

EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL DEL FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) GENÉTICAMENTE MODIFICADO CON EL GEN DEFENSINA (*pdf1.2*) DE *Arabidopsis thaliana* PARA RESISTENCIA A HONGOS FITOPATÓGENOS I

ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) GENETICALLY MODIFIED WITH THE *Arabidopsis thaliana* DEFENSIN GENE (*pdf1.2*) FOR RESISTANCE TO FUNGAL PATHOGENS I

Elsa Espinosa-Huerta¹, Emma Zavaleta-Mejía¹, Reyna I. Rojas-Martínez¹, Carlos De León-García de Alba¹,
María A. Gutiérrez-Espinosa², José L. Pons-Hernández³, María A. Mora-Avilés^{3*}

¹Fitosanidad, ²Fruticultura. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ³Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende S/N. 38110. Celaya, Guanajuato, México (mora_alejandra@yahoo.com).

RESUMEN

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados en México indica el requerimiento de una Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) como parte de los requisitos que debe contener una solicitud de permiso de liberación al ambiente en Etapa Experimental de organismos Genéticamente Modificados (GM). El modelo biotecnológico de frijol modificado genéticamente con el gen defensina (*pdf1.2*) de *Arabidopsis thaliana* posee tolerancia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos, por lo cual la ERA se enfocó en los posibles riesgos que esta característica pudiera ocasionar en su liberación al ambiente. La ERA se realizó en dos partes, y este primer documento se enfocó en la definición del problema o identificación del peligro, basada en las características del frijol-*pdf1.2*, así como de su ambiente receptor. La identificación del peligro se enmarcó en las metas políticas de protección para México, establecidas como *protección del medio ambiente, a la diversidad biológica y a la sanidad vegetal, animal y acuícola*; y de estas se derivaron las metas operativas de protección asociadas a proteger los organismos no-blanco, evitar la capacidad competitiva o como maleza del frijol-*pdf1.2*, limitar el desarrollo de resistencia de microorganismos patógenos e impedir el flujo de genes a parientes silvestres y cultivos convencionales en el agroecosistema experimental. Los puntos finales de evaluación definidos como aquellas variables cuantitativas susceptibles de algún efecto adverso se identificaron como el efecto sobre la diversidad de microorganismos no-blanco, la capacidad competitiva del cultivo, y el desarrollo de resistencia

ABSTRACT

The Genetically Modified Organisms Biosafety Law in Mexico indicates the requirement of an Environmental Risk Evaluation (ERE) as part of the requisites that should be in an application for the environmental release of Genetically Modified Organisms (GMOs) in Experimental Stage. The biotechnology model of genetically modified common bean with the defensin gene (*pdf1.2*) of *Arabidopsis thaliana* has wide-spectrum tolerance against phytopathogenic fungi, therefore the ERE focused on the possible risks this characteristic could pose to their environmental release. The ERE was carried out in two parts, and this first document focused on the definition of the problem or identifying the hazard based on the characteristics of the common bean-*pdf1.2*, as well as its receiving environment. The identification of the hazards was framed in the political protection goals for Mexico, established as *protection of the environment, of the biological diversity, and plant, animal and aquaculture health*; and from these, the operative protection goals derived, related to protecting the non-target organisms, avoiding competitive capacity or as weed-behaviors of the common bean-*pdf1.2* plant, limiting the development of the resistance of pathogenic microorganisms and avoiding the gene flow to wild relatives and conventional crops in the experimental agroecosystem. The final evaluation points, defined as the quantitative variables susceptible to some adverse effect were identified as the effect on the diversity of non-target microorganisms, the competitive capacity of the crop, and the development of resistance of target organisms. Finally, risk hypotheses were set forth to identify the risks that the release of the common bean-*pdf1.2* could cause in the final evaluation points. These risk hypotheses will be analyzed in terms of characterization and its estimation, as well as ERE biosecurity measures in a second document.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2018. Aprobado: enero, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 941-956. 2019.

de organismos blanco. Al final, se plantearon las hipótesis de riesgo para identificar aquellos posibles que la liberación del frijol-*pdf1.2* pudiera causar en los puntos finales de evaluación. Estas hipótesis de riesgo se analizarán en términos de caracterización y su estimación, así como medidas de bioseguridad de la ERA en un segundo documento.

Palabras clave: bioseguridad, modelos biotecnológicos, metas de protección, frijol-*pdf1.2*, puntos finales de evaluación, hipótesis de riesgo.

INTRODUCCIÓN

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio de la Diversidad Biológica define como organismo vivo modificado (OVM) a: “cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna” (CDB, 2000). En 1993, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), convocó a especialistas para el análisis de las consideraciones sobre bioseguridad en el uso y liberación de OVM. Las recomendaciones propuestas por este grupo fueron la realización de la Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) con base en conocimiento científico, caso por caso y en forma progresiva o paso por paso.

El marco regulatorio mexicano en materia de organismos genéticamente modificados (OGM) inicia con la NOM-056-FITO-1995, la cual establece los Requisitos Fitosanitarios para la Movilización Nacional, Importación y Establecimiento de Pruebas de Campo de Organismos Manipulados Mediante la Aplicación de Ingeniería Genética, para dar lugar a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM, 2005) y su Reglamento (RLBOGM, 2009). La LBOGM establece los requisitos para la solicitud del permiso de liberación al ambiente en Etapa Experimental, e incluye un estudio de los posibles riesgos que la liberación que un OGM en particular pudiera generar sobre el ambiente y la diversidad biológica (LBOGM, 2005. Sección I Art 42 y 60).

Hay diferentes metodologías para evaluar el riesgo ambiental de un OGM. En México se publicó a consulta pública el Proyecto de Norma Oficial Mexicana asociada a la metodología de la ERA de OGM: “por la que se establecen los requisitos y características que

Key words: biosafety, biotechnology models, protection goals, common bean-*pdf1.2*, final evaluation points, risk hypothesis.

INTRODUCTION

The Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity defines a living modified organism (LMO) as “any organism that possesses a novel combination of genetic material obtained through the application of modern biotechnology” (CDB, 2000). In 1993, The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), summoned specialists for the analysis of the considerations on biosafety in the use and release of LMOs. The recommendations proposed by this group were to carry out the Environmental Risk Evaluation (ERE) based on scientific knowledge, case by case and progressively or step by step.

The Mexican regulatory framework in terms of Genetically Modified Organisms (GMOs) begins with NOM-056-FITO-1995, which establishes the Phytosanitary Requirements for the National Mobilization, Import and Establishment of Field Tests of Organisms Manipulated with the Application of Genetic Engineering, to give way to the Genetically Modified Organisms Biosafety Law (GMOBL) (LBOGM, 2005) and its Regulation (RLBOGM, 2009). The GMOBL establishes the requirements for the permit application for the release into the environment in the Experimental Stage, and includes a study of the possible risks that a particular GMO could produce on the environment and biological diversity (LBOGM, 2005. Section I Art 42 and 60).

There are different methods to evaluate the environmental risk of a GMO. In Mexico, a public consultation was published for the Official Regulation Project related to the methodology of the ERE of GMOs: “which establishes the requirements and characteristics that must be included in the studies of possible risks that the experimental release of genetically modified plant species and plant health inputs may cause to plant, animal and aquaculture health, as well as to the environment and biological diversity” (PROY-NOM-000- SAGARPA/ SEMARNAT-2015, 2017). This methodology, along with the ERE methodologies proposed and used in Chile (Caballero *et al.*, 2014), Brazil (Paes de

deberán contener los estudios de los posibles riesgos que la liberación experimental de especies vegetales e insumos fitosanitarios genéticamente modificados pudieran ocasionar a la sanidad animal, vegetal y acuícola, así como al medio ambiente y a la diversidad biológica” (PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017). Esta metodología, aunada a las metodologías de ERA propuestas y utilizadas en Chile (Caballero *et al.*, 2014), Brasil (Paes de Andrade y Parrott, 2012), y el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI) (García-Alonso *et al.*, 2014), emplean herramientas afines e internacionalmente aceptadas para determinar la conveniencia de la liberación al ambiente de OGM en un polígono o espacio definido.

