

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

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

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. (mora_alejandra@yahoo.com)

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Flor de Mayo Anita, genéticamente modificado con el gen defensina (*pdf1.2*) de *Arabidopsis thaliana* se caracterizó por su efectividad biológica y ventaja agronómica en condiciones confinadas. La liberación al ambiente de esta tecnología requiere de una Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) para identificar los posibles efectos adversos que el uso propuesto de la tecnología recombinante puede causar en el ambiente al evaluar la probabilidad de que ocurra un riesgo, la gravedad del riesgo, así como las medidas de bioseguridad recomendadas para reducirlo. La formulación del problema se estableció en el manuscrito precedente y dio lugar a tres metas operativas de protección asociadas con los efectos adversos sobre organismos patógenos y organismos no-blanco, el aumento de la capacidad competitiva del frijol-*pdf1.2*, y el flujo de genes hacia cultivos convencionales y parientes silvestres de frijol. Los puntos finales de evaluación se definieron y con ellos se delinearon nueve hipótesis de riesgo. La ERA desestimó la posibilidad de ocurrencia de algún daño ocasionado por la expresión de las proteínas defensina o neomicina fosfotransferasa II sobre los microorganismos no-blanco y el desarrollo de resistencia de los organismos blanco. Asimismo, se descartó la posibilidad de incremento en la capacidad competitiva del frijol-*pdf1.2* por ser un sistema agrícola altamente dependiente, y finalmente, se definió como un riesgo poco probable la posibilidad de introgresión de secuencias recombinantes a cultivos convencionales o parientes silvestres, por no existir coincidencia en sus etapas fenológicas durante la liberación al ambiente, aunado a las barreras genéticas existentes entre

ABSTRACT

The genetically modified common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Flor de Mayo Anita, with the *Arabidopsis thaliana* defensin gene (*pdf1.2*) was characterized by its biological effectiveness and agronomic advantage under confined conditions. Releasing this technology into the environment requires an Environmental Risk Assessment (ERA) in order to identify the possible adverse effects that the suggested use of the recombinant technology may have on the environment when evaluating the probability of risk, its severity, and the biosafety measures recommended to reduce possible risks. The problem formulation was established in the earlier manuscript and it gave rise to three operative protection goals related to the adverse effects on pathogenic organisms and non-target organisms, the increase in the competitive capacity of the common bean-*pdf1.2*, and the gene flow to conventional bean crops and wild relatives. The final evaluation points were defined, and from there, nine risk hypotheses were outlined. The ERA dismissed the possibility of occurrence of any damages caused by the expression of the defensin or neomycin phosphotransferase II proteins on the non-target microorganisms and the development of resistance on target organisms. Likewise, the possibility of an increase in the competitive capacity of the common bean-*pdf1.2* was discarded, since it is a highly dependent agricultural system, and finally, the possibility of an introgression of recombinant sequences into conventional crops or wild relatives was defined as an unlikely risk, due to the absence of coincidences in its phenological stages during its environmental release, along with the genetic barriers among wild relatives. The biosafety measures recommended to minimize the possibility of damage consisted in establishing live bean and maize barriers, the phenological lag between the common bean-*pdf1.2* and conventional bean;

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2018. Aprobado: marzo, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 1161-1182. 2019.

los parientes silvestres. Las medidas de bioseguridad recomendadas para minimizar la posibilidad de ocurrencia de algún daño consistieron en el establecimiento de barreras vivas de frijol y maíz, el desfase fenológico entre el frijol-*pdf1.2* y el frijol convencional; estudios de seguimiento durante la liberación tales como la caracterización de microorganismos del suelo antes, durante y después de la liberación al ambiente, así como la identificación de plantas voluntarias después de la cosecha.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, caracterización del riesgo, estimación del riesgo, medidas de bioseguridad, gen *pdf1.2*.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de riesgo es el fundamento científico sobre la cual se toman las decisiones regulatorias sobre los organismos genéticamente modificados (García-Alonso *et al.*, 2006). Una Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) es la recopilación de información técnico-científica para determinar el impacto ambiental de una actividad humana determinada. En el caso de intención de liberación al ambiente de un Organismo Genéticamente Modificado (OGM), la ERA es de gran ayuda para la toma de decisiones a través de la estimación objetiva de la incertidumbre sobre la ocurrencia de un evento no deseado basado en sus características particulares y la región de liberación. La información debe explicarse con datos que sustenten las conclusiones de un posible riesgo y la información debe poder verificarse con base en datos científicos.

La ERA del modelo biotecnológico de frijol modificado genéticamente con el gen defensina (*pdf1.2*), para conferir protección de amplio espectro contra hongos fitopatógenos (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013), forma parte de los requisitos de la solicitud de permiso de liberación al ambiente en Etapa Experimental bajo la legislación mexicana (LBOGM, 2005). La metodología de ERA aplicada reúne las guías empleadas por Brasil (Paes de Andrade y Parrott, 2012), Chile (Caballero *et al.*, 2014), el International Life Sciences Institute (ILSI) Research Foundation (García-Alonso *et al.*, 2014) y México (PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

El documento precedente sobre el tema específico se enfocó en la formulación del problema y la caracterización del modelo biotecnológico con base en las particularidades del frijol genéticamente modificado con el gen defensina. También se identificaron en dicho documento, las metas operativas de protección

follow-up studies during release such as the characterization of soil microorganisms before, during and after environmental release, as well as the identification of voluntary plants after the harvest.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, risk characterization, risk estimation, biosafety measures, gen *pdf1.2*.

INTRODUCTION

Risk assessment is the scientific basis upon which regulatory decisions are made on genetically modified organisms (García-Alonso *et al.*, 2006). An Environmental Risk Assessment (ERA) is the gathering of technical and scientific information to determine the environmental impact of a particular human activity. In the case of the intention of an environmental release of a Genetically Modified Organism (GMO), the ERA provides great assistance in decision making through the objective estimate of uncertainty on the occurrence of an undesired event based on its particular characteristics and the area of release. The information must be explained with data sustaining conclusions on a possible risk and the information must be verifiable, based on scientific data.

The ERA of the biotechnology model of the common bean, genetically modified with the defensin gene (*pdf1.2*) to provide wide-range protection against phytopathogenic fungi (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013), is a part of the requirement of the application for an environmental release permission in an Experimental Stage under Mexican legislation (LBOGM, 2005). The ERA methodology applied gathers the guides used by Brazil (Paes de Andrade and Parrott, 2012), Chile (Caballero *et al.*, 2014), the International Life Sciences Institute (ILSI) Research Foundation (García-Alonso *et al.*, 2014) and Mexico (PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

The preceding document about this particular subject focused on the problem formulation and the characterization of the biotechnology model based on the distinctive features of the common bean genetically modified with the defensin gene. In addition, the operative protection goals (OPG), the ending evaluation points (EEP) and the risk hypotheses (RH) were identified.

As a follow up to the elements of the problem formulation, and after the existing knowledge was

(MOP), los puntos finales de evaluación (PFE) y finalmente, las hipótesis de riesgo (HR).

Luego de identificar los elementos de la formulación del problema, una vez organizado el conocimiento existente de las secuencias genéticas introducidas, el fenotipo y la fenología del frijol-*pdf1.2* en comparación con su contraparte convencional, la naturaleza del entorno receptor y las interacciones entre estos elementos; entonces se caracterizaron, el potencial del riesgo, la posibilidad de que este ocurra, así como la magnitud del mismo, sus consecuencias y las medidas de bioseguridad que se emplearían en caso de que se realizara la liberación al ambiente.

La caracterización del riesgo está conformada de dos elementos fundamentales: la probabilidad de exposición al riesgo (de que ocurra coincidencia entre los factores para que un daño suceda) y las consecuencias de esta exposición (ocurrencia y magnitud del daño). La caracterización de riesgo establece la posible ruta al daño con base en las metas de protección e identifica los tipos y niveles de exposición en los puntos finales de evaluación (Wolt *et al.*, 2010). En esta etapa se define la validez de las hipótesis de riesgo planteadas, las cuales se pueden descartar con base en las evidencias técnicas y científicas asociadas al modelo biotecnológico, que definan la ausencia de riesgo y por tanto de daño (Paes de Andrade y Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

La estimación del riesgo especifica la posibilidad de que el daño realmente ocurra de acuerdo con el entorno propuesto de liberación y los factores con los que el organismo genéticamente modificado interactúe. Derivado de esta etapa se detalló, para cada una de las hipótesis de riesgo, un valor cualitativo fundamentado en el análisis general, a tal valor, de acuerdo con el grado de magnitud, se le asignaron recomendaciones de medidas de bioseguridad.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar y evaluar el riesgo potencial asociado a la liberación al ambiente, del modelo biotecnológico frijol-*pdf1.2* con resistencia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos, con base en las características fenotípicas y genotípicas y su interacción potencial con otros elementos biológicos que pudieran verse afectados; todo lo anterior fundamentado en el conocimiento del organismo y el ambiente receptor.

organized on, the genetic sequences introduced, the phenotype and phenology of the common bean-*pdf1.2* in comparison with its conventional counterpart, the nature of the receiving environment and the interactions among these elements; then, the risk potential, the possibility of such an event may occur and its magnitude, derived consequences and the biosafety measures which might be used, should an environmental release would be implemented, were characterized.

Risk characterization is formed with two fundamental elements: the probability of exposure to risk (being exposed to a coincidence between factors which causes damage) and the consequences of this exposure (occurrence and magnitude of damage). Risk characterization establishes the possible path to damage on the protection goals establishing the type and level of exposure of the ending evaluation points (Wolt *et al.*, 2010). This stage defines the validity of the risk hypotheses presented, which may be discarded, based on the technical and scientific evidence related to the biotechnology model, that define the absence of risk and therefore of damage (Paes de Andrade and Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

Risk estimation specifies the actual possibility of damage may occur, depending on the release environment proposed and the factors which the genetically modified organism may interact with. Derived from this stage, a qualitative value was detailed for each risk hypothesis based on the general analysis, to which, depending on the risk magnitude, there were assigned recommendations of biosafety measures.

Due to the above, the aim of this research was to identify and evaluate the potential risk related to the environmental release of the biotechnology model of the common bean-*pdf1.2*, resistant to a wide spectrum of phytopathogenic fungi, based on the phenotypical and genotypical characteristics and its potential interaction with other biological elements that may be affected, based on the knowledge of the organism and the receiving environment.

METHODOLOGY

The problem formulation (Stage 1) is related to the intrinsic characteristics of the biotechnology model of common bean

METODOLOGÍA

La formulación del problema (Etapa 1) se asocia con las características intrínsecas del modelo biotecnológico de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Flor de Mayo Anita modificado con el gen defensiva (*pdf1.2*) de *A. thaliana* y las metas de protección (políticas y operativas), así como los puntos finales de evaluación que dieron lugar a las hipótesis de riesgo. En este segundo documento se desarrollaron los pasos siguientes de la ERA, caracterización del riesgo (Etapa 2), estimación del riesgo (Etapa 3, y medidas de bioseguridad (Etapa 4) para las hipótesis de riesgo formuladas en el primer documento.

