojalil R, Herrera-Estrella L, Sciotto E (2007) A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 25:4252–4260
- Hewajulige I, Dhekney SA (2016) Papayas, *Encyclopedia of Food and Health* Chapter 517.4. Elsevier Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 209–212
- Hsieh YT, Pan TM (2006) Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity. *J Agric Food Chem* 54:130–137
- Iwaki M, Arakawa Y (2006) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 with DNA from commercially available genetically modified potato and papaya. *Lett Appl Microbiol* 43:215–221
- Jain RK, Sharma J, Sivakumar AS, Sharma PK, Byadgi AS, Verma AK, Varma A (2004) Variability in the coat protein gene of Papaya ringspot virus isolates from multiple locations in India. *Arch Virol* 149:2435–2442
- James C (2016). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Briefs No. 52. ISAAA: Ithaca, NY, USA
- Jia R, Zhao H, Huang J, Kong H, Zhang Y, Guo J, Huang Q, Guo Y, Wei Q, Zuo J, Zhu YJ, Peng M, Guo A (2017) Use of RNAi technology to develop a PRSV-resistant transgenic papaya. *Sci Rep* 7:12636
- Jiang L, Maoka T, Komori S, Fukamachi H, Kato H, Ogawa K (2004) An efficient method for sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of coat protein (CP) coding genes into papaya (*Carica papaya* L.). *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 37:189–198
- Kleter GA, Peijnenburg AA (2002) Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE - binding linear epitopes of allergens. *BMC Struct Biol* 2:8
- Kim SA, Lee M, Yoo SJ, Kim JH, Lee H, Park KS, Jeong J, Kim HY (2010) Detection of GM papaya event 55-1 in fresh and processed papaya using duplex PCR. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 53:237–242
- Korea Customs Service (KCS) (2018) Trade statistics for export/import. <http://unipass.-customs.go.kr.38030/>
- Kung YJ, Bau HJ, Wu YL, Huang CH, Chen TM, Yeh SD (2009) Generation of transgenic papaya with double resistance to Papaya ringspot virus and Papaya leaf-distortion mosaic virus. *Phytopathol* 99:1312–1320
- Kung YJ, Yu TA, Huang CH, Wang HC, Wang SL, Yeh SD (2010) Generation of hermaphrodite transgenic papaya lines with virus resistance via transformation of somatic embryos derived from adventitious roots of *in vitro* shoots. *Transgenic Res* 19:621–635
- Kung YJ, You BJ, Raja JA, Chen KC, Huang CH, Bau HJ, Yang CF, Huang CH, Chang CP, Yeh SD (2015) Nucleotide sequence-homology-independent breakdown of transgenic resistance by more virulent virus strains and a potential solution. *Sci Rep* 5:9804
- Laurena AC, Magdalita PM, Hidalgo MSP, Villegas VN, Mendoza EMT and Botella JR (2002) Cloning and molecular characterization of ripening-related ACC synthase from papaya fruit (*Carica papaya* L.). *Acta Hort* 575:163–169
- Lin HT, Yen GC, Huang TT, Chan LF, Cheng YH, Wu JH, Yeh SD, Wang SY, Liao JW (2013) Toxicity assessment of transgenic papaya ringspot virus of 823-2210 line papaya fruits. *J Agric Food Chem* 61:1585–1596
- Lin HT, Yen GC, Lee WC, Tsai YT, Wu JH, Yeh SD, Cheng YH, Chang SC, Liao JW (2015) Repeated dose 90-day feeding study of whole fruits of genetically modified papaya resistant to Papaya ringspot virus in rats. *J Agric Food Chem* 63:1286–1292
- Lines RE, Persely D, Dale JL, Drew R, Bateson MF (2002) Genetically engineered immunity to Papaya ringspot virus in Australian papaya cultivars. *Mol Breed* 10:119–129
- Litz RE, Conover RA (1982) *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. *Plant Sci Lett* 26:153–158
- Lo CC, Chen SC, Yang JZ (2007) Use of real-time polymerase chain reaction (PCR) and transformation assay to monitor the persistence and bioavailability of transgenic genes released from genetically modified papaya expressing nptII and PRSV genes in the soil. *J Agric Food Chem* 55:7534–7440
- López-Gómez R, Cabrera-Ponce JL, Saucedo-Arias LJ, Carreto-Montoya L, Villanueva-Arce R, Díaz-Perez JC, Gómez-Lim MA, Herrera-Estrella L (2009) Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression. *Transgenic Res* 18:89–97
- Magdalita PM, Laurena AC, Yabut-Perez BM, Tecson-Mendoza EM and Botella JR (2002) Progress in the development of transgenic papaya: transformation of Solo papaya using ACC synthase antisense construct. *Acta Hort* 575:171–176.