Las biotecnologías nacionales basadas en ADN recombinante cobran cada vez más presencia en la investigación por las instituciones públicas y los centros de investigación. Un ejemplo es la generación de frijol modificado genéticamente con el gen defensina (*pdf1.2*) de *Arabidopsis thaliana* el cual confiere protección de amplio espectro contra hongos fitopatógenos (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue implementar una ERA que combine las metodologías de Chile, Brasil, México y el ILSI para evaluar, a través de evidencias técnicas y científicas, la pertinencia de la liberación al ambiente del modelo biotecnológico de frijol-*pdf1.2* de *Arabidopsis thaliana*, el cual posee resistencia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos. La intención central de la liberación al ambiente de este modelo tecnológico es recabar evidencia de su equivalencia agronómica y efectividad biológica en condiciones agrícolas.

En este primer documento, de dos que comprenden la ERA del frijol-*pdf1.2*, se presentan las características centrales del modelo biotecnológico, así como las metas políticas de protección, las metas operativas de protección, los puntos finales de evaluación y las hipótesis de riesgo. En un segundo documento se detallarán la caracterización del riesgo, la estimación del riesgo, así como las medidas de bioseguridad sugeridas.

Metodología

Material Vegetal: Modelo Biotecnológico

El modelo biotecnológico es el frijol modificado con el gen defensina (*pdf1.2*) de *A. thaliana* con re-

Andrade and Parrott, 2012), and the International Life Science Institute (ILSI) (García-Alonso *et al.*, 2014), utilizes related and internationally accepted tools to determine the convenience of the release of GMOs into the environment in a polygon or defined space.

The national recombinant DNA-based biotechnologies are acquiring more and more presence in research by public institutions and research centers. One example is the generation of the common bean genetically modified using the defensin gene (*pdf1.2*) of *Arabidopsis thaliana*, which provides protection against a wide spectrum of phytopathogenic fungi (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

Due to the above, the aim of this study was to implement an ERE that combines the methodologies from Chile, Brazil, Mexico and the ILSI to evaluate, using technical and scientific evidence, the appropriateness of releasing into the environment the biotechnological model of common bean-*pdf1.2* of *A. thaliana*, which is resistant to a wide spectrum of phytopathogenic fungi. The main intention behind the environmental release of this technological model into the environment is to gather evidence of its agronomic equivalence and biological effectiveness under agricultural conditions.

This first document, out of two that comprise the ERE of the common bean-*pdf1.2*, presents the main characteristics of the biotechnological model, as well as the political protection goals, the operative protection goals, the final evaluation points, and the risk hypotheses. A second document will go into detail on the risk characterization, risk estimation, and the suggested biosafety measures.

Methodology

Plant Material: Biotechnological Model

The biotechnology model is the common bean, modified with the *A. thaliana* defensin gene (*pdf1.2*) with resistance to a wide spectrum of phytopathogenic fungi. The genetic modification was carried out using *Agrobacterium tumefaciens* via direct organogenesis in common bean hypocotyls (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). The action of the defensin protein PDF1.2 consists of the union of the protein with the anionic membrane of the fungi via an electrostatic attraction, and it penetrates the

sistencia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos. La modificación genética se realizó mediante *Agrobacterium tumefaciens* vía organogénesis directa en hipocotilos de frijol común (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). El modo de acción de la proteína defensiva PDF1.2 consiste de la unión de la proteína a la membrana aniónica de los hongos mediante una atracción electrostática y penetra la membrana generando una permeabilización (por formación de poros) y con ello cambios de potencial de membrana, alcalinización del medio y lisis celular la cual induce el flujo de Ca²⁺ y eflujo de K⁺ cuando se adhieren a las hifas de hongos y con ello una desestabilidad y la muerte celular del patógeno (De Oliveira and Moreira, 2009; Marqués *et al.*, 2009; Aerts *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008).

El gen *pdf1.2* se expresa constitutivamente bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV-35S) en las plantas de frijol modificadas, y evidencia su eficacia biológica al mostrar resistencia a hongos fitopatógenos incluyendo *Colletotrichum lindemuthianum* (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium lateritium* y *Verticillium* sp. (Mora-Avilés datos no publicados) en condiciones confinadas. La proteína defensiva que confiere resistencia de amplio espectro contra hongos patógenos que se expresa al insertar el gen *pdf1.2* al genoma del frijol, se evaluará en términos del riesgo potencial que pudiera causar en un escenario de liberación al ambiente.

Etapas 1. Formulación del problema

La formulación del problema permite esbozar y analizar el posible riesgo de cualquier acción o producto en un ambiente dado, así como recopilar y generar la información asociada con las características del organismo genéticamente modificado y el entorno receptor (Raybould, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Wolt *et al.*, 2010; Gray, 2012; Tepfer *et al.*, 2013).

El marco de la formulación del problema aborda de manera clara los siguientes pasos: 1) las metas políticas de protección; 2) la contextualización del OGM en el área de liberación; 3) las metas operativas de protección y; 4) los puntos finales de evaluación y las hipótesis de riesgo que derivan de ellos.

Metas Políticas de Protección (MPP). Estas metas se definen en las regulaciones nacionales como parte

de la membrana produciendo permeabilización (due to the formation of pores), and with this, changes in the membrane potential, alkalization of the medium, and cell lysis, which induces the influx of Ca²⁺ and the efflux of K⁺ when they adhere to the fungal hyphae, and with this, an instability and the cellular death of the pathogen (De Oliveira and Moreira, 2009; Marqués *et al.*, 2009; Aerts *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008).

The gene *pdf1.2* is expressed constitutively under control of the promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV-35S) in the modified common bean plants, and it shows its biological efficacy by displaying resistance to pathogenic fungi, including *Colletotrichum lindemuthianum* (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium lateritium* and *Verticillium* sp. (Mora-Avilés, data not published) under confined conditions. The defensin protein, which confers resistance to a wide spectrum of pathogenic fungi that is expressed when inserting the gene *pdf1.2* into the common bean genome, will be evaluated in terms of the potential risk it could cause in a scenario of its release into the environment.

Stage 1. Problem formulation

The problem formulation helps outline and analyze the possible risk of any action or product in a given environment, as well as to gather and produce the information related to the characteristics of the genetically modified organism and the receiving surroundings (Raybould, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Wolt *et al.*, 2010; Gray, 2012; Tepfer *et al.*, 2013).

The framework of the problem formulation clearly presents the following steps: 1) the political protection goals; 2) the contextualization of the GMO in the release area; 3) the operative protection goals, and 4) the final evaluation points and the risk hypotheses derived from them.

Political Protection Goals (PPG). These goals are defined in the national regulations as part of each country's environmental policies by normative concepts and can be interpreted broadly. The first step in the problem formulation is applying the PPGs to the new characteristics of the genetically modified organism, which may cause adverse effects on the elements which must be protected under Mexican law.

de la política ambiental de cada país mediante conceptos normativos y pueden interpretarse en un sentido amplio. Como primer paso de la formulación del problema, las MPP deberán aplicarse sobre las características nuevas del organismo genéticamente modificado, que pudiesen causar efectos adversos, sobre los elementos que se deben proteger según la ley mexicana.

Contextualización del cultivo de GM en el área de liberación. La ERA se realiza de forma comparativa, se parte de la familiaridad con el cultivo convencional (CC) y que éste se considere seguro (OCDE, 1993). La comparación se realiza para determinar las diferencias entre el cultivo genéticamente modificado y el CC que podrían conducir a un daño ambiental no aceptable (García-Alonso, 2010). La contextualización de la información del cultivo genéticamente modificado incluye la información sobre la biología del organismo (el cultivo receptor), los elementos genéticos usados en la modificación, la caracterización del ambiente receptor donde se realizará la liberación (organismo-no blanco y diversidad genética), información sobre la planta genéticamente modificada y un historial de uso seguro dentro o fuera del país (Figura 1).