Etapa 2. Caracterización del riesgo

La caracterización del riesgo determina la probabilidad de que el riesgo identificado en los puntos finales de evaluación (PFE) e hipótesis de riesgo (HR), realmente ocurra y ocasione un efecto adverso novedoso (por encima de las posibles variaciones naturales de su contraparte no modificada). El riesgo se expresa en función de: 1) la probabilidad de exposición que puede presentar un agente para causar daño y, 2) las consecuencias posibles si esta exposición se establece; y solo en este último caso se evaluará la intensidad o cantidad, duración y efectos adversos reales (Paes de Andrade y Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

1) Probabilidad de la exposición

La cadena de eventos que deben ocurrir de forma sucesiva para que un PFE se afecte, en cada una de la HR planteadas, se determina por medio de la ruta al daño (RD) (Paes de Andrade y Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017). Cada HR debe desarrollar una RD, con la cual se evalúa si la entidad protegida podría estar expuesta al peligro y ocurrir efectos adversos en ella (García-Alonso *et al.*, 2014). Esta caracterización debe considerar la exposición al peligro y la probabilidad de la exposición de cada suceso en la RD definida como: muy posible, posible, poco posible o muy poco posible, siempre con base en información, datos científicos o técnicos. Durante la generación de la RD es factible que los eventos de cierta etapa se puedan descartar en algún punto del análisis por considerar que ese evento no ocurrirá en realidad; o bien, que la RD se detenga en ese paso y no continúe; lo que indicaría que la HR se rechaza por no presentarse un efecto adverso. Al generar la RD se establecen medidas de bioseguridad por lo que la HR tendría un nivel de exposición menor.

(*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Flor de Mayo Anita, modified with the defensin gene (*pdf1.2*) from *A. thaliana* and the protection goals (political and operative), as well as the final evaluation points that gave rise to the risk hypotheses. In this follow-up document, the next steps of ERA were developed, risk characterization (Stage 2), risk estimation (Stage 3), and biosafety measures (Stage 4) for the risk hypotheses formulated in our former document.

Stage 2. Risk characterization

Risk characterization determines the probability that, the risk identified in the Ending Evaluation Points (EEP) and Risk Hypothesis (RH) actually occurs, causing a new adverse effect (above any other possible natural variation of its unmodified counterpart). Risk is expressed based on: i) the probability of exposure to a causative agent of damage, and ii) the possible consequences, if such an exposure would take place; and only if such an exposure does occur, their actual magnitude or intensity, duration and adverse effects, will be evaluated (Paes de Andrade and Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

1) Probability of exposure

The chain of events that should take place successively in order for a EEP to be affected in each RH presented is determined by the path to damage (PD) (Paes de Andrade and Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017). Each RH must develop a PD, with which it is evaluated whether the protected entity can be exposed to danger and derived adverse effects, or not (García-Alonso *et al.*, 2014). This characterization must consider the exposure to the danger and the probability of the exposure to each event in the PD defined as: highly possible, possible, slightly possible or very slightly possible, always based on information, scientific or technical data. During the generation of the PD, it is feasible for the events of a certain step to be discarded in some point of the analysis due to considerations that this event may not really occur, or that the PD would stop on that step and would not go further. This would indicate that the RH was rejected since it would not represent an adverse effect. During the generation of the PD, biosafety measures are established, and therefore the RH would have a lower level of exposure.

2) Magnitude of the consequences of exposure

The magnitude of the consequences is established in four levels, ranked in ascending order defined and justified in relation

2) Magnitud de las consecuencias de la exposición

La magnitud de las consecuencias se establece en cuatro niveles ordenados de menor a mayor definidos y justificados en relación con los efectos adversos en escalas de tiempo (t), espacio (e) y reversibilidad (r) sobre los PFE como: Marginal, cuando no hay efecto adverso medible u observable en el periodo dentro del área establecida de liberación y es reversible; Baja, cuando hay cambios que pueden medirse u observarse, estos cambios se presentan en una extensión menor dentro del área establecida de liberación y pueden ser reversibles con acciones mínimas; Media, cuando los efectos adversos son observables o medibles en el siguiente periodo de siembra, dentro del área establecida de liberación y son reversibles mediante la implementación de medidas extremas y costosas y; Mayor, en el que los efectos adversos son observables o medibles en periodos sucesivos de siembra, en un área mayor a la establecida en la liberación (fuera del área definida), y no son reversibles (PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

Etapa 3. Estimación del riesgo

El riesgo es una función de la consecuencia y la exposición. La estimación del riesgo surge de la matriz donde coinciden el binomio de la probabilidad de exposición *vs.* la magnitud de la consecuencia a la exposición para cada HR, dando lugar a la estimación en cuatro niveles: Insignificante, Bajo, Moderado y Alto (PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017; Australian Government. Office of the Gene Technology Regulation, 2013) (Cuadro 1). Si la información disponible establece que el peligro es insignificante o que no habrá exposición, entonces puede concluirse que no es necesario continuar la evaluación de riesgo.

Etapa 4. Medidas de bioseguridad

La seguridad en la liberación al ambiente en etapa experimental de un OGM es un requerimiento que se cumple mediante la implementación de medidas de bioseguridad para desestimar cualquier riesgo. De acuerdo con la LBOGM (2005), las medidas de bioseguridad incluyen acciones y medidas de evaluación, monitoreo, control y prevención que se deben conducir en la realización de actividades con un OGM con el objeto de prevenir, evitar o reducir los riesgos posibles que dichas actividades pudieran ocasionar a la salud humana, al medio ambiente y a la

with the adverse effects in scales of time (t), space (s) and reversibility (r) on the EEPs such as: Marginal, when there is no measurable or observable adverse effect during the period within the established area of release or it is reversible; Low, when there are changes that can be measured or observed. These changes are displayed in a lower extension within the established area of release and can be reversible with minor actions. It is considered Medium when the adverse effects are observable or measurable in the following sowing season, within the established area of release, and they are reversible by implementing extreme and costly measures; and Major when the adverse effects are observable or measurable in successive sowing seasons and in an area larger than that established for release (out of the area), and they are not reversible (PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

Stage 3. Risk estimation

Risk is based on consequence and exposure. Risk estimation arises from the matrix in which the binomial of the probability of exposure coincides with the magnitude of the consequence of the exposure for each RH, risk estimation may be defined in four levels: Negligible, Low, Moderate and High (PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017; Australian Government. Office of the Gene Technology Regulation, 2013) (Table 1). If the available information establishes that the danger is negligible, or that there will be no risk exposure, it can be concluded that continuing the risk assessment is unnecessary.

Stage 4. Biosafety measures

The safety in the environmental release in the experimental stage of a GMO is a requirement fulfilled with the implementation of biosafety measures to disregard any risk. According to the LBOGM (2005), biosafety measures include actions and measures for the evaluation, monitoring, control and prevention that must be conducted when performing activities with GMOs, in order to prevent, avoid or reduce possible risks that such activities may pose to human health, the environment and the biological diversity. Once the characterization analysis and risk estimation processes are completed and establish that the risk level is still manageable with biosafety measures, only then can measures related to further reducing the danger of exposure or consequences be set forth (Paes de Andrade and Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

Cuadro 1. Plantilla de la matriz de evaluación y caracterización de cada riesgo constituido a través del cruce de valoraciones en las escalas relativas de Magnitud de las consecuencias *vs.* Probabilidad de exposición.

Table 1. Template of the evaluation matrix and characterization of every risk posed by the crossing of qualification in the relative magnitude scales of consequences *vs.* probability of exposure.

Exposición \ Consecuencias	Marginal	Bajo	Medio	Mayor
Muy posible	Bajo	Moderado	Alto	Alto
Posible	Bajo	Bajo	Moderado	Alto
Poco Posible	Insignificante	Bajo	Moderado	Moderado
Muy poco posible	Insignificante	Insignificante	Bajo	Moderado

Fuente: PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017; Australian Government. Office of the Gene Technology Regulation, 2013. ♦ Source: PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017; Australian Government. Office of the Gene Technology Regulation, 2013.

diversidad biológica. Una vez realizado el análisis de caracterización y estimación del riesgo, donde se establece que el nivel del riesgo es aún manejable a través de medidas de bioseguridad, entonces se plantean medidas asociadas a reducir aún más el peligro de exposición o sus consecuencias (Paes de Andrade y Parrott, 2012; Caballero *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2014; PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2015, 2017).

RESULTADOS

Etapas 2. Caracterización del riesgo

La caracterización del riesgo se definió en la ruta al daño (RD) para cada una de las nueve hipótesis de riesgo (HR) obtenidas en la Etapa 1 (primer documento). La RD estima la probabilidad de exposición y las consecuencias potenciales si los posibles riesgos ocurrieran realmente. Cada HR se sometió a escrutinio a través de la RD para determinar la probabilidad de ocurrencia en cada uno de los pasos sucesivos que se identificaron para llegar al daño probable.

HR 1. La expresión constitutiva de *pdf1.2* en frijol causa resistencia en los hongos patógenos

La RD de la primera hipótesis de riesgo inicia al establecer que la defensina se expresa de manera constitutiva en los tejidos de la planta por ser el objetivo del modelo biotecnológico. El gen *pdf1.2* insertado en el genoma del frijol, se expresa a través del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) en los tejidos de la planta durante todas sus etapas fenológicas. Evidencias científicas confirman la eficacia biológica de diferentes defensinas recombinantes que entran en contacto con el

RESULTS

Stage 2. Risk characterization

The risk characterization was defined in the path to damage (PD) for each one of the nine risk hypotheses (RH) obtained in Stage 1 (published in our former document). The PD estimates the probability of exposure and the potential consequences if the damages would actually occur. Each RH was scrutinized through the PD to determine the probability of occurrence in each successive step described onto the path to reach probable damage.

HR 1. The constitutive expression of *pdf1.2* in common bean causes resistance on pathogenic fungi

The PD of the first Risk Hypothesis begins when we establish that defensin expresses itself structurally as part of the plant tissues, because that is the aim of the biotechnology model. The *pdf1.2* gene, inserted in the common bean genome, is expressed through the constitutive 35S promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) in the plant tissues during all along bean phenological stages. Scientific evidence confirms the biological efficiency of different recombinant defensins establishing contact with phytopathogenic fungi and conferring resistance; some examples include yeast (Almeida *et al.*, 2001); potato (Gao *et al.*, 2000); canola and tomato (Parashina *et al.*, 2000); tobacco and peanut (Anuradha *et al.*, 2008); rice (Jha and Chattoo, 2010); tomato (Abdallah *et al.*, 2010) and common bean (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). Due to the biocidal effect, we suggest

hongo fitopatógeno confiriendo resistencia; algunos ejemplos incluyen levadura (Almeida *et al.*, 2001); papa (Gao *et al.*, 2000); canola y tomate (Parashina *et al.*, 2000); tabaco y maní (Anuradha *et al.*, 2008); arroz (Jha y Chattoo, 2010); tomate (Abdallah *et al.*, 2010) y frijol (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). Debido al efecto biocida, se plantea la posibilidad de que los hongos fitopatógenos pudieran desarrollar resistencia hacia la defensina. Aunque, esto es poco posible ya que PDF1.2 es una proteína de amplio espectro que sigue una estrategia multidimensional contra la invasión patogénica, de manera que varias funciones complementan su acción antimicrobiana, y evitan presiones selectivas sobre los microorganismos (Lai y Gallo, 2009; Zasloff, 2002). Además, las defensinas como muchas proteínas antimicrobianas han mostrado su participación en la expresión o alerta, movilización y amplificación de la respuesta inmune adaptativa de la planta huésped, al conferir regulación a nivel transcripcional y *post* transcripcional y con ello, establecer un mecanismo de protección más allá de la acción de la defensina como disruptor en la membrana lipídica de los microorganismos (Lai y Gallo, 2009). Por lo anterior, la posibilidad de que se desarrollen cepas de hongos fitopatógenos resistentes hacia las plantas del frijol-*pdf1.2* dentro del agroecosistema experimental es baja (Figura 1).

HR 2. La proteína PDF1.2 expresada en los tejidos del frijol afectará a hongos benéficos en el agroecosistema experimental, con pérdida de biodiversidad y limitación de su efecto benéfico.

La proteína PDF1.2 se expresa de manera constitutiva por el promotor CaMV 35S. La proteína tiene contacto con microorganismos que ingresan a la planta y se ubican en los espacios intra e intercelulares, entre ellos hongos benéficos tipo antagonista o bioinoculantes. Harrison (1999) mencionó que los hongos benéficos existen en los ecosistemas en todo el mundo y crean un vínculo íntimo entre las plantas y la rizósfera. La proteína PDF1.2 tiene la especialidad funcional de inhibir hongos; sin embargo, su efecto en hongos antagonistas o benéficos es poco probable si el proceso de colonización no coincide.