- Magdalita PM, Laurena AC, Yabut-Perez BM, Zaportez MM, Tecson-Mendoza EM, Villegas VN, Botella JR (2003) Towards transformation, regeneration and screening of papaya containing

- antisense ACC synthase gene. In: Plant Biotechnology 2002 and Beyond, Vasil IK (ed), Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 323–327
- Mangrauthia SK, Singh P, Praveen S (2010) Genomics of helper component proteinase reveals effective strategy for papaya ringspot virus resistance. *Mol Biotechnol* 44:22–29
- Mahon RE, Bateson MF, Chamberlain DA, Higgins CM, Drew RA, Dal JL (1996) Transformation of an Australian variety of *Carica papaya* using microprojectile bombardment. *Funct Plant Biol* 23:679–685
- McCafferty HR, Moore PH, Zhu YJ (2006) Improved *Carica papaya* tolerance to carmine spider mite by the expression of *Manduca sexta* chitinase transgene. *Transgenic Res* 15:337–347
- Meneguetti BT, Machado LD, Oshiro KGN, Nogueira ML, Carvalho CME, Franco OL (2017) Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools-A review and outlook. *Front Microbiol* 7:2136
- Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH et al (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452:991–996
- Misas-Villamil JC, van der Hoorn RAL, Doehlemann G (2016) Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytol* 212:902–907
- Morton JF (1987) Papaya *Carica papaya* L. In: Fruits of Warm Climates. Creative Resources Inc., Winterville, N.C. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/papaya_ars.html, pp 336–346
- Nageswara-Rao M, Kwit C, Agarwal S, Patton MT, Skeen JA, Yuan JS, Manshardt RM, Stewart CN Jr (2013) Sensitivity of a real-time PCR method for the detection of transgenes in a mixture of transgenic and non-transgenic seeds of papaya (*Carica papaya* L.). *BMC Biotechnol* 13:69
- Nakamura K, Akiyama H, Ohmori K, Takahashi Y, Takabatake R, Kitta K, Nakazawa H, Kondo K, Teshima R (2011) Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus YK strain. *Biol Pharm Bull* 34:1648–1651
- Nakamura K, Akiyama H, Takahashi Y, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Kasahara M, Kitta K, Nakazawa H, Kondo K, Teshima R (2013) Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chem* 136:895–901
- Nakamura K, Kondo K, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Takabatake R, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Nishimaki-Mogami T (2014) Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biol Pharm Bull* 37:1–5
- Nakamura K, Kondo K, Akiyama H, Ishigaki T, Noguchi A, Katsumata H, Takasaki K, Futo S, Sakata K, Fukuda N, Mano J, Kitta K, Tanaka H, Akashi R, Nishimaki-Mogami T (2016) Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya for development of a specific detection method. *Food Chem* 205:272–279
- Nakasone HY, Paull RE (1998) Tropical Fruits. CAB International, Wallingford
- Pang SZ, Sanford JC (1988) *Agrobacterium*-mediated gene transfer in papaya. *J Amer Soc Horti Sci* 113:287–291
- Powell M, Wheatley AO, Omoruyi F, Asemota HN, Williams NP, Tennant PF (2010) Comparative effects of dietary administered transgenic and conventional papaya on selected intestinal parameters in rat models. *Transgenic Res* 19:511–518
- Purcifull D, Edwardson J, Hiebert E, Gonsalves D (1984) Papaya ringspot virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 292, CAB International, Wallingford, UK
- Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed (2013)
- Retuta AMO, Magdalita PM, Aspuria ET, Espino RRC (2012) Evaluation of selected transgenic papaya (*Carica papaya* L.) lines for inheritance of resistance to papaya ringspot virus and horticultural traits. *Plant Biotechnol* 29:339–349
- Roberts M, Minott DA, Pinnock S, Tennant PF, Jackson JC (2014) Physicochemical and biochemical characterization of transgenic papaya modified for protection against Papaya ringspot virus. *J Sci Food Agric* 94:1034–1038
- Robinson KE, Worrall EA, Mitter N (2014) Double stranded RNA expression and its topical application for non-transgenic resistance to plant viruses. *J Plant Biochem Biotechnol* 23: 231–237
- Sanford JC, Johnston SA (1985) The concept of parasite-derived resistance. Deriving resistance genes from the parasites own genome. *J Theor Biol* 113:395–405
- Sekeli R, Abdullah JO, Namasivayam P, Muda P, Abu Bakar UK, Yeong WC, Pillai V (2014) RNA interference of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO1 and ACO2) genes expression prolongs the shelf life of Eksotika (*Carica papaya* L.) papaya fruit. *Molecules* 19:8350–8362