Metas Operativas de Protección (MOP). Las MOP son los elementos bióticos y abióticos que requieren protegerse durante la liberación al ambiente del organismo genéticamente modificado. Estas referencias apoyan a la identificación de posibles riesgos derivados de la liberación al ambiente y la interacción del organismo con elementos que se interrelacionan (García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

Puntos Finales de Evaluación (PFE) e hipótesis de riesgo. Los PFE abordan objetivos específicos de protección de cada una de las MOP establecidas (si es funcional en su dinámica ecológica o ambiental), si es medible (en tiempo y espacio), si los cambios son ecológicamente relevantes (por encima de las variaciones naturales). Estas determinaciones deberán dar origen a hipótesis de riesgo (HR) las cuales se valorarán a través de una ruta al daño que permitirá evaluar toda la secuencia de eventos que deberán cumplirse para que este daño ocurra, así como su probabilidad (Figura 1).

Contextualization of the GM crop in the release area. The ERE is carried out in a comparative manner. It begins with the familiarity with the conventional crop (CC) and that it is considered safe (OECD, 1993). The comparison is made to determine the differences between the genetically modified crop and the CC which could lead to unacceptable environmental damage (García-Alonso, 2010). The contextualization of the information of the genetically modified crop includes information on the biology of the organism (the receiving crop), the genetic elements used in the modification, the characterization of the receiving environment in which the release will take place (non-target organism and genetic diversity), information on the genetically modified plant and a record of safe use inside or outside the country (Figure 1).

Operative Protection Goals (OPG). The OPGs are the biotic and abiotic elements that require protection during the release of the genetically modified organism into the environment. These references support the identification of possible risks derived from the release into the environment and the interaction of the organism with elements with which they interrelate (García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

Final Evaluation Points (FEP) and risk hypothesis. The FEPs concern specific protection goals for each one of the OPGs established (if it is functional in its ecological or environmental dynamic), if it is measurable (in space and time), if the changes are environmentally relevant (over the natural variations). These determinations should give rise to risk hypotheses (HR) that will be valued using a path to damage that will help evaluate the entire sequence of events that will have to be fulfilled in order for the damage to take place, as well as its probability (Figure 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Stage 1. Problem formulation

Political protection goals (PPG)

The PPGs, according to the Mexican regulatory framework, are defined in Article 60 of the OGMBL

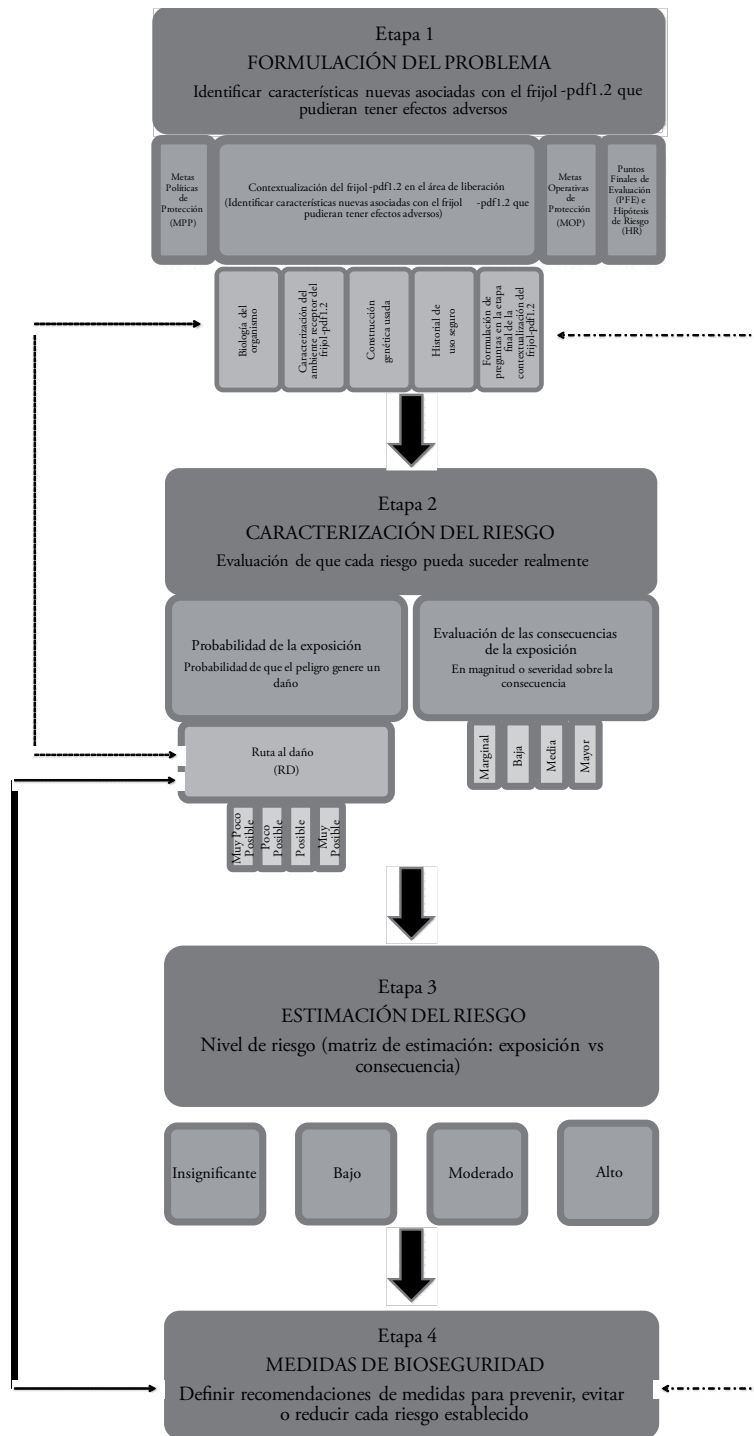


Figura 1. Esquema metodológico de la Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) (adaptado de Paes de Andrade y Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017; García-Alonso *et al.*, 2014).

Figure 1. Methodology scheme of the Environmental Risk Evaluation (ERE) (adapted from Paes de Andrade y Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017; García-Alonso *et al.*, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Formulación del problema

Metas políticas de protección (MPP)

Las MPP de acuerdo con el marco regulatorio mexicano se definen en el Artículo 60 de la LBOGM (2005), el cual establece que los elementos a proteger son: el medio ambiente, la diversidad biológica, así como la sanidad animal, vegetal y acuícola.

Contextualización del organismo genéticamente modificado en el área de liberación

Biología del organismo. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa anual, diploide y predominantemente autógama (Bennett y Leitch, 1997) con una tasa de cruzamiento abierta de 0.2 a 1.4% (Pereira y Cavariani, 1984; Brunner y Beaver, 1989). El frijol obedece a un tipo de reproducción cleistogámica y consiste en formas cultivadas y silvestres.

El análisis del flujo génico de *P. vulgaris* entre diferentes cultivares ha mostrado que la tasa máxima de entrecruzamiento es de 0.136% a una distancia de 0.5 m mientras que la tasa natural de hibridación es cercana a cero más allá de 3.25 m (Ferreira *et al.*, 2007). Estudios en poblaciones de frijol silvestre *vs.* frijol comercial de dos localidades en Costa Rica indican que el porcentaje de cruza varió entre 0.007 y 0.028%, mientras que en Quircot fue entre 0 y 0.199% (Chaves-Barrantes *et al.*, 2009). La participación efectiva de abejas y otros insectos en la polinización en campos comerciales de frijol se considera mínima.

El entrecruzamiento interespecífico se puede producir en el cultivo de frijol común y generar híbridos; sin embargo, la semilla puede abortarse, producir híbridos estériles o bien, el desarrollo fenológico puede afectarse y no llegar a la etapa reproductiva (Smartt, 1979). La introgresión por este tipo de entrecruzamiento consigue cambiar la respuesta de su desarrollo fenológico, sobre todo porque en *Phaseolus* spp. la duración de las etapas fenológicas está determinada por el hábito de crecimiento (Tipo I, II, III y IV), el clima (temperatura, fotoperiodo), el suelo (fertilidad, condiciones físicas) y el genotipo (Tapia-Barquero y Camacho-Henriquez, 1988).