Turrini *et al.* (2004b) analizaron el efecto de la proteína defensina sobre organismos benéficos, e indicaron que no existieron diferencias en el crecimiento micelial entre el cultivo modificado con defensina

the possibility that the phytopathogenic fungi could develop resistance towards the defensin. However, this is unlikely, since PDF1.2 is a wide-range protein that follows a multidimensional strategy against the pathogenic invasion, therefore several functions complement its antimicrobial action, avoiding selective pressures on the microorganisms (Lai and Gallo, 2009; Zasloff, 2002). In addition, defensins, like many other antimicrobial proteins, have shown their participation in the expression or alerting, mobilization and amplification of the adaptive immune response of the host plant, conferring regulation at a transcriptional and post transcriptional level, therefore establishing a protection mechanism beyond the action of the defensin as a disruptor of the lipid membrane of the microorganisms (Lai and Gallo, 2009). Due to this, the possibility of strains of phytopathogenic fungi developing resistance to the common bean-*pdf1.2* plants inside the experimental agroecosystem is low (Figure 1).

HR 2. The protein PDF1.2 expressed in common bean tissues will affect beneficial fungi in the experimental agroecosystem, leading to losses in biodiversity and limiting their beneficial effect.

PDF1.2 protein expresses itself constitutively through the CaMV 35S promoter. The protein comes into contact with microorganisms that enter the plant and place themselves in the intra and intercellular spaces, including beneficial antagonistic or bioinoculant fungi. Harrison (1999) mentioned that beneficial fungi exist in ecosystems worldwide, creating an intimate link between plants and the rhizosphere. PDF1.2 protein has the functional specialty of inhibiting fungi, although its effect on antagonistic or beneficial fungi is unlikely if the colonization process does not coincide.

Turrini *et al.* (2004b) analyzed the effect of the defensin protein on beneficial organisms, revealing that there are no differences in mycelial growth between the crop modified with defensin *vs.* conventional, in the establishing of their symbiotic relationship. Evidence indicates that the *phyla* Glomeromycota and Basidiomycota gather many symbiotic fungi, including *P. intraradices*, and thus, they could be less susceptible to antimicrobial peptides (Rahnamaeian, 2011). Antimicrobial peptides such as defensin PDF1.2 modulate the immune response in the

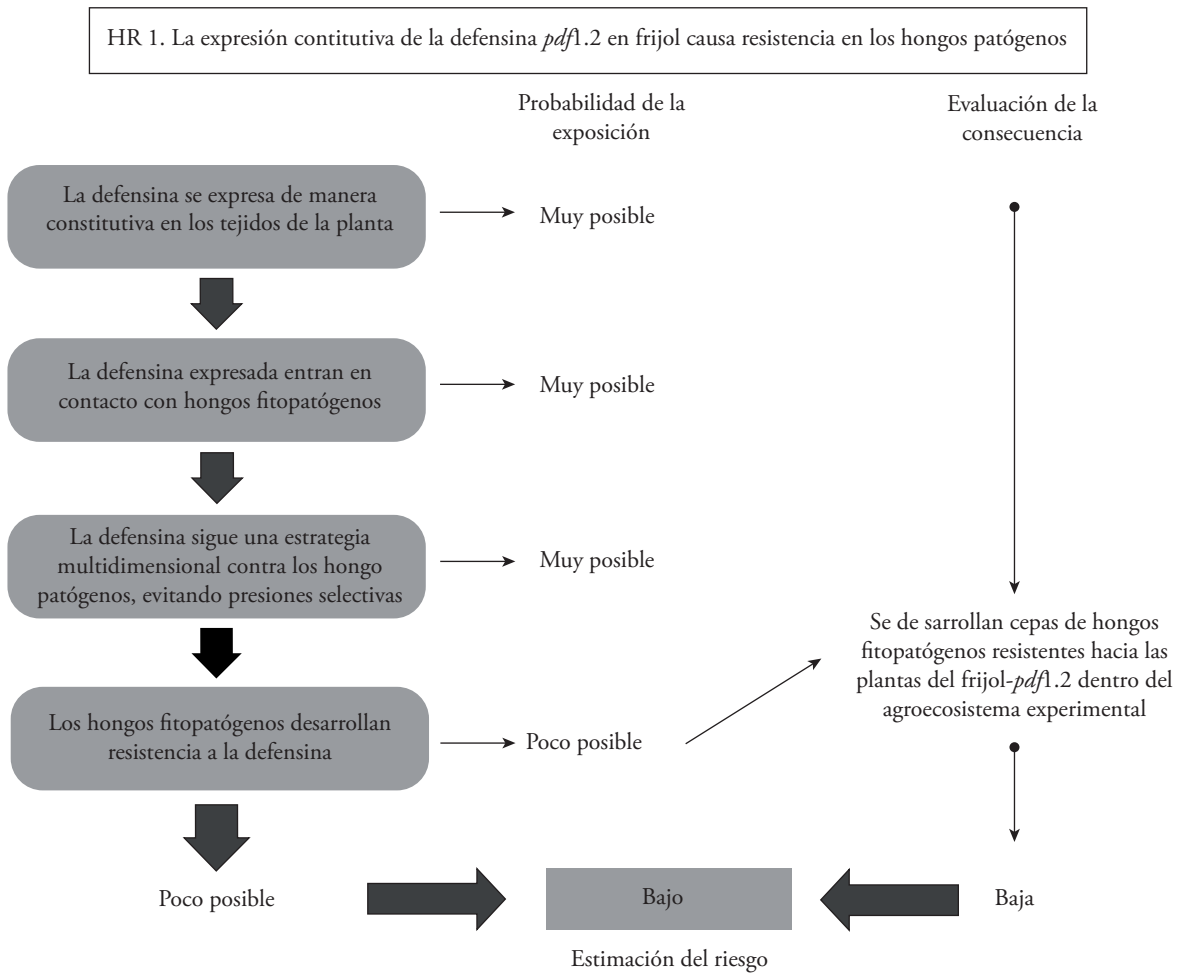


Figura 1. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR1. La expresión constitutiva de *pdf1.2* en frijol causa resistencia en los hongos patógenos.

Figure 1. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH1. The constitutive expression of *pdf1.2* in common bean causes resistance in pathogenic fungi.

vs. convencional, al establecerse la relación simbiótica. La evidencia indica que, los *phyla* Glomeromycota y Basidiomycota reúnen muchos hongos simbióticos, entre ellos *P. intraradices*, y podrían ser menos susceptibles a los péptidos antimicrobianos (Rahnamaeian, 2011). Los péptidos antimicrobianos, como la defensina PDF1.2, modulan la respuesta inmune en el caso de la presencia de organismos benéficos. Plantas de berenjena transformadas con la defensina Dm-AMP1 de *Dahlia merckii* redujeron el crecimiento de *Verticillium albo-atrum* a través de exudados de la raíz, mientras que no interfirieron con las respuestas de reconocimiento, establecimiento y simbiosis del hongo micorrízico arbuscular *Glomus mossae* (Turrini *et al.*, 2004a). De manera similar, Newhouse *et al.* (2007) señalaron que, en plantas de olmo modificadas con un

presence of beneficial organisms. Eggplant plants transformed with the defensin Dm-AMP1 of *Dahlia merckii* reduced the growth of *Verticillium albo-atrum* through root exudates, yet did not interfere with the responses of recognition, establishment and symbiosis of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae* (Turrini *et al.*, 2004a). Likewise, Newhouse *et al.* (2007) reported that elm plants, modified with a synthetic antimicrobial peptide displayed no differences in the colonization of mycorrhizal fungi between modified and unmodified plants three months after having been transplanted to the field. Mycorrhizal fungi *Rhizophagus intraradices* and *Trichoderma harzianum* interacted with the common bean-*pdf1.2* plants and displayed no significant differences in infection or colonization

péptido antimicrobiano sintético, no se observaron diferencias en la colonización de hongos micorrízicos entre plantas modificadas y no modificadas, después de tres meses de su trasplante a campo. Los hongos micorrízicos *Rhizophagus intraradices* y *Trichoderma harzianum* interaccionaron con las plantas de frijol-*pdf1.2* y no mostraron diferencias significativas en infección y colonización con respecto a las plantas no modificadas (Granados-Vallejo *et al.*, 2019); por lo tanto, el daño a la biodiversidad y a la capacidad de los hongos benéficos para reconocer, sobrevivir, desarrollarse e infectar a las plantas del frijol-*pdf1.2* en el agroecosistema experimental se calificó como bajo (Figura 2).

HR 3. La proteína PDF1.2 reduce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

Las asociaciones entre *Rhizobium intraradices* y las plantas de frijol modificadas con *pdf1.2* tienen la posibilidad de limitar la asociación simbiótica al inhibir la colonización de la bacteria hacia los espacios intercelulares o apoplastos. Sin embargo, esto es poco posible ya que Granados-Vallejo *et al.* (2019) no encontraron diferencias en la habilidad de colonización a través de la formación de nódulos entre las plantas de frijol-*pdf1.2* y las convencionales.

PDF1.2 posee especificidad sobre la pared celular de los hongos por lo que no se percibe la posibilidad de que actúe sobre algún componente bacteriano. Las defensinas aisladas de organismos diferentes a las plantas, tienen efectos inhibitorios en bacterias, como la del tipo 6-cisteína, aislada de insectos (Cornet *et al.*, 1995), o de mejillones (Mitta *et al.*, 2000), las cuales son activas principalmente contra bacterias Gram positivas y solo ocasionalmente contra cepas Gram negativas u hongos; por lo tanto, es poco posible que el componente bacteriano modificara su capacidad nodulante. Bioensayos realizados en condiciones confinadas indicaron una nodulación normal en las líneas de frijol-*pdf1.2*; la densidad de nódulos se mantuvo dentro del intervalo común en frijol (280 a 313 nódulos por planta), y fue similar a las plantas control (Granados-Vallejo *et al.*, 2019). Por esto se concluye que, el riesgo de que las bacterias nodulantes vean afectada su capacidad para sobrevivir y crear nódulos en el frijol-*pdf1.2* dentro del agroecosistema experimental es bajo (Figura 3).

in comparison with non-modified plants (Granados-Vallejo *et al.*, 2019). Therefore, the damage to the biodiversity and the capacity of beneficial fungi to recognize, survive, develop and infect common bean-*pdf1.2* plants in the experimental agroecosystem is low (Figure 2).

HR 3. The protein PDF1.2 reduces the formation of nitrogen-fixing nodules.

The associations between *Rhizobium intraradices* and the common bean plants, modified with *pdf1.2*, can have a limited symbiotic association when inhibiting the colonization of bacteria towards the intercellular spaces, or apoplasts. However, this is unlikely, since Granados-Vallejo *et al.* (2019) found no differences in the ability of colonization through the formation of nodules between common bean-*pdf1.2* plants and conventional plants.

PDF1.2 has specificity on the cell walls of fungi, and therefore no possibility is observed of the protein acting on any bacterial component. The isolated defensins of organisms different to plants have inhibiting effects on bacteria, such as type 6-cysteine, isolated from insects (Cornet *et al.*, 1995), or mussels (Mitta *et al.*, 2000). Those defensins are mainly active against Gram-positive bacteria, and only occasionally against Gram-negative strains or fungi, and therefore it is unlikely that the bacterial component modifies its nodulation ability. Bioassays carried out under confined conditions indicated a normal nodulation on common bean-*pdf1.2* lines. Nodules density remained within the range reported for bean (280 to 313 nodules per plant), and similar to control plants (Granados-Vallejo *et al.*, 2019). Thus, we concluded that there is a low possibility of nodulation bacteria might be affected in their ability to survive and creating nodules in common bean -*pdf1.2* in the experimental agroecosystem (Figure 3).