- Shen W, Yang G, Chen Y, Yan P, Tuo D, Li X, Zhou P (2014a) Resistance of non-transgenic papaya plants to papaya ringspot virus (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. *Acta Virol* 58:261–266
- Shen W, Tuo D, Yan P, Li X, Zhou P (2014b) Detection of Papaya leaf distortion mosaic virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 195:174–179
- Shen W, Tuo D, Yan P, Yang Y, Li X, Zhou P (2014c) Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Papaya ringspot virus. *J Virol Methods* 204:93–100
- Sheu C, Wu CY, Chen SC, Lo CC (2008) Extraction of DNA from soil for analysis of bacterial diversity in transgenic and nontransgenic papaya sites. *J Agric Food Chem* 56:11969–11975
- Souza Jr MT, Venturoli MF, Coelho MCF, Rech-Filho EL (2001) Analysis of marker gene/selective agent of transgenic papaya (*Carica papaya* L.) somatic embryos. *Braz J Plant Physiol* 13:366–373
- Souza Jr MT, Nickel O, Gonsalves D (2005) Development of virus resistant transgenic papayas expressing the coat protein gene from a Brazilian isolate of papaya ringspot virus. *Fitopatol Bras* 30:357–365

- Standards for the Safety Assessment of GM Foods (Seed Plants) (2004), the Food Safety Commission of Japan (January 29, 2004)
- Tecson-Mendoza EM, C Laurena A, Botella JR (2008) Recent advances in the development of transgenic papaya technology. *Biotechnol Annu Rev* 14:423–462
- Teixeira da Silva JA, Rashid Z, Nhut DT, Sivakumar D, Gera A, Souza Jr MT, Tennant PF (2007) Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree Forestry Sci Biotech* 1:47–73
- Tenllado F, Díaz-Ruiz JR (2001) Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J Virol* 75:12288–12297
- Tengs T, Zhang H, Holst-Jensen A, Bohlin J, Butenko MA, Kristoffersen AB, Sorteberg HG, Berdal KG (2009) Characterization of unknown genetic modifications using high throughput sequencing and computational subtraction. *BMC Biotechnol* 9:87
- Tennant PF, Fermin G, Fitch MM, Manshardt RM, Slightom JL, Gonslaves D (2001) Papaya ringspot virus resistance of transgenic ‘Rainbow’ and ‘SunUp’ is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *Eur J Plant Pathol* 107:645–653
- Tennant PF, Ahmad MH, Gonsalves F (2002) Transformation of *Carica papaya* L. with virus coat protein genes for studies on resistance to *Papaya ringspot virus* from Jamaica. *Trop Agric* 79:1005–113
- Tennant PF, Fermin GA, Roye RE (2007) Viruses infecting papaya (*Carica papaya* L.): etiology, pathogenesis, and molecular biology. *Plant Viruses* 1:178–188
- Tomas JE, Dodman RL (1993) The first record of papaya ringspot virus-type P from Australia. *Australas Plant Pathol* 22:1–7
- Wakui C, Akiyama H, Watanabe T, Fitch MM, Uchikawa S, Ki M, Takahashi K, Chiba R, Fujii A, Hino A, Maitani T (2004) A histochemical method using a substrate of beta-glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 45:19–24
- Warnert JE (2004) Conventionally bred papaya still possible, even in California. *Califor Agricul* 58:74
- Wei J, Li F, Guo J, Li X, Xu J, Wu G, Zhang D, Yang L (2013) Collaborative ring trial of the papaya endogenous reference gene and its polymerase chain reaction assays for genetically modified organism analysis. *J Agric Food Chem* 61:11363–11370
- Wei J, Le H, Pan A, Xu J, Li F, Li X, Quan S, Guo J, Yang L (2016) Collaborative trial for the validation of event-specific PCR detection methods of genetically modified papaya Huanong No. 1. *Food Chem* 194:20–25
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33:1162–1164
- Xu W, Zhai Z, Huang K, Zhang N, Yuan Y, Shang Y, Luo Y (2012) A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis. *PLoS ONE* 7:e22900
- Yahaya A, Ali M, Idris A (2017) Antibacterial activity and phytochemical screening of *Carica papaya* on some enteric bacterial isolates of public health importance. *Greener J Bilologi Sci* 7:1–7
- Zhang GL, Zhou Z, Guo AP, Shen WT and Li XY (2003) An initial study of transgenic *Carica papaya* used as a kind of vaccine for anti-tuberculosis. *Acta Botanica Yunnanica* 2:223–229
- Zhu YJ, Agbayani R, Moore PH (2004a) Green fluorescent protein as a visual selection marker for papaya (*Carica papaya* L.) transformation. *Plant Cell Rep* 22:660–667
- Zhu YJ, Agbayani R, Jackson MC, Tang CS, Moore PH (2004b) Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta* 220:241–250
- Zhu YJ, Agbayani R, McCafferty H, Albert HH, Moore PH (2005) Effective selection of transgenic papaya plants with the PMI/Man selection system. *Plant Cell Rep* 24:426–432
- Zhu YJ, Fitch MM, Moore PH (2006) Papaya (*Carica papaya* L.). *Methods Mol Biol* 344:209–217
- Zhu YJ, Agbayani R, Moore PH (2007) Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. *Planta* 226:87–97