(2005), which establishes that the elements to be protected are the environment, biological diversity, as well as plant, animal and aquaculture health.

Contextualization of the genetically modified organism in the release area

Biology of the organism. The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an annual legume, diploid and predominantly autogamous (Bennett and Leitch, 1997) with a rate of open breeding between 0.2 and 1.4% (Pereira and Cavariani, 1984; Brunner and Beaver, 1989). The common bean reproduces cleistogamically and it consists of wild and breeding forms.

The analysis of the genetic flow of *P. vulgaris* among different cultivars has shown that the highest rate of cross-breeding is 0.136% at a distance of 0.5 m, while the natural rate of hybridization is close to zero beyond 3.25 m (Ferreira *et al.*, 2007). Studies on wild bean populations *vs.* commercial bean in two locations in Costa Rica indicate that the percentage of breeding varied between 0.007 and 0.028%, whereas in Quircot, it was between 0 and 0.199% (Chaves-Barrantes *et al.*, 2009). The effective participation of bees and other insects in the pollination in commercial bean fields is considered minimum.

The interspecific cross-pollination can be performed in the common bean crop and produce hybrids; however, the seed can be aborted, produce sterile hybrids or the phenological development can be affected and fail to reach the reproductive stage (Smartt, 1979). Introgression by this type of cross-breeding manages to change the response of its phenological behavior, mainly because in *Phaseolus* spp. the duration of the phenological stages is determined by the growth habit (Types I, II, III and IV), weather (temperature, photoperiod), soil (fertility, physical conditions) and genotype (Tapia-Barquero and Camacho-Henriquez, 1988).

Environment and receiving surroundings. Beans are planted in practically all areas of Mexico, in the spring-summer (SS) and autumn-winter (AW) cycles. Most of the bean planted in the SS cycle is found in areas of erratic rainfall in the semiarid North-Central region of the country, and is concentrated in Chihuahua, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí and Guanajuato (Acosta-Gallegos *et al.*, 1994).

Ambiente y entorno receptor. El frijol se cultiva en prácticamente todas las regiones de México, en los ciclos agrícolas primavera-verano (PV) y otoño-invierno (OI). La mayor parte del cultivo del frijol realizada durante el ciclo PV, se sitúa en áreas de temporal errático en la región semiárida del Norte-Centro de México y se concentra en Chihuahua, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Guanajuato (Acosta-Gallegos *et al.*, 1994).

El Campo Experimental Bajío (CEBAJ) ubicado a 1752 m de altitud, es el campo receptor propuesto para la liberación al ambiente en Etapa Experimental del modelo biotecnológico frijol-*pdf1.2*, desarrolla variedades mejoradas de frijol de diversos tipos de grano para condiciones de riego y de temporal. El CEBAJ es un espacio agrícola confinado y no se reconocen siembras o presencia de parientes silvestres (PS) de *Phaseolus* spp.; aun así, los periodos de floración de los PS no coinciden con las variedades comerciales; el primero florece de octubre a noviembre y fructifica de diciembre a mayo, mientras que la forma cultivada florece y fructifica en abril-mayo (riego) y agosto-septiembre (temporal) (McVaugh, 1987).

Como parte de las condiciones ambientales, los microorganismos tienen una función importante en el desarrollo y la productividad del frijol. Los hongos fitopatógenos más frecuentes en México que afectan el cultivo de frijol y que desarrollan enfermedades fungosas son la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Scrib) (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006), la roya (*Uromyces appendiculatus* var *appendiculatus* (Pers. Pers.) Unger.) (Becerra *et al.*, 1995), pudriciones de raíz (*Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rofsii* Sacc. y varias especies de *Fusarium* spp.), las cuales pueden causar hasta 80% de pérdida en el rendimiento de semilla (Montiel-González *et al.*, 2005).

Construcción genética. El gen defensina (*pdf1.2*) de *A. thaliana* (0.402 kb) se insertó en el genoma de frijol mediante *A. tumefaciens* (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). El gen *pdf1.2* codifica un péptido antimicrobiano (PAM) de protección de amplio espectro y confiere propiedades de protección anti fúngica (Epple *et al.*, 1997). Este gen se insertó dentro del plásmido pKYLX80 (Scharl *et al.*, 1987) y lo regulan las secuencias del doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y el terminador rubisco de chícharo (*Pisum sativum*). El gen

The Bajío Experimental Station (CEBAJ), located at 1752 masl, and is the proposed field host for the environmental release in Experimental Stage of the biotechnology model common bean-*pdf1.2*, and develops improved bean varieties of different types of grain for rainfed and irrigation conditions. The CEBAJ is a confined agricultural space and no plantations or presence of wild relatives (WR) of *Phaseolus* spp. are known; regardless, the flowering periods of the WR do not coincide with the commercial varieties; the first flowers between October and November and bears fruits between December and May, whereas the cultivated form flowers and bears fruits in April-May (irrigated) and August-September (rainfed) (McVaugh, 1987).

As part of the environmental conditions, microorganisms play an important role in bean development and productivity. The phytopathogenic fungi that most commonly affect bean plantations and develop fungal diseases in Mexico are anthracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Scrib) (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006), rust (*Uromyces appendiculatus* var *appendiculatus* (Pers. Pers.) Unger.) (Becerra *et al.*, 1995), root rotting (*Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rofsii* Sacc. and various species of *Fusarium* spp.), which can cause up to 80% of loss in seed yield (Montiel-González *et al.*, 2005).

Genetic construction. The defensin gene (*pdf1.2*) of *A. thaliana* (0.402 kb) was inserted in the common bean genome using *A. tumefaciens* (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). The gene *pdf1.2* encodes an Antimicrobial peptide (AMP) with a wide-spectrum protection and confers antifungal protection properties (Epple *et al.*, 1997). This gene was inserted in the plasmid pKYLX80 (Scharl *et al.*, 1987) and it is regulated by the sequences of the double 35S promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) and the rubisco terminator from pea (*Pisum sativum*). The neomycin phosphotransferase II gene (*nptII*), under the control of nopalín synthase (*nos*) promoter and terminator of *A. tumefaciens*, was used as a selection gene and provides resistance to kanamicin (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010; Espinosa-Huerta *et al.*, 2013) (Figure 2).

1. Antimicrobial peptides-defensins. According to Maróti *et al.* (2011), the AMPs represent multiple

neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), bajo el control del promotor y terminador nopalina sintasa (*nos*) de *A. tumefaciens*, se usó como gen de selección y provee resistencia a kanamicina (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010; Espinosa-Huerta *et al.*, 2013) (Figura 2).

1. Péptidos antimicrobianos-defensinas. Según Maróti *et al.* (2011), los PAM presentan múltiples tipos de interacciones específicas entre los organismos que las expresan y los que enfrentan estos péptidos (bacterias, plantas, insectos y mamíferos); lo cual les confiere la capacidad de establecer interacciones mutualistas o antagonistas. Los genes defensina en las plantas codifican un polipéptido que se divide en dos partes: un péptido-sígnal amino terminal que dirige el péptido al apoplasto y un segundo dominio que codifica el péptido maduro (De Oliveira y Moreira, 2009). Los dos componentes se conservaron evolutivamente para la respuesta inmune de los organismos, y sus características se correlacionan con sus actividades microbicidas que ejercen con la formación de poros en membranas celulares de patógenos, o al impedir el metabolismo del patógeno al internarse en el citoplasma (Silva *et al.*, 2014; Rojas y Zamora, 2010).

La eficacia biológica de diferentes defensinas recombinantes confiere resistencia a hongos fitopatógenos y en ciertos casos a bacterias: papa (Gao *et al.*, 2000), canola y tomate (Parashina *et al.*, 2000), levadura (Almeida *et al.*, 2001), arroz (Jha y Chattoo, 2010), tomate (Abdallah *et al.*, 2010), tabaco y cacahuate (Anuradha *et al.*, 2008), y algunos organismos procariontes (Kant *et al.*, 2009; Portieles *et al.*, 2010).