HR 4. The increase in the capability to store zinc by effect of the expression of *pdf1.2* becomes toxic for the organisms establishing contact with the gene inside the experimental agroecosystem

The *A. thaliana* plants modified with the specific gene *35SCaMV:AhPDF1.1* of *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* displayed a higher tolerance to Zn than

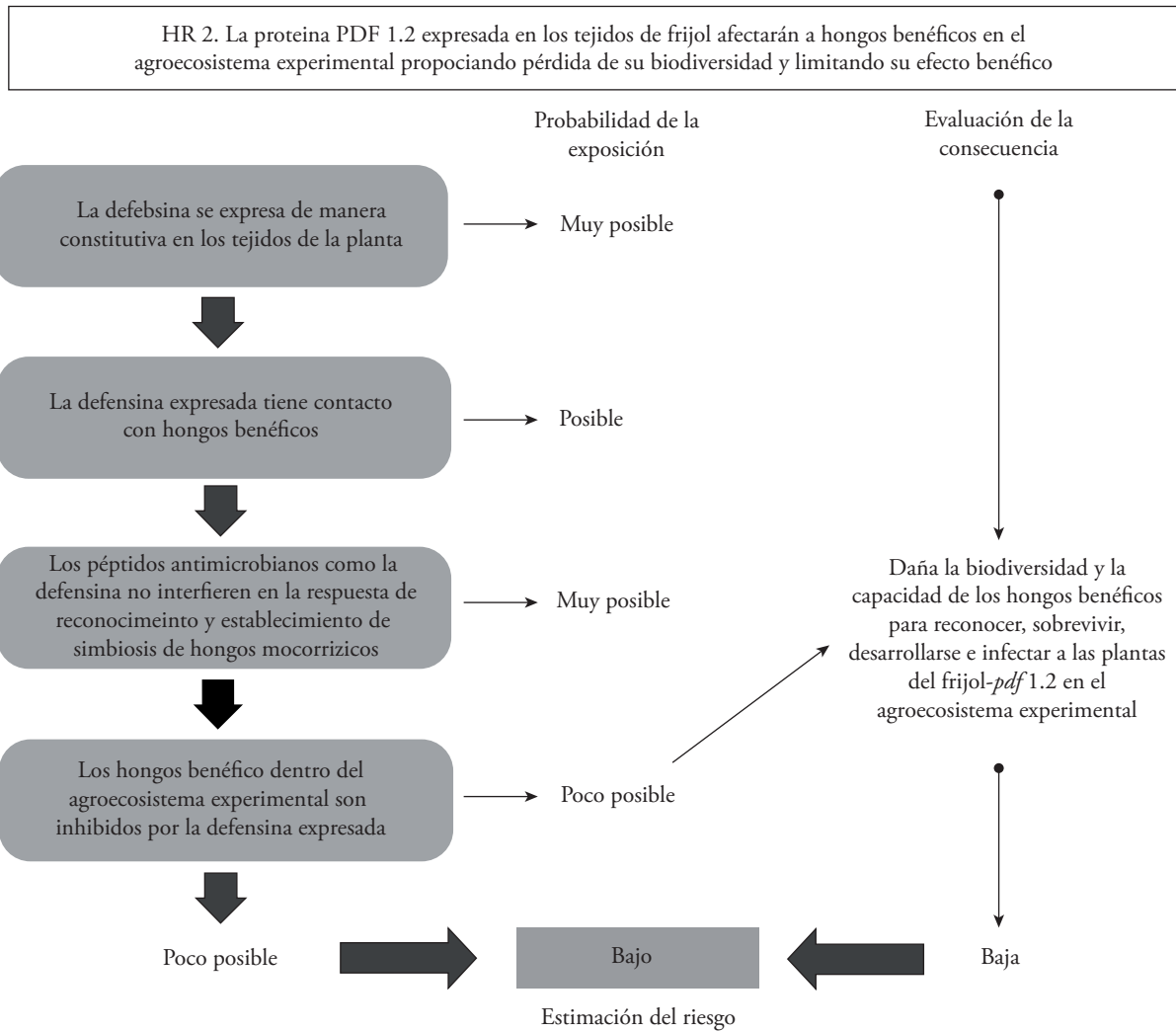


Figura 2. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño, y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR2. La proteína PDF1.2 expresada en los tejidos del frijol, afectará a hongos benéficos en el agroecosistema experimental, al propiciar pérdida de biodiversidad y limitación de su efecto benéfico.

Figure 2. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH2. Protein PDF1.2 expressed in the common bean tissues will affect beneficial fungi in the experimental agroecosystem, leading to the loss of its biodiversity and its beneficial effect.

HR 4. El aumento en la capacidad de almacenamiento de zinc, por efecto de expresión de *pdf1.2* se torna tóxico para los organismos que se encuentran en contacto con él dentro del agroecosistema experimental

Las plantas modificadas de *A. thaliana* con el gen específico *35SCaMV:AhPDF1.1* de *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri*, mostraron tolerancia mayor al Zn que las plantas convencionales de *A. thaliana*; sin embargo, esta tolerancia no provocó una hiper acumulación

convencional *A. thaliana* plants. However, this tolerance did not cause a hyper accumulation of metal in the modified *A. thaliana* plants (De Oliveira and Moreira, 2009; Mirouze *et al.*, 2006). Therefore, it is unlikely that *pdf1.2* promotes the ability of common bean to experiment a hyper accumulation. Without the hyper accumulation of Zn in the common bean-*pdf1.2* it is unlikely that organisms eating any tissue would undergo any adverse effects related to toxicity. In the model evaluated here, no significant differences were found in the content of

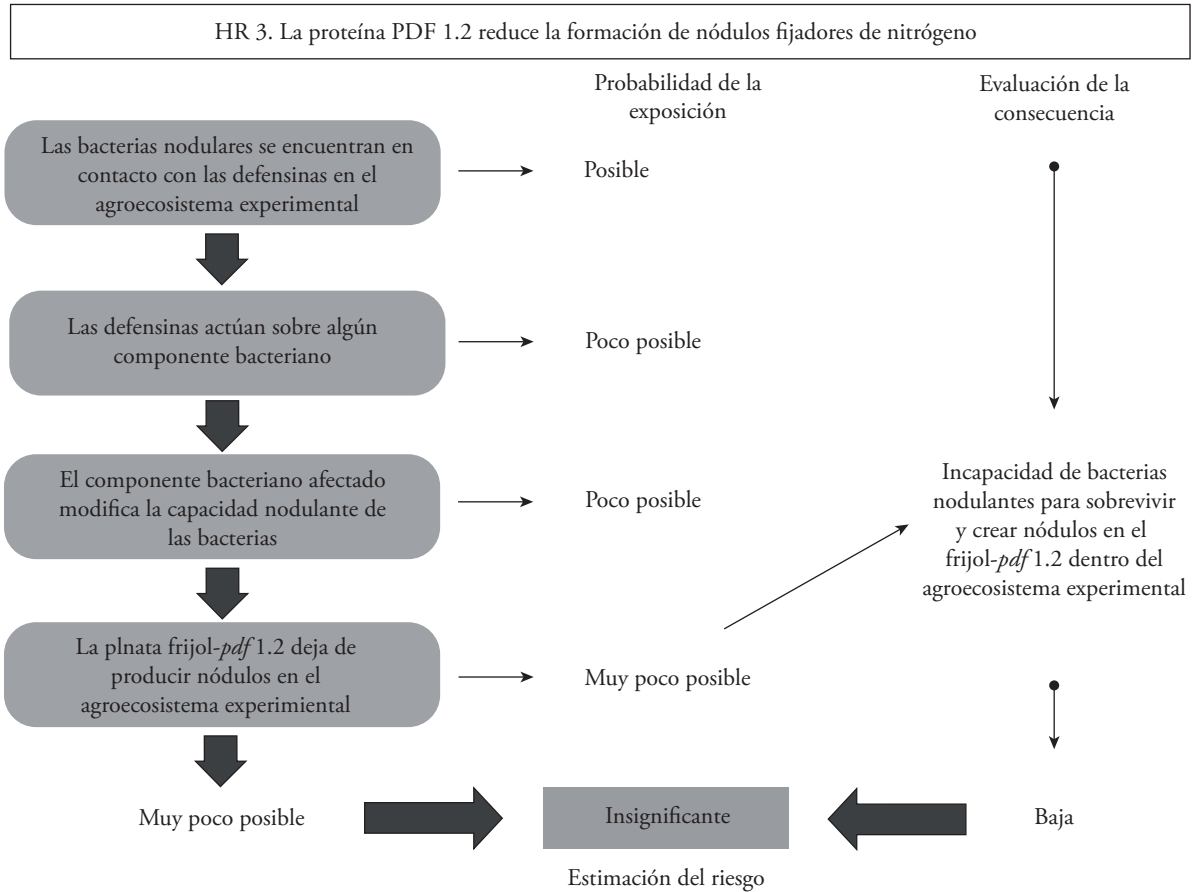


Figura 3. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR3. la proteína PDF1.2 reduce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

Figure 3. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH3. PDF1.2 protein reduces the formation of nitrogen-fixating nodules.

del metal en las plantas modificadas de *A. thaliana* (De Oliveira y Moreira, 2009; Mirouze *et al.*, 2006), por lo cual es poco posible que *pdf1.2* promueva la capacidad del frijol para dar lugar a una hiper acumulación. Al no haber hiper acumulación de Zn en frijol-*pdf1.2* es muy poco posible que los organismos que ingieran algún tejido sufran efectos adversos que indiquen toxicidad. En el modelo aquí evaluado, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de Zn en semilla, frijol-*pdf1.2* (71.7 ± 3.0 ppm) y control (54.8 ± 16 ppm); por tanto, el riesgo de desarrollar susceptibilidad en organismos no-blanco al frijol modificado asociado con la presencia de Zn dentro del agroecosistema experimental, es bajo (Figura 4).

Zn in the seed, common bean-*pdf1.2* (71.7 ± 3.0 ppm) or control (54.8 ± 16 ppm). Therefore, the risk of the development of susceptibility in non-target organisms to the modified common bean, related with the presence of Zn within the experimental agroecosystem, is low (Figure 4).

HR 5. The expression of NPTII protein causes an adverse effect on organisms that interact with the plant, causing allergenicity and toxicity.

The protein neomycin phosphotransferase II (NPTII) is a part of the genetic construction and it is expressed constitutively in the plant as a selection marker (Espínosa-Huerta *et al.*, 2013). Protein NPTII

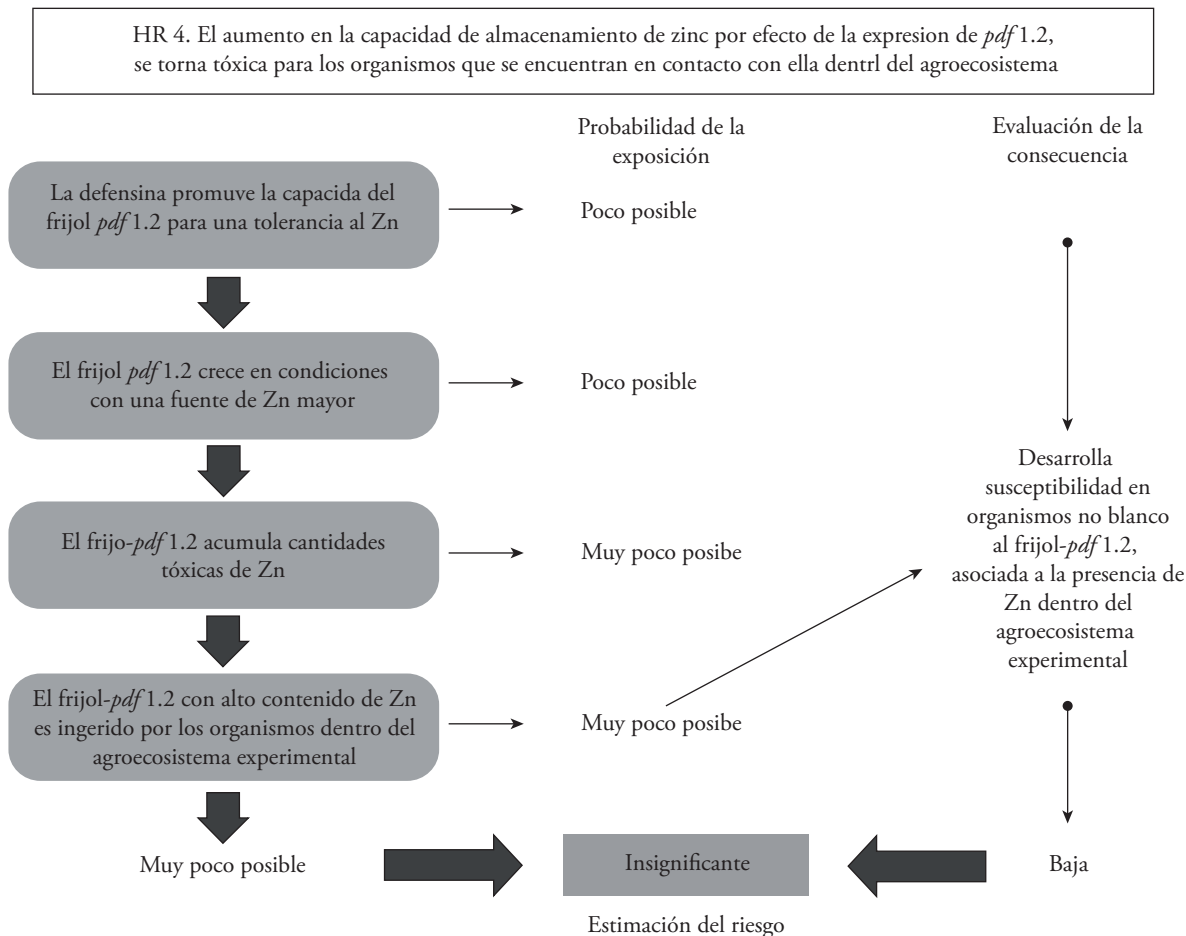


Figura 4. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia, de la hipótesis de riesgo: HR4. El aumento en la capacidad de almacenamiento de zinc por efecto de expresión de *pdf1.2*, se torna tóxico para los organismos que se encuentran en contacto con él dentro del agroecosistema experimental.

Figure 4. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH4. The increase in the capability to store zinc by the effect of the expression of *pdf1.2* becomes toxic for the organisms that come into contact with it inside the experimental agroecosystem.

HR 5. La expresión de la proteína NPTII causa un efecto adverso sobre organismos que interactúan con la planta, lo cual provoca alergenicidad y toxicidad.

La proteína neomicina fosfotransferasa II (NPTII) forma parte de la construcción genética y se expresa en la planta de manera constitutiva como marcador de selección (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). La proteína NPTII confiere resistencia a antibióticos del tipo aminoglicósidos como neomicina, kanamicina y geneticina (G418), los cuales tienen un uso clínico muy limitado y, hasta ahora, no se conoce que la ingesta o exposición a la proteína resulte tóxica o alérgica (Flavell *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1993; EFSA,

confers resistance to aminoglycoside antibiotics such as neomycin, kanamycin and geneticin (G418), which have a very limited clinical use and, to date there is no knowledge of the intake or exposure to the protein being toxic or allergenic (Flavell *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1993; EFSA, 2009). The potential impact on human health and microbial diversity, given the unlikely case of the transfer of the functional gene for resistance to antibiotics to microorganisms, and to the human digestive tract is very low. Mainly because, the *nptII* gene is found naturally in native bacteria from human digestive tract. Therefore, the additive effect of a copy of *nptII* gene from a modified plant to the human gastrointestinal flora would be negligible; in comparison with the naturally kanamycin-resistant

2009). El impacto potencial en la salud humana y diversidad microbiana, en el poco probable evento de transferencia del gen funcional de resistencia a antibióticos a microorganismos y al tracto digestivo humano es muy bajo, ya que el gen *nptII* se encuentra naturalmente en bacterias nativas del tracto digestivo humano, por lo cual el efecto aditivo de una copia del gen *nptII* proveniente de una planta modificada a la flora gastrointestinal humana, sería insignificante comparado con la población y los microorganismos naturalmente resistentes a kanamicina que ya están presentes en el organismo (Australia New Zealand Food Authority, 2001).

La información presentada puede indicar que el riesgo de desarrollo de susceptibilidad de organismos no-blanco, al frijol-*pdf1.2*, asociada con la expresión de la proteína NPTII dentro del agroecosistema experimental es bajo (Figura 5).

HR 6. El frijol-*pdf1.2* es más competitivo debido a la tolerancia a hongos y desplaza al cultivo convencional (CC) o parientes silvestres (PS) del frijol común.

El frijol-*pdf1.2* tendría la posibilidad de desplazar a variedades y parientes silvestres de frijol, y afectar la diversidad genética por efecto de una mayor capacidad de supervivencia ante el ataque de patógenos fúngicos. El polígono de la posible liberación al ambiente del frijol-*pdf1.2* es una zona controlada en la que no se encuentran CC o PS espacial ni temporalmente, por lo que no hay coincidencia en su etapa fenológica de floración, además de su condición de cleistogamia; por lo tanto, el riesgo de generación de híbridos es bajo.

La capacidad de resistencia al ataque de hongos en frijol *pdf1.2* no significa una ventaja sobre los PS o CC de la misma especie o parientes lejanos, ni se puede inferir que resulte en su desplazamiento en el agroecosistema, pues el frijol-*pdf1.2* no posee resistencia absoluta a todos los patógenos ni a estrés abiótico. Variedades de frijol con alguna tolerancia a hongos fitopatógenos han coexistido con otros CC y PS desde hace años sin indicios de un aumento en el potencial competitivo (Vidigal *et al.*, 2007). Además de tratarse de un sistema de cultivo controlado que no pretende tener exposición más allá de su ciclo reproductivo y donde se conducirán medidas de bioseguridad para evitar hibridación con otros genotipos de frijol. Por tanto, el riesgo de desplazamiento de

population which microorganisms were already present in the organism (Australia New Zealand Food Authority, 2001).

The information presented here may indicate that the risk of development of a susceptibility of non-target organisms to common bean-*pdf1.2*, related to the expression of protein NPTII within the experimental agroecosystem is low (Figure 5).

HR 6. The common bean-*pdf1.2* is more competitive due to the tolerance to fungi and it displaces conventional crops (CC) or wild relatives (WR) of the common bean.

The common bean-*pdf1.2* would have the possibility of displacing varieties and wild relatives of common bean, affecting the genetic diversity by the effect of a higher capacity of survival to an attack of fungal pathogens. The polygon of the possible environmental release of common bean-*pdf1.2* is a controlled area where no CC or WR are found, spatially or temporally. Therefore, there is no coincidence in phenological or flowering stages, along with cleistogamy. Thus, the possibility of hybrids generation is low.

The capacity of resistance to the attack of fungi in common bean-*pdf1.2* is not an advantage over WR or CC of the same species or distant relatives. Neither it can be inferred that this resistance leads to their displacement in the agroecosystem, since common bean-*pdf1.2* does not pose absolute resistance to all pathogens nor abiotic stress. Common bean varieties with some tolerance to phytopathogens have coexisted with other CC and WR for many years, showing no signs of an increase in the competitive potential (Vidigal *et al.*, 2007). Also, the plantation is a controlled environment intended to allow no exposure beyond the reproductive cycle; biosafety measures are taken to avoid hybridation with other bean genotypes. Therefore, the risk of displacement of WR and CC caused by the competitiveness of the common bean-*pdf1.2* within the experimental agroecosystem in which they are distributed is low (Figure 6).

HR 7. The expression of PDF1.2 increases the weed-like competitive ability of the common bean-*pdf1.2*.

The possibility that the common bean-*pdf1.2* develops high competitiveness abilities, and with it, a

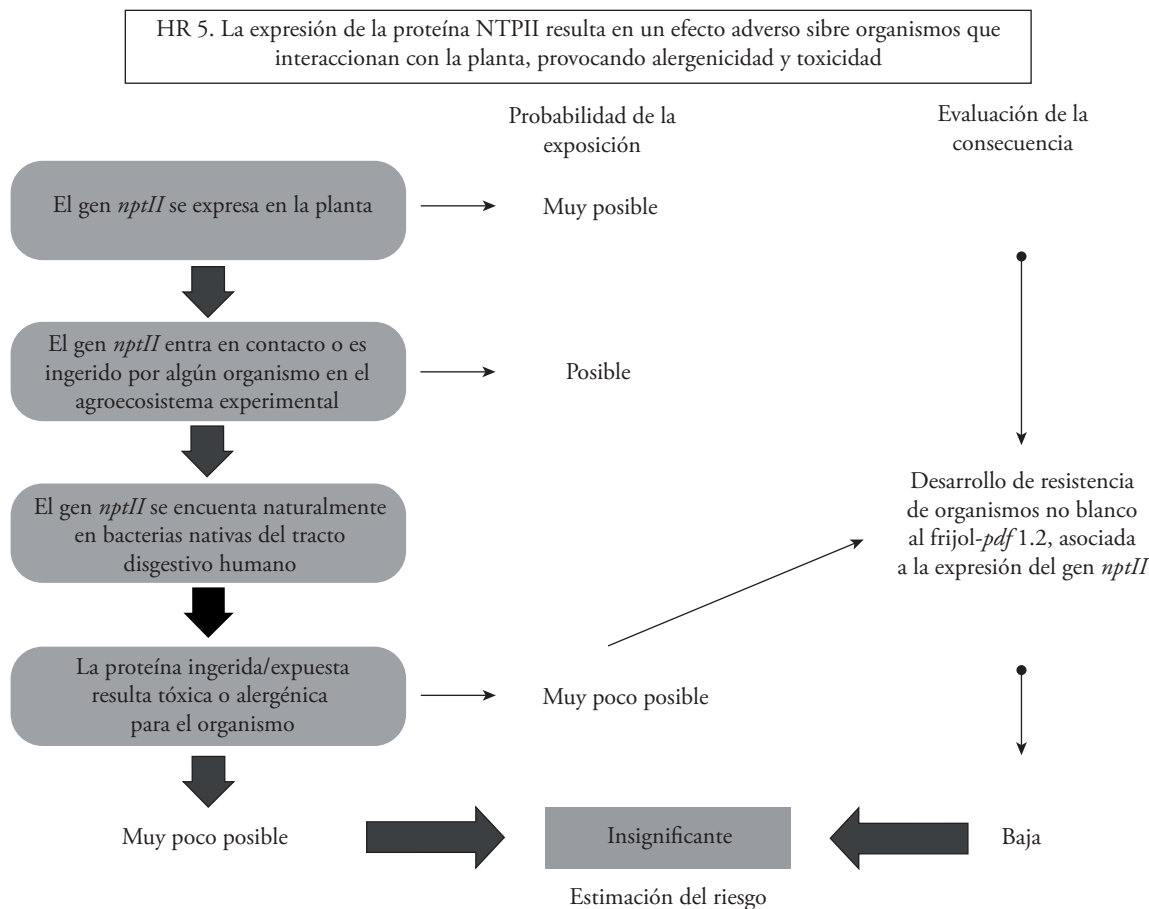


Figura 5. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR5. La expresión de la proteína NPTII causa un efecto adverso sobre organismos que interactúan con la planta, lo cual provoca alergenicidad y toxicidad.

Figure 5. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH5. The expression of NPTII protein results in an adverse effect on organisms that interact with the plant, causing allergenicity and toxicity.