El modelo biotecnológico evaluado consiste en líneas de frijol modificadas genéticamente con el gen *pdf1.2*, las cuales muestran resistencia al hongo *C.*

types of specific interactions between the organisms that express them and those they are faced with (bacteria, plants, insects and mammals). This gives them the ability to establish mutualistic or antagonistic interactions. Defensin genes in plants encode a polypeptide that is divided in two parts: an amino terminal signal-peptide that directs the peptide to the apoplast and a second domain which encodes the mature peptide (De Oliveira and Moreira, 2009). Both components were conserved evolutionarily for the immune response of the organisms, and their characteristics are correlated with their microbicidal activities they carry out by forming pores in the cell membranes of pathogens, or by preventing the pathogen to metabolize by entering into the microorganism's cytoplasm (Silva *et al.*, 2014; Rojas and Zamora, 2010).

The biological effectiveness of different recombinant defensins provides resistance to phytopathogenic fungi and, in some cases, to bacteria: potato (Gao *et al.*, 2000), canola and tomato (Parashina *et al.*, 2000), yeast (Almeida *et al.*, 2001), rice (Jha y Chattoo, 2010), tomato (Abdallah *et al.*, 2010), tobacco and peanut (Anuradha *et al.*, 2008), and some prokaryotic organisms (Kant *et al.*, 2009; Portieles *et al.*, 2010).

The evaluated biotechnology model consists of lines of common bean, genetically modified with the *pdf1.2* gene, which display resistance to the fungus *C. lindemuthianum* (strains 448 and 1472) that causes anthracnosis, as well as resistance to *F. lateritium*, *R. solani* and *Verticillium sp.*, which cause rotting of the root. The analysis of the transcriptional expression level of *pdf1.2* gene by qPCR exposed that all plants considered resistant had similar expression levels (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

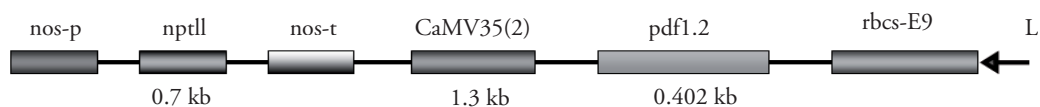


Figura 2. Construcción T-DNA en el vector pKYLX80. nos-p: promotor nopalina sintasa; *nptII*: gen marcador de selección, neomicina fosfo transferasa tipo II; nos-t: terminador nopalina sintasa; P35S2: promotor CaMV35S; *pdf1.2*: gen defensina de *A. thaliana*; rbcS-E9: terminador de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de chícharo (*Pisum sativum*).

Figure 2. T-DNA construction in the pKYLX80 vector. nos-p: nopalina synthase promoter; *nptII*: selection marker gene, neomycin phosphotransferase type II; nos-t: nopalina synthase terminator; P35S2: promoter CaMV35S; *pdf1.2*: *A. thaliana* defensin gene; rbcS-E9: ribulose terminator -1,5-biphosphate carboxylase from pea (*Pisum sativum*).

lindemuthianum (cepas 448 y 1472) causante de la antracnosis, así como resistencia a *F. lateritium*, *R. solani* y *Verticillium sp.*, causantes de pudriciones de raíz. El análisis del nivel de expresión transcripcional del gen *pdf1.2* por qPCR, expuso que todas las plantas consideradas resistentes, tuvieron niveles similares de expresión entre ellas (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

2. Las defensinas y sus efectos pleiotrópicos. Las líneas de frijol-*pdf1.2* no mostraron alteraciones de sus características fenológicas y agronómicas, derivadas de la expresión del gen. En todos los casos, la emergencia, floración (forma, número y días de floración), madurez fisiológica, tamaño de planta, hábito de crecimiento, rendimiento por planta, número de vainas por planta y nodulación en raíces fueron similares a su contraparte convencional (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

Además de la actividad inmune de las defensinas en las plantas, ellas contribuyen como mediadores de tolerancia al zinc cuando existe un exceso, al interferir en el tráfico del zinc a las células de la planta y evitan la toxicidad (De Oliveira y Moreira, 2009; Marqués *et al.*, 2009; Mirouze *et al.*, 2006). En este sentido, las plantas modificadas de *A. thaliana* con el gen *35SCaMV:AhPDF1.1* de *A. halleri* ssp. *halleri*, mostraron mayor tolerancia al Zn sin provocar hiperacumulación del metal en las plantas. La evaluación de niveles de tolerancia al Zn no se analizó en nuestro modelo biotecnológico; sin embargo, se analizó el contenido de los principales minerales en grano y no se encontraron diferencias significativas en el contenido de Zn entre las líneas de frijol-*pdf1.2* y las plantas testigo.

3. Las defensinas y su relación con los microorganismos no-blanco. Las defensinas tienen una gran heterogeneidad en sus secuencias de aminoácidos que evidencian varias actividades biológicas y especificidad de acción, consecuencias de la coevolución entre microorganismos y su hospedante (Graham *et al.*, 2008; De Oliveira y Moreira, 2009). Las defensinas de plantas tienen la especificidad de inhibir el crecimiento de hongos (De Oliveira y Moreira, 2009), el crecimiento de bacterias (Osborn *et al.*, 1995), la actividad de proteasas (Méndez *et al.*, 1990), la síntesis de proteínas (Wijaya *et al.*, 2000) y otras sustancias que bloquean canales de calcio específicos en diferentes microorganismos (Spelbrink *et al.*, 2004).

2. Defensins and their pleiotropic effects. The common bean-*pdf1.2* lines did not display alterations in their original phenological and agronomic characteristics derived from the expression of the gene. In all cases, the emergence, flowering (form, number and days to flowering), physiological maturity, plant size, growth habit, yield per plant, number of pods per plant and root nodulation were similar to their conventional counterpart (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

Alongside the immune activity of defensins in plants, they contribute as mediators of tolerance to zinc when there is an excess, by interfering in the traffic of zinc to the plant's cells and avoiding toxicity (De Oliveira and Moreira, 2009; Marqués *et al.*, 2009; Mirouze *et al.*, 2006). In this sense, the modified *A. thaliana* plants with the gene *35SCaMV:AhPDF1.1* of *A. halleri* ssp. *halleri* displayed a greater tolerance to Zn without causing hyper accumulation of the metal in plants. The evaluation of the levels of tolerance to Zn was not analyzed in our biotechnology model; however, the content of the main minerals in the grains was analyzed, and no significant differences were found in the content of Zn between the common bean-*pdf1.2* lines and the control plants.

3. Defensins and their interaction with non-target microorganisms. Defensins have great heterogeneity in their amino acid sequences that display several biological activities and specificity of action, produced by the coevolution between microorganisms and their hosts (Graham *et al.*, 2008; De Oliveira and Moreira, 2009). Plant defensins have the specificity of inhibiting fungal growth (De Oliveira y Moreira, 2009), bacterial growth (Osborn *et al.*, 1995), the activity of proteases (Méndez *et al.*, 1990), synthesis of proteins (Wijaya *et al.*, 2000) and other substances that block specific calcium channels in different microorganisms (Spelbrink *et al.*, 2004). Arbuscular mycorrhizal fungi are the result of the coevolution between fungi and plants, as an association between the roots of most vascular plants, considered the main organ involved in the intake of nutrients, and a small group of fungi of the phylum *Glomeromycota* (Schübler *et al.*, 2001). This mycorrhiza is characterized by the presence of an intra or intercellular hypha, arbuscles (finely branched hyphae that participate in nutrient exchanges), or extra-radical mycelia that connect the root with the soil (Harrison, 1999; Camarena-Gutiérrez, 2012).