PS y CC ocasionado por la competitividad del frijol-*pdf1.2* dentro del agroecosistema experimental donde se distribuyen éstos, es bajo (Figura 6).

HR 7. La expresión de PDF1.2 aumenta la capacidad competitiva tipo maleza del frijol-*pdf1.2*.

La posibilidad de que el frijol-*pdf1.2* desarrolle capacidades de alta competitividad y con ello mayor supervivencia en condiciones adversas, es muy baja porque las características de reproducción y dehiscencia no son parte de este modelo biotecnológico. La modificación genética con el gen *pdf1.2* no otorga propiedades de supervivencia que favorezcan

higher survival rate in adverse conditions, is very low, since its reproduction and dehiscence characteristics are not part of this biotechnology model. The genetic modification with *pdf1.2* gene provides no survival properties which favor the weed-like bean behavior. The trait of wide-spectrum tolerance against phytopathogenic fungi provides no advantages or reproductive changes in the agroecological surroundings.

The genetic background that was genetically modified (cv. Flor de Mayo Anita) has no features related with those of weeds such as reproductive advantages, a higher vegetative development, high capacity for dispersal, among others (Acosta-Gallegos,

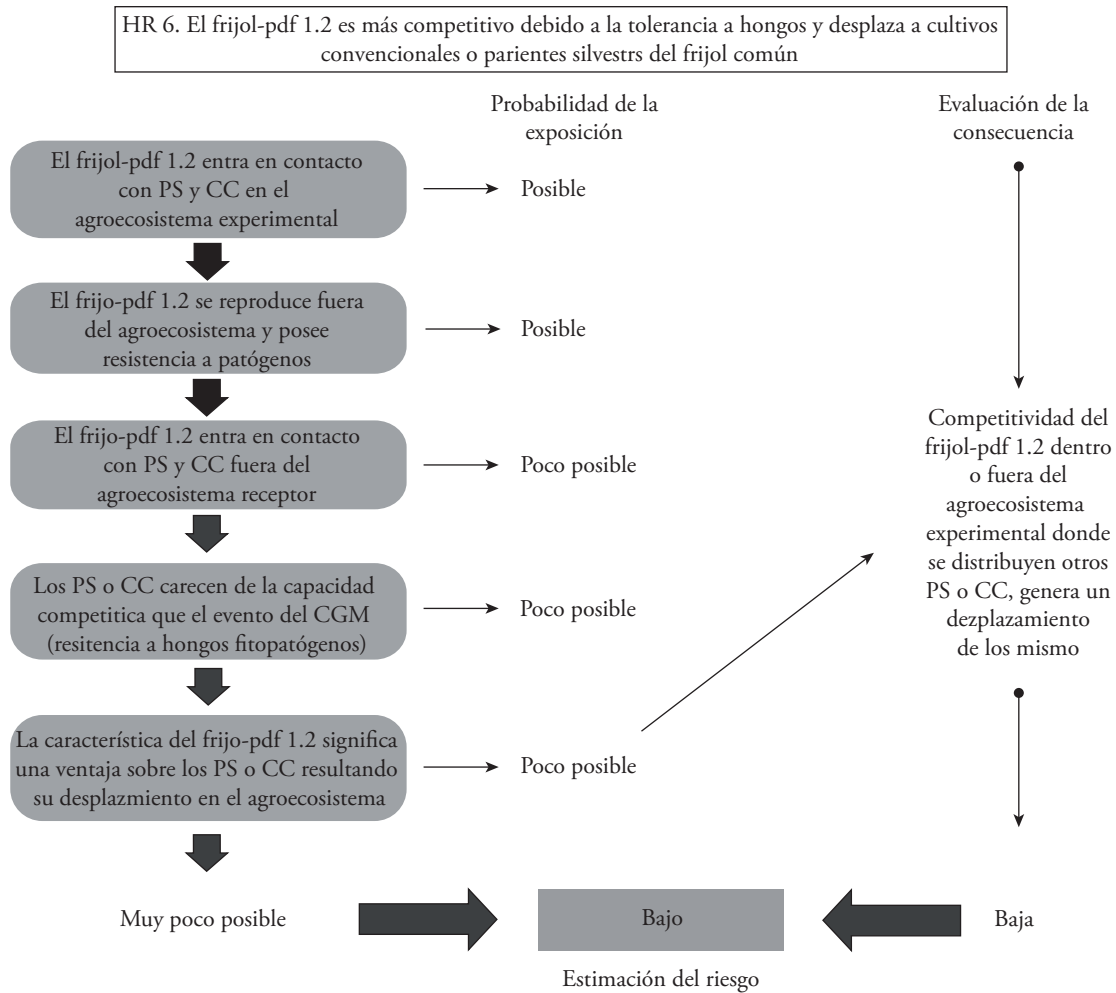


Figura 6. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR6. El frijol-*pdf1.2* es más competitivo debido a la tolerancia a hongos y desplaza al cultivo convencional (CC) o parientes silvestres (PS) del frijol común.

Figure 6. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH6. The common bean-*pdf1.2* is more competitive due to its tolerance to fungi and it displaces conventional crops (CC) or wild relatives (WR) of the common bean.

el comportamiento del frijol tipo de maleza pues la característica de tolerancia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos no proporciona ventajas o cambios reproductivos en el entorno agroecológico.

El fondo genético que se modificó genéticamente (cv. Flor de Mayo Anita) no tiene características asociadas a las de una maleza como ventajas reproductivas, desarrollo vegetativo mayor, gran capacidad de dispersión, entre otras (Acosta-Gallegos, 2012); por lo tanto, el riesgo de un decremento en la efectividad de las estrategias de control de malezas dentro del agroecosistema experimental, es bajo (Figura 7).

2012). Therefore, the possibility of a decrease in the effectiveness of the weed control strategies within the experimental agroecosystem is low (Figure 7).

HR 8. The gene flow of common bean-*pdf1.2* towards CC and WR affects genetic diversity.

The possibility of gene flow between common bean-*pdf1.2* and CC or WR is very unlikely, possibly due to several factors: the release into the environment can be delayed approximately three weeks after the recommended planting dates in order to avoid the

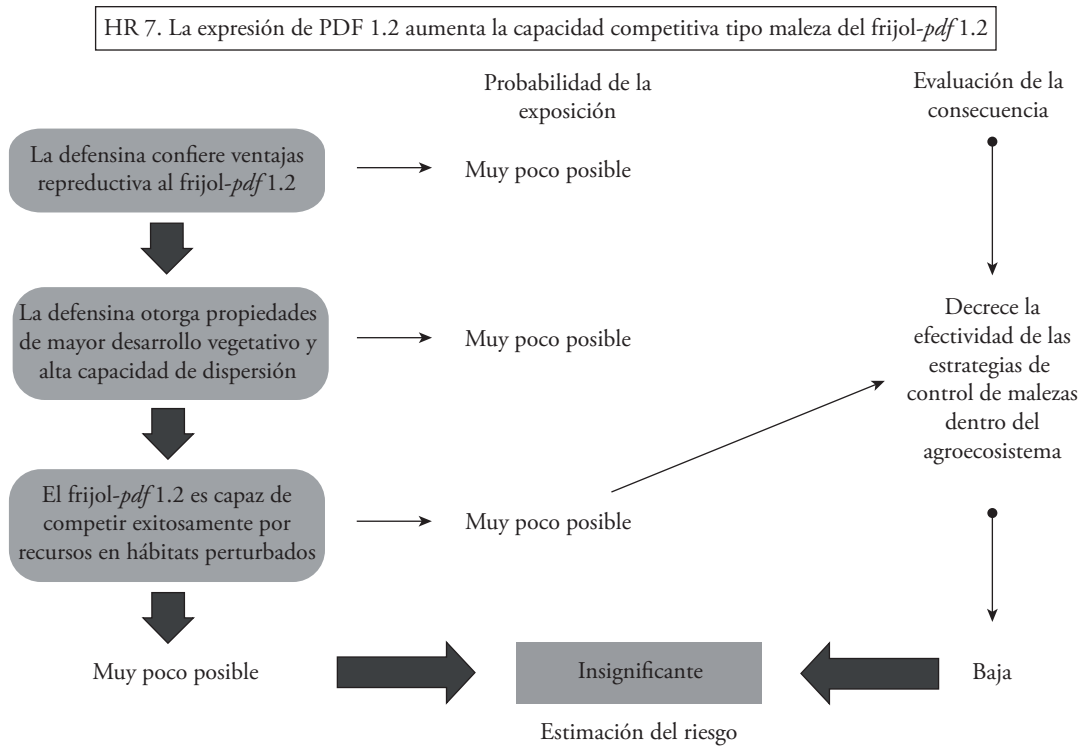


Figura 7. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR7. La expresión de PDF1.2 aumenta la capacidad competitiva tipo maleza del frijol-*pdf1.2*.

Figure 7. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH7. The expression of PDF1.2 increases the weed-like competitive ability of common bean-*pdf1.2*.

HR 8. El flujo de genes del frijol-*pdf1.2* hacia CC y PS afecta la diversidad genética.

La posibilidad de que ocurra flujo génico entre el frijol-*pdf1.2* y CC o PS es muy poco probable debido a varios factores: se puede diferir la liberación al ambiente en aproximadamente tres semanas posteriores a las fechas de siembra recomendadas para impedir la coincidencia de la etapa fenológica de floración en el ambiente receptor, por lo que los CC, PS y frijol-*pdf1.2* no podrían en tiempo y espacio; el frijol es predominantemente autógama y de reproducción cleistogámica (Bennett y Leitch, 1997). Aun cuando existiera coincidencia en floración, la tasa de cruzamiento abierta es baja (0-1.4%) (Chaves-Barrantes *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2010). Además, existen barreras genéticas entre *P. vulgaris* (frijol-*pdf1.2*) y PS como *P. coccineus*, *P. acutifolius* y *P. lunatus*, y los híbridos regularmente abortan o bien resultan ser estériles. La tasa máxima de hibridación encontrada es 0.136% a una distancia de 0.5 m, mientras que la tasa natural de

coincidencia de la fenológica floración stage in the receiving environment. Therefore, the CC, WR and common bean-*pdf1.2* could not coincide in time or space. Bean plant is predominantly autogamous and its reproduction is cleistogamic (Bennett y Leitch, 1997). Moreover, even if there was a coincidence in flowering, the rate of open pollination is low (0-1.4%) (Chaves-Barrantes *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2010). Besides, there are genetic barriers between *P. vulgaris* (common bean-*pdf1.2*) and WR such as *P. coccineus*, *P. acutifolius* and *P. lunatus*, and hybrids normally are aborted or sterile. The highest hybridization rate has been reported to be 0.136% at a distance of 0.5 m, whereas the natural hybridization rate drops to zero at a distance beyond 3.25 m (Ferreira *et al.*, 2007). All this suggests that the fixation of the transgene is not feasible, and therefore, there would be no loss in biodiversity in the CC or WR, or dispersal of the recombinant gene. Even when hybridization is successful, the phenotype related to common bean-*pdf1.2* implies no risk at all in terms of displacement.

hibridación es prácticamente cero más allá de 3.25 m (Ferreira *et al.*, 2007). Todo lo anterior sugiere que no es factible la fijación del transgén, por tanto, no habría pérdida de la biodiversidad en los CC o PS, ni dispersión del gen recombinante. Aun cuando la hibridación pudiera ser exitosa, el fenotipo asociado a frijol-*pdf1.2*, no representa riesgo alguno en términos de desplazamiento, por lo que el riesgo de flujo de genes entre el frijol-*pdf1.2* y los CC y PS fuera del agroecosistema experimental pudieran afectar la diversidad, es muy bajo (Figura 8).

Therefore, the risk of gene flow between common bean-*pdf1.2* and the CC and WR outside of the experimental agroecosystem affecting diversity is negligible (Figure 8).

HR 9. The gene flow from common bean-*pdf1.2* to CC and WR varieties could increase the weed-like competitive capability.

Gene flow between common bean-*pdf1.2* and CC or WR, causing a weed-like behavior is unlikely (see

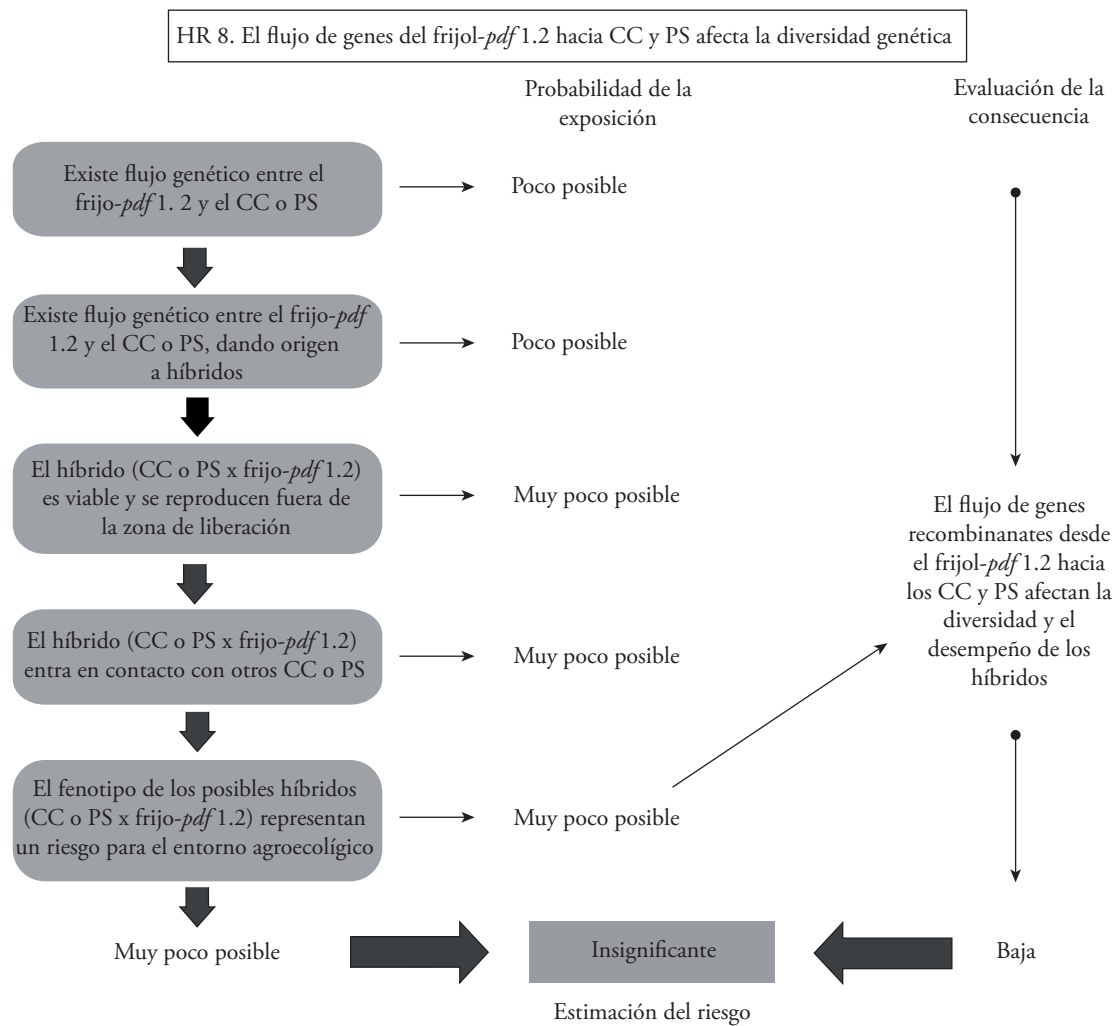


Figura 8. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR8. El flujo de genes del frijol-*pdf1.2* hacia CC y PS afecta la diversidad genética.

Figure 8. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH8. The gene flow of common bean-*pdf1.2* towards CC and WR affects genetic diversity.

HR 9. El flujo de genes del frijol-*pdf1.2* a variedades CC y PS podría incrementar la capacidad competitiva tipo maleza

Es poco posible que ocurra flujo génico entre el frijol-*pdf1.2* y los CC o PS y que ello propicie un comportamiento tipo maleza (ver apartados HR7 y HR8). La formación de híbridos entre el frijol-*pdf1.2* y el frijol convencional tiene pocas posibilidades de ocurrir. Aun cuando ocurriera la generación exitosa de un híbrido, las características de resistencia a hongos fitopatógenos no son determinantes para propiciar una condición de persistencia en el agroecosistema, con el desplazamiento consecuente de otros genotipos y la pérdida de biodiversidad; por lo que el riesgo de que ocurra flujo de genes y se confiera mayor capacidad competitiva en los híbridos es insignificante (Figura 9).

sections HR7 and HR8). The formation of hybrids between common bean-*pdf1.2* and the conventional bean has very few possibilities of occurrence. Even if a hybrid was successfully produced, the characteristics of resistance to phytopathogenic fungi are not determinant to bring about a condition of persistence in the agroecosystem, with consequent displacement of other genotypes and the loss of biodiversity. Therefore, the risk of gene flow taking place, and the resulting transmission of a greater competitive capacity in hybrids is qualified as negligible (Figure 9).

Stage 3. Risk estimation

Following the probability of exposure of each event that forms a part of the PD and the evaluation of the consequences, a risk estimation matrix was established for each HR (Table1) (Figures 1 to 9).

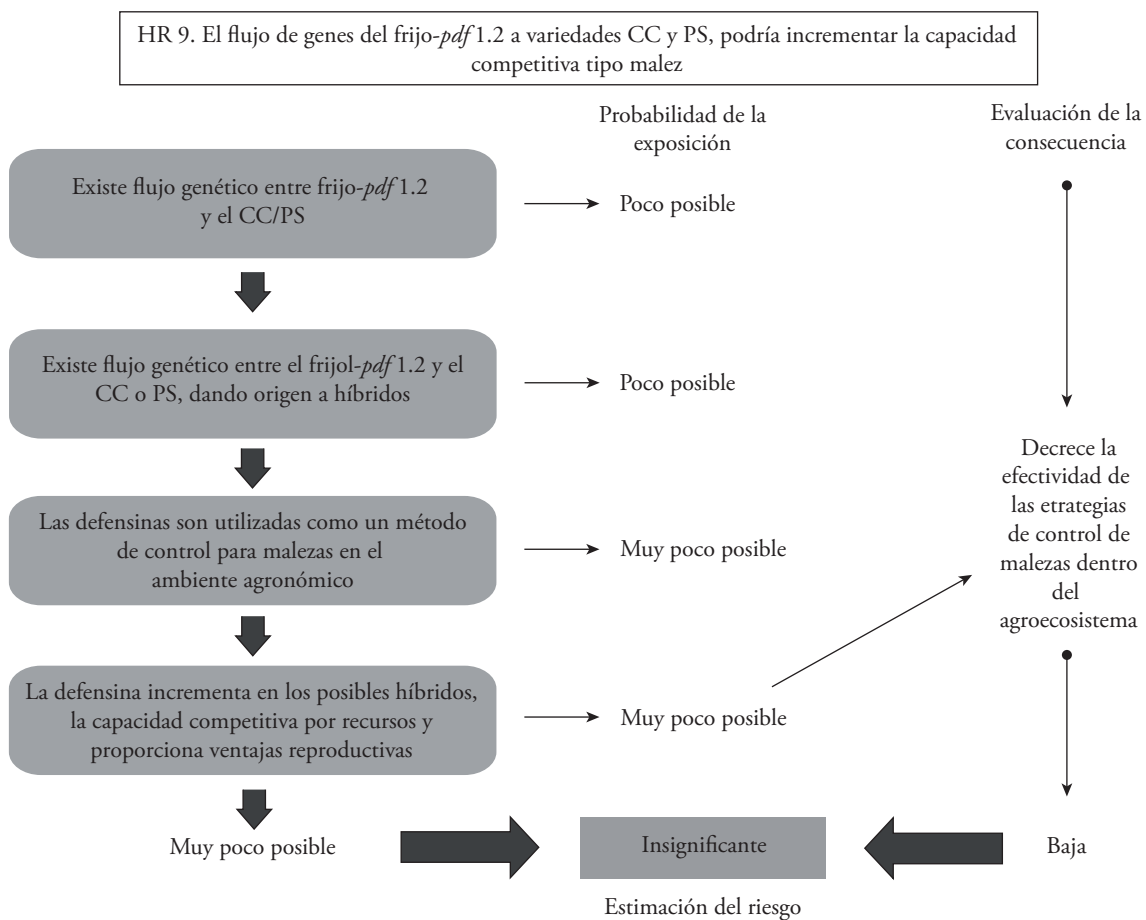


Figura 9. Ruta al daño, probabilidad de la exposición al daño y evaluación de la consecuencia de la hipótesis de riesgo: HR9. El flujo de genes del frijol-*pdf1.2* a variedades CC y PS podría incrementar la capacidad competitiva tipo maleza.

Figure 9. Path to damage, probability of exposure to damage and evaluation of the consequence, from the risk hypothesis: RH9. The gene flow from common bean-*pdf1.2* to CC and WR varieties could increase the weed-like competitive capability.

Etapa 3. Estimación del riesgo

De acuerdo con la probabilidad de exposición de cada evento que forma parte de la RD y la evaluación de las consecuencias, se estableció una matriz de estimación del riesgo para cada HR (Cuadro 1) (Figuras 1 al 9). La comparación de las características fenotípicas observadas y potenciales entre el frijol-*pdf1.2* y el frijol convencional en el ambiente de liberación que se evalúa, establecen que las características no representan un riesgo para el entorno medioambiental y los organismos que en este habitan durante la etapa de exposición, por lo cual la probabilidad de que el riesgo ocurra es muy baja o insignificante. Este nivel de probabilidad de ocurrencia es reducido por las características de incompatibilidad entre parientes silvestres, autopolinización y cleistogamia del frijol, y por la implementación de medidas de bioseguridad como el desfase de las etapas fenológicas entre frijol-*pdf1.2* y el frijol convencional; además de las barreras biológicas como medidas de bioseguridad.

Etapa 4. Medidas de bioseguridad

Derivado de que la evaluación de riesgo, a través del análisis de la RD, indica que el riesgo es bajo a insignificante, las medidas de bioseguridad planteadas para reducir aún más este riesgo, o bien reforzar las condiciones para mantener los niveles bajos de riesgo, están asociadas a las medidas básicas, así como aquellas suscritas directamente a las condiciones imperantes durante la existencia del frijol-*pdf1.2* en el polígono experimental.

La principal medida de bioseguridad inicial es la cadena de custodia de la semilla de frijol-*pdf1.2* en cada etapa del proceso: transporte, siembra, duración del ciclo de vida, cosecha, inactivación de residuos y almacenamiento, a fin de evitar la mezcla accidental entre frijol-*pdf1.2* y frijol convencional, y su posible introgresión a CC o PS.

Las medidas de bioseguridad propuestas para este modelo biotecnológico aseguran el confinamiento de material genético, primordial para evitar el posible flujo de genes dentro o fuera del agroecosistema experimental, a través del establecimiento de un perímetro de barreras biológicas en el polígono de siembra y el desfase fenológico entre el frijol-*pdf1.2* y el frijol convencional. Asimismo, para verificar el control en la dispersión de polen en el entorno de liberación,

The comparison of the potential and observed phenotypical characteristics between common bean-*pdf1.2* and the conventional common bean in the release environment in where evaluation is performed, establish that the characteristics are not a threat for the environmental surroundings. Neither to organisms that live in them during the exposure stage, therefore the probability of damage occurring is very low or negligible. This level of probability of occurrence is low because of the characteristics of incompatibility between wild relatives, self-pollination and the cleistogamy of the bean. Added to the implementation of biosafety measures such as the displacement of phenological stages between common bean-*pdf1.2* and the conventional bean, as well as the biological barriers as biosafety measures.