Los hongos micorrízicos arbusculares benéficos son el resultado de la coevolución entre hongos y plantas, como una asociación entre las raíces de la mayoría de las plantas vasculares, consideradas el órgano principal involucrado en la captación de nutrientes, y un grupo pequeño de hongos del phylum *Glomeromycota* (Schübler *et al.*, 2001). Esta micorriza se caracteriza por la presencia de una hifa intra o intercelular, arbusculos (hifas finamente ramificadas que participan en el intercambio de nutrientes), o micelio extra-radical que conecta a la raíz con el suelo (Harrison, 1999; Camarena-Gutiérrez, 2012). Turrini *et al.* (2004) analizaron el efecto de la proteína defensina sobre organismos benéficos y revelaron que no existieron diferencias entre la planta modificada y la planta convencional en el crecimiento miceliar, ya que cuando se sometieron a los exudados de la planta, se estableció la relación simbiótica.

El modelo biotecnológico de frijol-*pdf1.2* se analizó por sus efectos sobre los hongos micorrízicos benéficos *Rhizophagus intraradices* y *Trichoderma harzianum*. Los resultados indican que la interacción con las plantas de frijol-*pdf1.2* no mostraron diferencias significativas, y se observó capacidad de infección similar a las plantas testigo; asimismo, no se redujo la población de esporas y micelios libres en el suelo (Granados-Vallejo *et al.*, 2019). De manera similar no se observó un efecto antibacterial sobre bacterias benéficas nodulantes (*Rhizobium tropici*) en condiciones *in vitro* o *in vivo*, pues el número de nódulos por planta en las líneas de frijol-*pdf1.2* con respecto a las plantas convencionales, no mostró diferencias significativas (Granados-Vallejo *et al.*, 2019) y, por tanto, se concluyó que la defensina recombinante expresada en frijol no tiene efectos inhibitorios en bacterias nodulantes.

4. Gen de selección *nptII*. El uso de genes de selección que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas ha sido una preocupación continua en el tema de bioseguridad de cultivos genéticamente modificados, debido a la probabilidad de que esto genere una condición de ventaja que propicie un comportamiento tipo maleza sobre los cultivos convencionales o parientes silvestres (Ramessar *et al.*, 2007).

El gen de selección *nptII* confiere resistencia a kanamicina, sustancia usada como un método de selección de estructuras genéticamente modificadas en condiciones *in vitro* y su presencia es inocua en el

Turrini *et al.* (2004) analyzed the effect of the defensin protein on beneficial organisms and they revealed that there were no significant differences between the modified plant and the conventional plant in terms of mycelial growth, since the symbiotic relation was established when exposed to the plant's exudates.

The biotechnology model of common bean-*pdf1.2* was analyzed for its effects on the beneficial mycorrhizal fungi *Rhizophagus intraradices* and *Trichoderma harzianum*. The results indicate that the interaction with common bean-*pdf1.2* plants did not show significant differences, and a similar ability of infection was observed with the control plants; likewise, the populations of spores and free mycelia in the soil was not reduced (Granados-Vallejo *et al.*, 2019). Similarly, no antibacterial effect was observed on the nodulating beneficial bacteria (*Rhizobium* spp.) in *in vitro* or *in vivo* conditions, since the number of nodules per plant in the lines of common bean-*pdf1.2* displayed no significant differences with conventional plants (Granados-Vallejo *et al.*, 2019) and therefore, we concluded that the recombinant defensin expressed in bean plants has no inhibiting effects on nodulating bacteria.

4. Selection gene *nptII*. The use of selection genes that confer resistance to antibiotics or herbicides has been a continuous concern in the topic of genetically modified crop biosafety, due to the probability that this produces an advantageous condition leading to a weed-like behavior on conventional crops or wild relatives (Ramessar *et al.*, 2007).

The *nptII* selection gene confers resistance to kanamycin, a substance used as a selection method for genetically modified structures in *in vitro* conditions and its presence is innocuous in the plant's genome, as long as there is no selection agent.

History of safe use. The biotechnology model of common bean-*pdf1.2*, resistant to phytopathogenic fungi in Mexico is the first of its type on which an ERE is performed. There are no references of a similar event on an international scale.

Asking questions in the final stage of contextualization of common bean-*pdf1.2*. Up to this point, we have the contextualization of the common bean-*pdf1.2* in the releasing area, which helps identify the useful information for asking

genoma de la planta, en tanto no exista el agente de selección.

Historial de uso seguro. El modelo biotecnológico de frijol-*pdf1.2* resistente a hongos fitopatógenos en México es el primero en su tipo en el cual se realiza una ERA. No existen referencias de un evento parecido a nivel internacional.

Formulación de preguntas en la etapa final de la contextualización del frijol-*pdf1.2*. Hasta este punto se tiene la contextualización del frijol-*pdf1.2* en el área de liberación, lo cual ayuda a identificar la información útil para generar preguntas vinculadas con las metas políticas de protección que deben plantearse para evaluar el riesgo de cualquier acción o producto en un ambiente dado. Las preguntas surgidas bajo el escrutinio de la ERA son: ¿Es posible que el contacto permanente del hongo patógeno con la defensina en un sistema agrícola propicie el desarrollo de resistencia en el microorganismo patógeno? ¿Existe un efecto inhibitorio en microorganismos no-blanco, específicamente en hongos benéficos/antagonistas o bacterias nodulantes? ¿Pudiera el frijol-*pdf1.2* convertirse en un organismo competitivo o con características de maleza sobre las otras variedades de frijol en el agroecosistema? ¿La expresión del gen *nptII* puede proporcionar toxicidad para organismos no-blanco en caso de introgresión involuntaria y generar dominancia en la población o el agroecosistema? ¿El flujo de genes, desde el frijol-*pdf1.2* a los cultivos convencionales o parientes silvestres, será suficiente para provocar una pérdida de la biodiversidad? ¿La tolerancia a Zn asociada a la sobreexpresión de defensinas establece una posible hiperacumulación en los tejidos de frijol y con ello una eventual toxicidad en su consumo? Las evidencias de las respuestas se mostrarán en la etapa de caracterización del riesgo de manera puntual.

Metas Operativas de Protección. Las preguntas formuladas en la etapa final de la contextualización del frijol-*pdf1.2* fueron la base para generar las metas operativas de protección (MOP), es decir, lo que se desea resguardar de un posible daño: 1) efectos sobre organismos patógenos y no-blanco en el agroecosistema receptor; 2) efecto en el aumento en su capacidad competitiva o como maleza y; 3) efectos del flujo de genes a cultivares convencionales y parientes silves-

questions related to the political protection goals that must be asked in order to evaluate the risk of any action or product in a given environment. The questions that arose under the scrutiny of the ERA are: Is it possible that the permanent contact of the pathogenic fungus with the defensin in an agricultural system promotes the development of resistance in the pathogenic microorganism? Is there an inhibiting effect on non-target microorganisms, specifically in beneficial/antagonistic fungi or nodulating bacteria? Could the common bean-*pdf1.2* become a competitive organism or with weed-like characteristics over the other bean varieties in the agroecosystem? Can the expression of the gene *nptII* provide toxicity to non-target organisms in the case of involuntary introgresion and produce dominance in the population or the agroecosystem? Will the gene flow from the common bean-*pdf1.2* to conventional crops or wild relatives be enough to cause a loss in biodiversity? Does the tolerance to Zn related to the overexpression of defensins establish a possible hyper accumulation in bean tissues, and therefore an eventual toxicity when eating it? The evidence of the answers will be shown in the stage of risk characterization in a specific way.

Operative Production Goals. The questions asked in the final stage of the contextualization of common bean-*pdf1.2* were the basis to generate the operative protection goals (OPG). That is to say, what we want to safeguard from possible damage is 1) effects on pathogenic and non-target organisms in the receiving agroecosystem; 2) effect on the increase of its competitive ability or as weeds, and 3) effects of the gene flow to conventional cultivars and wild relatives, within or outside of the experimental agroecosystem (Table 1).

Final evaluation points and risk hypotheses

The OPGs gave way to more than one final evaluation point (FEP) according to the context of the experimental agroecosystem, the knowledge of the biotechnological model and its analysis, backgrounds of similar models, as well as the elements of interaction that compose it (Table 1). Following with the above, each FEP produced RHs, which establish the starting point of the risk to be evaluated with scientific and technical arguments (Table 1).

tres, dentro o fuera del agroecosistema experimental (Cuadro 1).