Stage 4. Biosafety measures

Due to the fact that the risk assessment, through the PD analysis, indicates that risk is low to negligible, the biosafety measures presented to reduce risk even further or reinforce the conditions to keep risk levels low are related with the basic measures. As well as others linked directly to the prevailing conditions of the common bean-*pdf1.2* presence in the experimental polygon.

The main initial biosafety measure is the chain of custody of the common bean-*pdf1.2* seed in each stage of the process: transportation, planting, duration of the life cycle, harvest, inactivation of waste products and storage, in order to avoid an accidental mixture of common bean-*pdf1.2* and conventional bean, and their possible introgresión to CC or WR.

The biosafety measures proposed for this model ensure the confinement of genetic material, key to avoid the possible gene flow inside or outside of the experimental agroecosystem, by establishing a perimeter of biological barriers in the cultivated polygon and the phenological displacement between common bean-*pdf1.2* and the conventional bean. Likewise, in order to verify the control in the pollen dispersal in the environment of release, we recommend periodic monitoring of the areas adjacent to the experimental agroecosystem with pollen traps, and later to check for new voluntary bean plants (detection of possible hybrids) and their molecular analysis in order to proceed with the elimination and remediation procedures.

se recomienda realizar monitoreos periódicos de las zonas colindantes al agroecosistema experimental vía trampas de polen, y después, verificar el establecimiento de plantas voluntarias de frijol (detección de posibles híbridos) y su análisis molecular, para proceder con acciones de eliminación y remediación.

El control de hongos patógenos mutantes resistentes y la posible pérdida de biodiversidad de organismos no-blanco se establecerá mediante un perímetro de plantas refugio (barrera biológica) en el polígono de siembra; así como el monitoreo de microorganismos no-blanco, antes, durante y después del establecimiento del polígono de siembra en el agroecosistema experimental. Esta última práctica trasciende no solo a las liberaciones experimentales sino también comerciales para mantener los niveles de susceptibilidad del organismo blanco y asegurar que el sistema biológico mantiene la presencia de organismos no-blanco y benéficos.

Finalmente, se propone conducir estudios de estimación de riesgo durante la liberación al ambiente en etapa experimental para alimentar el sistema y reunir más evidencias para el caso de tener intenciones de liberación posteriores con este modelo o con otros similares, como: evaluar la concentración de infección de los hongos fitopatógenos analizados y evaluar posibles cambios en virulencia y densidad poblacional, clasificar taxonómica y ecológicamente los organismos no-blanco, antes, durante y después del establecimiento del polígono de siembra en el agroecosistema experimental, evaluar la dispersión y establecimiento de plantas voluntarias de frijol-*pdf1.2*, para valorar su capacidad competitiva como maleza hacia otros genotipos convencionales y, evaluar la tasa de entrecruzamiento y flujo génico, incluyendo los datos de condicionantes del medio ambiente.

CONCLUSIONES

Las características del modelo biotecnológico, frijol-*pdf1.2* que manifiesta el fenotipo de resistencia de amplio espectro a hongos fitopatógenos permitieron formular el análisis de la probabilidad y la evaluación de la consecuencia estimados en una ruta al daño con nueve hipótesis de riesgo. La estimación del riesgo resultante permitió concluir una probabilidad muy baja o insignificante de que los riesgos hipotéticos ocurran.

The control of resistant mutant pathogenic fungi and the possible loss of the biodiversity of non-target organisms will be established with a perimeter of refuge plants (biological barrier) in the cultivated polygon, as well as the monitoring of non-target microorganisms before, during and after establishing the cultivated polygon in the experimental agroecosystem. The latter practice transcends, not only the experimental releases, but also commercial releases to maintain the levels of target organisms, ensuring that the biological system preserves non-target and beneficial organisms.

Finally, we propose to conduct risk estimation studies during the environmental release in the experimental stage to feed the system and gather further evidence for later intentions of releases with this model or with similar ones. Studies such as, evaluating the concentration of infection of the phytopathogenic fungi analyzed and evaluating possible changes in virulence and population density; classifying non-target organisms taxonomically and ecologically before, during and after establishing the cultivated polygon in the experimental agroecosystem; evaluating the dispersion and establishment of voluntary common bean-*pdf1.2* plants to value their competitive capacity as weeds to other conventional genotypes; and evaluation of the rate of cross-breeding and gene flow, including the data of environmental conditions.

CONCLUSIONS

The characteristics of the biotechnology model common bean-*pdf1.2* that manifests the phenotype of resistance to a wide range of phytopathogenic fungi, helped formulating the probability analyses and the evaluation of estimated consequences in the PD for nine RH. The resulting risk estimation helped to reach a conclusion of a very low or negligible probability of a hypothetical risk occur.

The common bean-*pdf1.2* expressed by the defensin protein is not a risk for the diversity of *Phaseolus* spp. or other organisms which are not a target of control. Neither it represents threat in a change of competition under a hypothetical introgression between compatible species. The constitutive expression of *pdf1.2* gene, and *nptII* selection gene, do not establish risk of toxicity

El frijol-*pdf1.2* que expresa la proteína defensina, no constituye un riesgo a la diversidad de *Phaseolus* spp. o de organismos que no son objetivo de control, ni representa amenaza en un cambio de competencia bajo una introgresión hipotética entre especies compatibles. La expresión constitutiva del gen *pdf1.2* y el gen de selección *nptII* no establecen un riesgo de toxicidad bajo los antecedentes de la secuencia empleada.

La condición autógena y de cleistogamia del frijol, sumadas a un manejo agronómico eficiente y las medidas de bioseguridad reducirían los riesgos de un flujo génico durante la liberación en etapa experimental. Incluso cuando se prevé la posibilidad de flujo génico en sistemas de producción de tipo comercial, porque algunas de las medidas de bioseguridad no sean aplicables, se puede confiar en que la característica de resistencia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos que proporciona el gen *pdf1.2*, representa un riesgo insignificante al no estar vinculada con ningún rasgo que proporcione ventajas biológicas, reproductivas o de amenaza a otros organismos por contacto o ingesta.

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.
- Acosta-Gallegos J. A. 2012. Los frijoles silvestres *Phaseolus* spp. en el estado de Guanajuato. *In: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) (ed). La biodiversidad en Guanajuato: estudio de estado - Instituto de Ecología del estado de Guanajuato (IEE). México, D.F. vol. II 350-353 pp.*
- 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.
- Australia New Zealand Food Authority. 2001. Food Derived From Insect Protected (NEW LEAF®) Potato Lines BT-06, ATBT04-06, ATBT04-31, ATBT04-36, AND SPBT02-05. A Safety Assessment Technical Report Series No. 11, 34 p.
- Australian Government. Office of the Gene Technology Regulator. 2015. Risk Analysis Framework. Commonwealth of Australia 2013. Canberra, Australia.
- Bennett M. D., and I. J. Leitch. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms—583 new estimates. *Ann. Bot.* 80: 169-196.
- according to previous experiences with the sequences used.
- The autogamous and cleistogamous condition of the common bean, along with an efficient agronomic management and biosafety measures would reduce the risks of a gene flow during the environmental release in experimental stage. Even when gene flow is predictable in commercial production systems, because some biosafety measures were not applied, there is reliability that the resistance to a wide spectrum of phytopathogenic fungi provided by *pdf1.2* gene is an insignificant risk. Because it is not linked to any traits providing biological or reproductive advantages or threatening other organisms by contact or consumption.
- End of the English version—
- *---
- 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.
- Chaves-Barrantes, N., R. Araya-Villalobos, and D. Debouck. 2009. Flujo de genes entre frijol común y silvestre en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 20: 237-244.
- Cornet B., J. M. Bonmatin, C. Hetru, J. A. Hoffmann, M. Ptak, and F. Vovelle. 1995. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* 3: 435-448.
- De Oliveira C., A., and V. Moreira G. 2009. Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30: 1007-1020.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. Scientific opinion of the GMO and BIOHAZ. Panels on the Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. 1034:1-82.
- Espinosa-Huerta E., A. Quintero-Jiménez, B. M. Sánchez-García, J. A. Acosta-Gallegos, and M. A. Mora-Avilés. 2013. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in transgenic common bean expressing an *Arabidopsis thaliana* defensin gene. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 4:1027-1042.
- Faria J. C., G. E. S. Carneiro, and F. J. L. Aragao. 2010. Gene flow from transgenic common beans expressing the bar gene. *GM Crops* 1: 94-98.
- 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.
- Flavell R. B., E. Dart, R. L. Fuchs, and R. T. Fraley. 1992. Selectable marker genes: safe for plants? *Nature Biotech.* 10: 141-144.

- Fuchs R. L., J. E. Ream, B. G. Hammond, M. W. Naylor, R. M. Leimgruber, and S. A. Berberich. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio Technology* 11: 1543-1547.
- 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., E. Jacobs, A. Raybould, T. E. Nickson, P. Sowig, H. Willekens, P. Van Der Kouwe, R. Layton, F. Amijee, A. M. Fuentes and F. Tencalla. 2006. A tiered system for assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. *Environ. Biosafety Res.* 5: 57-65.
- 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.
- Granados-Vallejo M., Grageda-Cabrera O. A., Sánchez-García B. M., y Mora-Avilés M. A. 2019. Efecto de la defensiva recombinante (*pdf1.2*) sobre microorganismos benéficos asociados a frijol genéticamente modificado. *Rev. Fitotec. Mex.* [Aceptado].
- 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.
- Lai Y. and R. L. Gallo. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30: 131-141.
- LBOGM (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados). 2005. Diario Oficial de la Federación. Diario Oficial de la Federación 18 de marzo de 2005.
- Mirouze M., J. Sels, R. Odile, P. Czernic, S. Loubet, A. Jacquier, I. E. J. A. Francois, B. P. A. Cammue, M. Lebrun, P. Barthomieu, and L. Marquez. 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.
- Mitta G., F. Vandenbulcke, F. Hubert, M. Salzter, and P. Roch. 2000. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol Chem.* 275: 12954-12962.
- Newhouse A. E., F. Schrodt, H. Liang, C. A. Maynard, and W. A. Powell. 2007. Transgenic American elm shows reduced Dutch elm disease symptoms and normal mycorrhizal colonization. *Plant Cell Rep.* 26: 977-987.
- 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. Lavorova, V. A. Avetisov, V. G. Lunin, and B. S. Naroditskii. 2000. Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. *Russ. J. Plant Physiol.* 47: 417-423.
- 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. 2017. Diario Oficial de la Federación 3 de enero de 2017.
- Rahnamaeian M. 2011. Antimicrobial peptides. Modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant Signal & Behav* 6: 1325-1332.
- Turrini A., C. Sbrana, L. Pitto, M. Ruffini Castiglione, L. Giorgetti, R. Briganti, T. Bracci, M. Evangelista, M. P. Nuti, and M. Giovannetti. 2004a. The antifungal *Dm*-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 2004. 163: 393-403.
- Turrini A., C. Sbrana, M. P. Nuti, B. M. Pietrangeli, and M. Giovannetti. 2004b. 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.
- Vidigal P. S. F., M. C. Gonçalves-Vidigal, J. D. Kelly, and W. W. Kirk. 2007. Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Paraná, Brazil. *J. Phytopathol.* 155: 108-113.
- Wolt J. D., P. Keese, A. Raybould, J. W. Fitzpatrick, M. Burchik, A. Gray, S. S. Olin, J. Schiemann, M. Sears, and F. Wu. 2010. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transgenic Res.* 19: 425-436.
- Zaslloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870): 389-395.