Puntos finales de evaluación e hipótesis de riesgo

Las MOP dieron lugar a más de un punto final de evaluación (PFE) de acuerdo con el contexto del agroecosistema experimental, el conocimiento del modelo biotecnológico y su análisis, los antecedentes de modelos similares, así como los elementos de interacción que la integran (Cuadro 1). En seguimiento a lo anterior, de cada PFE se desprendieron HR, las cuales establecen el punto de inicio del riesgo que se debe evaluar con argumentos científicos y técnicos (Cuadro 1). Nueve HR se derivaron del análisis, se desagregaron y analizaron en la etapa siguiente de la ruta al daño (RD) al iniciar su caracterización del riesgo de la ERA.

CONCLUSIONES

A partir de la descripción de las características del frijol genéticamente modificado y su asociación con el posible entorno receptor de liberación regional y nacional, se reconoció que la biodiversidad de microorganismos no-blanco, así como parientes silvestres y variedades convencionales de frijol es de importancia primaria.

También se reconocen como riesgos posibles, el desarrollo de resistencia por los microorganismos blanco por exposición constitutiva al gen defensina; así como el incremento de la capacidad competitiva, no solo del frijol-*pdf1.2* sino de parientes silvestres o cultivos convencionales, los cuales pudieran mostrar resistencia a hongos patógenos, hiperacumulación de Zn o resistencia a kanamicina o ambos, por efecto de la introgresión genética del gen defensina.

Estos temas y el análisis de cada hipótesis de riesgo se abordarán en un documento subsecuente, en el cual se establecerá la ocurrencia de los posibles riesgos a través de pasos iterativos de la ruta al daño, el nivel del riesgo detectado, así como las consecuencias y las medidas de bioseguridad recomendadas.

LITERATURA CITADA

Abdallah N. A., D. Shah, D. Abbas, and M. Madkour. 2010. Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to fusarium wilt. *GM Crops* 1: 344-350.

Nine RHs were derived from the analysis, separated and analyzed in the next stage of the path to damage (PD) when beginning the risk characterization of the ERA.

CONCLUSIONS

From the description of the characteristics of the genetically modified common bean and its association with the possible national and regional receiving environment, the biodiversity of non-target microorganisms, along with wild relatives and conventional bean varieties were acknowledged to be of utmost importance.

In addition, possible risks include the development of resistance by target microorganisms due to constitutive exposure to the defensin gene, as well as the increase in competitive capacity, not only of the common bean-*pdf1.2*, but also of wild relatives or conventional plantations, which may display resistance to pathogenic fungi, hyper accumulation of Zn or resistance to kanamycin or both, due to the effect of the genetic introgression of the defensin gene.

These subjects, along with the analysis of each risk hypothesis will be addressed in a subsequent document, which will establish the occurrence of possible risks through iterative steps of the path to damage, the risk level detected, and the consequences and recommended biosafety measures.

—End of the English version—

---*---

- Acosta-Gallegos J. A., P. Vargas-Vázquez, y J. W. White. 1994. Fenología y rendimiento de variedades de frijol de diversos orígenes en tres fechas de siembra. *In:* 40 Ann. Reunion of the PCCMCA. San José, Costa Rica. Mar. 14-19. p. 38.
- Aerts A. M., I. Francois, B.P.A. Cammue, and K. Thevissen. 2008: The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol. Life Sci.* 65: 2069-2079.
- Almeida M. S., K. S. Cabral, L. Neves de Medeiros, A. P. Valente, F. C. Almeida, and E. Kurtenbach. 2001. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 395: 199-207.
- Anuradha T. S., K. Divya, S. K. Jami, and P. B. Kirti. 2008. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* 27: 1777-1786.

Cuadro 1. Relación de las hipótesis de riesgo derivadas de los puntos finales de evaluación asociados a las metas de protección.
Table 1. Relation of the risk hypotheses derived from the final evaluation points related to the production goals.

| Metas de Protección | Puntos Finales de Evaluación | Hipótesis de Riesgo |
|---|---|--|
| 1 Conservar la diversidad de microorganismos blanco y no-blanco. | 1.1 Desarrollo de resistencia en los microorganismos patógenos dentro del agroecosistema experimental. | HR1 La expresión constitutiva de <i>pdf1.2</i> en frijol causa resistencia en los hongos patógenos. |
| | 1.2 La biodiversidad de los organismos no-blanco dentro del agroecosistema experimental | HR2 La proteína PDF1.2 expresada en los tejidos del frijol afectan a hongos beneficios en el agroecosistema experimental propiciando pérdida de su biodiversidad y limitando su efecto benéfico. HR3 La proteína PDF1.2 reduce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. |
| | 1.3 Toxicidad por acumulación de zinc y expresión de la proteína NPTII. | HR4 El aumento en la capacidad de almacenamiento de zinc por efecto de expresión de PDF1.2, se torna tóxica para los organismos que se encuentran en contacto con ella dentro del agroecosistema. HR5 La expresión de la proteína NPTII resulta en un efecto adverso sobre organismos que interaccionan con la planta, alergenicidad y toxicidad. |
| 2 Evitar el desplazamiento de cultivos convencionales y parientes silvestres | 2.1 Desarrollo de mayor habilidad competitiva en el frijol GM (maleza). | HR6 El frijol- <i>pdf1.2</i> es más competitivo debido a la tolerancia a hongos y desplaza a CC o PS. HR7 La expresión de PDF1.2 aumenta la capacidad competitiva tipo maleza del frijol- <i>pdf1.2</i> . |
| | 3 Mantener la diversidad de CC y PS independientemente de un posible flujo de genes. | HR8 El flujo de genes del frijol- <i>pdf1.2</i> hacia CC y PS afecta la diversidad genética. HR9 El flujo de genes del frijol- <i>pdf1.2</i> a variedades CC y PS, podría incrementar la capacidad competitiva tipo maleza. |

CC: Cultivos convencionales; PS: Parientes silvestres; HR: Hipótesis de riesgo ♦ CC: Conventional crops; PS: Wild relatives; HR: Risk hypothesis

- Becerra E., E. López, y J. Acosta. 1995. Resistencia genética y control químico de la roya del frijol en el trópico húmedo de México. *Agron. Mesoam.* 6: 61-67.
- Bennett M. D., and I. J. Leitch. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms—583 new estimates. *Ann. Bot.* 80: 169–196.
- Brunner B., and J. Beaver. 1989. Estimation of outcrossing of the common bean in Puerto Rico. *Hort. Sci.* 24: 669-771.
- Caballero L., M. Pérez, H. Prieto, E. Salazar, C. Aguirre, y C. Araya. 2014. Guía Metodológica para la Evaluación de Riesgos Ambientales de Vegetales Genéticamente Modificados (VGM), con Guía Electrónica de Metodologías (GEM) para su Uso. Min. Medio Ambiente. Santiago, Chile. 108 p.
- Camarena-Gutiérrez G. 2012. Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Rev. Chapingo. Serie Cienc. Forest. Amb.* 18: 409-421.
- CDB (Convenio sobre la Diversidad Biológica). 2000. Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la diversidad biológica. 19 p.
- Chaves-Barrantes N., R. Araya-Villalobos, y D. Debouck. 2009. Flujo de genes entre frijol común y silvestre en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 20: 237-244.
- De Oliveira C. A., and V. G. Moreira. 2009. Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30: 1007-1020.
- Epple P., K. Apel, and H. Bohlmann. 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9: 509–20.
- Espinosa-Huerta E., A. Quintero-Jiménez, B. M. Sánchez-García, J. A. Acosta-Gallegos, y M. A. Mora-Avilés. 2013. Resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol común transgénico, expresando el gen defensina de *Arabidopsis thaliana*. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 4: 1027-1042.
- Ferreira J. L., C. J. E. de Souza, A. L. Teixeira, F. F. de Lanes, P. R. Cecon, and A. Borém. 2007. Gene flow in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 153: 165-170.
- Fitzpatrick J. W., A. Cheavegatti-Gianotto, F. J. Aparecido, M. F. Grossi-de-Sa, P. Keese, R. Layton, D. Lima, T. Nickson, A. Raybould, E. Romano, J. Romeis, E. Ulian, and M. Bezovsky. 2009. Problem formulation in environmental risk assessment of genetically modified crops: A Brazilian workshop. *BioAssay* 4: 1-11.
- Gao A. G., S. M. Hakimi, C. A. Mittanck, Y. Wu, B. M. Woerner, D. M. Stark, D. M. Shah, J. Liang, and C. M. Rommens. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18: 1307-1310.
- García-Alonso M. 2010. Current challenges in environmental risk assessment: The assessment of unintended effects of GM crops on non-target organisms. *IOBC/WPRS Bull.* 52: 57-63.
- García-Alonso M., P. Hendley, F. Bigler, E. Mayeregger, R. Parker, C. Rubinstein, E. Satorre, F. Solari, and M. A. McLean. 2014. Transportability of confined field trial data for environmental risk assessment of genetically engineered plants: a conceptual framework. *Transgenic Res.* 23: 1025–1041.
- Graham M., K. Silverstein, and K. Vandenbosch. 2008. Defensin like genes: genomic perspectives on a diverse superfamily in plants. *Crop Sci.* 48: S3-S11.
- Gray A. 2012. Problem formulation in environmental risk assessment for genetically modified crops: a practitioner's approach. *Colln. Biosaf. Rev.* 6: 10–65.
- Granados-Vallejo M., O. A. Grageda-Cabrera, M. B. Sánchez-García y M.A. Mora-Avilés. 2019. Efecto de la defensina recombinante (pdf1.2) sobre microorganismos benéficos asociados a frijol genéticamente modificado. *Rev. Fitotec. Mex.* (en prensa)
- Harrison M. J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 :361-389.
- Jha S., and B. B. Chattoo. 2010. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transg. Res.* 19: 373–384.
- Kant P., W. Z. Liu, and P. K. Pauls. 2009. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides* 30: 1593–1599.
- LBOGM (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados). 2005. Diario Oficial de la Federación. México. 18 de marzo de 2005.
- Maróti G., A. Kereszt, É. Kondorosi, and P. Mergaert. 2011. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res. Microbiol.* 162: 363-374.
- Marqués L., R. Oomen, A. Aumelas, M. Le Jean, and P. Barthomieu. 2009. Production of an *Arabidopsis halleri* foliar defensin in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1640-1648.
- McVaugh R. 1987. Leguminosae. In: Anderson, W. R. (ed). *Flora Novo-Galiciana: A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico.* Ann. Arbor. 5: 448-496.
- Méndez E., A. Moreno, F. Colilla, R. Peláez, G. G. Limas, R. Méndez, F. Soriano, M. Salinas, and C. Haro. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, -hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* 194: 533-539.
- Mirouze M., J. Sels, R. Odile, P. Czerniec, S. Loubet, A. Jacquier, I.E.J.A. Francois, B.P.A. Cammue, M. Lebrun, P. Barthomieu, and L. Marquéz. 2006. A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J.* 47: 329-342.
- Montiel-González L., F. González-Flores, B. M. Sánchez-García, S. Guzmán-Rivera, F. P. Gámez-Vázquez, J. A. Acosta-Gallegos, y M. Mendoza-Elos. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23: 1-7.
- OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). 1993. Safety consideration for biotechnology: Scale-up of crop plants. Paris, France. http://dbtbtbiosafety.nic.in/guideline/OACD/Scale_up_of_crop_plants.pdf.
- Osborn R. W., G. W. De Samblanx, K. Thevissen, I. Goderis, S. Torrekens, F. Van Leuven, S. Attenborough, S. B. Rees, and W. F. Broekaert. 1995. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* 368: 257–262.
- Paes de Andrade P., y W. Parrott. 2012. Guía para la Evaluación de Riesgo Ambiental de Organismos Genéticamente Modificados. Internacional Life Sciences Institute do Brasil. 147 p.

- Parashina E. V., L. A. Serdobinskii, E. G. Kalle, N. V. Lavrova, V. A. Avetisov, V. G. Lunin, and B. S. Naroditskii. 2000. Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. *Russian J. Plant Physiol.* 47: 417-423.
- Pereira L. A., e C. Cavariani. 1984. Taxa de hibridação natural do feijoeiro comum em Patos de Minas, Minas Gerais. *Pesq. Agropec. Bras* 19: 1181-1183.
- Portieles R., C. Ayra, E. González, A. Gallo, R. Rodríguez, O. Chacón, Y. López, M. Rodríguez, J. Castillo, M. Pujol, G. Enríquez, C. Borroto, L. Trujillo, B. P. H. J. Thomma, and O. Borrás-Hidalgo. 2010. *NmDef02*, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant Biotech. J.* 8: 678-690.
- PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015. 2017. Proyecto de Norma Oficial Mexicana por la que se establecen las características y requisitos que deberán contener los estudios de evaluación de los posibles riesgos que la liberación experimental de organismos genéticamente modificados pudiera ocasionar al medio ambiente y a la diversidad biológica, así como a la sanidad animal, vegetal y acuícola. *Diario Oficial de la Federación.* México. 3 de enero de 2017.
- Quintero-Jiménez A., E. Espinosa-Huerta, J. A. Acosta-Gallegos, H. S. Guzmán-Maldonado, and M. A. Mora-Avilés. 2010. Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell Tiss. Org.* 102: 381-386.
- Ramessar K., A. Peremarti, S. Gómez-Galera, S. Naqvi, M. Moralejo, P. Muñoz, T. Capell, and P. Christou. 2007. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker gene in transgenic crop plants: a case of science. *Transgenic. Res.* 16: 261-280.
- Raybould A. 2006. Problem formulation and hypothesis testing for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Environ. Biosaf. Res.* 5: 119-126.
- RLBOGM (Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados). 2009. *Diario Oficial de la Federación.* México. 6 de marzo de 2009.
- Rodríguez-Guerra R., J. A. Acosta-Gallegos, M. M. González-Chavira, y J. Simpson. 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agric. Téc. Méx.* 32: 101-114.
- Rojas A., A. C., y H. M. Zamora E. 2010. Defensinas de plantas y su uso potencial como controladores de plagas en la agricultura. *Act Biol. Colomb.* 15: 33-46.
- Schardl C. L., A. D. Byrd, G. Benzion, M. A. Altschuler, D. F. Hildebrand, and A. G. Hunt. 1987. Design and construction of a versatile system for the expression of foreign genes in plants. *Gene* 61: 1-11.
- Schübler A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413-1421.
- Silva P. M., S. Goncalves, and N. C. Santos. 2014. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front. Microbiol.* 5: 75-90
- Smartt J. 1979. Interspecific hybridization in the grain legumes-A review. *Econ. Bot.* 33: 329-337.
- Spelbrink R.G., N. Dilmac, A. Allen, T. J. Smith, D. M. Shab, and G. H. Hocherman. 2004. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol.* 135: 2055-2067.
- Tapia-Barquero H., y A. Camacho-Henriquez. 1988. Manejo Integrado de la Producción de Frijol Basado en Labranza Cero. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit.* Managua. Nicaragua. 181 p.
- Tavares L. S., M. O. Santos, L. F. Viccini, J. S. Moreira, R. N. G. Miller, and O. L. Franco. 2008. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* 29: 1842-1851.
- Tepfer M., M. Racovita, and W. Craig. 2013. Putting problem formulation at the forefront of risk analysis. *GM Crops and Food* 4: 1-15
- Turrini A., C. Sbrana, M. P. Nuti, B. M. Pietrangeli, and M. Giovannetti. 2004. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 266: 69-75.
- Wijaya R., G. M. Neumann, R. Condrón, A. B. Hughes, and G. M. Poly. 2000. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant. Sci.* 159: 243-225.
- Wolt J. D., P. Keese, A. Raybould, J. W. Fitzpatrick, M. Burachik, A. Gray, S. S. Olin, J. Schiemann, M. Sears, and F. Wu. 2010. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transg. Res.* 19: 425-436.