

SOLICITUD DE PERMISO PARA LIBERACIÓN EXPERIMENTAL AL AMBIENTE DEL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO FRIJOL FMA-pdf1.2-INIFAP EN CAMPOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS EN EL ESTADO DE GUANAJUATO DURANTE EL CICLO AGRÍCOLA PRIMAVERA-VERANO 2014.

I. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DEL PROMOVENTE Y, EN SU CASO, NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL;

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

Representante Legal

Dr. Pedro Brajcich Gallegos

II. DOMICILIO PARA OÍR Y RECIBIR NOTIFICACIONES, ASÍ COMO EL NOMBRE DE LA PERSONA O PERSONAS AUTORIZADAS PARA RECIBIRLAS;

Progreso 5

Barrio Santa Catarina

04010 México, D.F

Personas autorizadas para recibir las notificaciones:

- a) Dra. María Alejandra Mora Avilés
- b) Ing. Francisco Javier Manjarrez Juárez
- c) Dr. Jesús Manuel Arreola Tostado

III. DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO PARA RECIBIR NOTIFICACIONES, EN CASO DE QUE EL PROMOVENTE DESEE SER NOTIFICADO POR ESTE MEDIO;

NOMBRE CARGO Correo electrónico

-Dra. María Alejandra Mora Avilés

Investigador titular

mora.alejandra@inifap.gob.mx

- Ing. Francisco Javier Manjarrez Juárez

Director de la Región Centro

manjarrez.javier@inifap.gob.mx

-Dr. Jesús Manuel Arreola Tostado

Encargado del Despacho de la Coordinación de Investigación, Innovación y Vinculación

arreola.jesus@inifap.gob.mx

IV. MODALIDAD DE LA LIBERACIÓN SOLICITADA Y LAS RAZONES QUE DAN

MOTIVO A LA PETICIÓN;

Con base en los Artículos 32 fracción I, 42 y 43 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (DOF 18-03-2005), y al Título Segundo, Capítulo I, Artículos 5, 6 y 7, y al Capítulo II, Artículo 16, del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

El uso previsto es la liberación experimental al ambiente de un modelo tecnológico de frijol genéticamente modificado denominado FMA-pdf1.2-INIFAP con resistencia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos, **en el Campo Experimental Bajío del INIFAP en el estado de Guanajuato**, durante el ciclo agrícola Primavera-Verano 2014.

La presente solicitud de este modelo tecnológico se realiza con el propósito de analizar la efectividad del evento frijol FMA-pdf1.2-INIFAP en el control de hongos patógenos asociados al cultivo de frijol en México, mediante el establecimiento en campo de parcelas experimentales.

Los objetivos Agronómicos de la liberación experimental son:

- a) Definir el comportamiento o equivalencia agronómica del frijol FMA-pdf1.2-INIFAP vs frijol FMA sin transformar, la meta concreta es caracterizar fenotípicamente las posibles diferencias asociadas a la transformación y expresión del gen pdf1.2 en el genoma del frijol cv. FMA.
- b) Determinar la eficacia biológica del gen pdf1.2 para proveer protección contra hongos de raíz; la meta es responder a la hipótesis de protección de amplio espectro contra hongos patógenos provista por el gen pdf1.2 una vez establecida la resistencia contra los hongos *C. lindemuthianum* (patógeno de la estructura aérea de la planta de frijol), *Rhizoctonia solanii* y *Fusarium lateritium* (patógenos de raíz) en condiciones confinadas.
- c) Comparar los métodos tradicionales para el control de hongos patógenos con un sistema integrado de protección contra hongos patógenos.

Los objetivos Medio Ambientales de la liberación experimental son:

Obtener información relevante sobre los posibles riesgos que la liberación del frijol FMA-pdf1.2-INIFAP pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica mediante:

- a) Generar datos que permitan establecer la equivalencia del frijol FMA-pdf1.2-INIFAP y sus comparadores no modificados en el medio ambiente receptor.
- b) Generar información relativa a la inocuidad del gen defensina sobre microorganismos no blanco.
- c) En base a los análisis de riesgo, corroborar que las medidas de bioseguridad son apropiadas para la liberación de frijol FMA-pdf1.2-INIFAP al ambiente.

Para cumplir con los objetivos, la cantidad de semilla que se necesitará de FMA-pdf1.2-INIFAP será de 225 g \pm 10 g. El cálculo está establecido en base a 8 surcos experimentales que incluirán 30 plantas/surco dando un total de 720 semillas o 225 g (FMA \sim 31 g/100 semillas).

V. SEÑALAR EL ÓRGANO DE LA SECRETARÍA COMPETENTE, AL QUE SE DIRIGE LA SOLICITUD;

Conforme al capítulo I, artículo 3, fracción III de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y del Capítulo único artículo 2, fracción VII. Se dirige esta solicitud a la secretaría(as) competente(s): SAGARPA y SEMARNAT en el ámbito de sus competencias.

VI. LUGAR Y FECHA, Y

México D.F a 2 de abril de 2014.

VII. FIRMA DEL INTERESADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL, O EN SU CASO, HUELLA DIGITAL. EL PROMOVENTE DEBERÁ ADJUNTAR A SU SOLICITUD LOS DOCUMENTOS QUE ACREDITEN SU PERSONALIDAD.

Ver anexo 1, de Representantes Legales el cual contiene los poderes.

ARTÍCULO 16. LA INFORMACIÓN QUE DEBERÁ ADJUNTARSE A LA SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN EXPERIMENTAL DE OGMS DE CONFORMIDAD CON LOS ARTÍCULOS 5, 6 Y 7 DEL PRESENTE REGLAMENTO, SERÁ LA SIGUIENTE:

1 CARACTERIZACIÓN DEL OGM

1.1. Identificador único del evento de transformación

FMA-pdf1.2-INIFAP

1.2. Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México

El frijol es originario de América, donde puede encontrarse diversidad genética amplia en diferentes especies del género *Phaseolus*. En el caso del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es posible encontrar poblaciones silvestres desde el estado de Chihuahua, en México, hasta el norte de Argentina. Los hallazgos arqueológicos y las evidencias científicas demuestran que existen dos centros primarios de domesticación y diversidad genética del frijol común, que son el mesoamericano y el andino (Koenig y Gepts, 1989; Debouck y Smartt, 1995; Payró *et al.*, 2005). Los restos arqueológicos más antiguos de frijol fueron encontrados en la Cueva de Guitarrero en Perú (8000 a 10000 años) y en Tehuacán, Puebla, en México (6000 años a.p.) (Gepts y Debouck, 1991).

México es reconocido como centro primario de domesticación y diversidad genética del frijol (Gepts y Debouck, 1991). En el país se conoce como frijol a diferentes especies del género *Phaseolus*, entre las cuales las de mayor importancia económica son: *Phaseolus vulgaris* (frijol común), *P. coccineus* (frijol ayocote), *P. lunatus* (frijol lima) y *P. acutifolius* (frijol tépari). En el estudio sobre la diversidad genética del frijol común se han identificado cuatro razas, tres del acervo mesoamericano (Durango, Jalisco y Mesoamérica) y una del andino (Nueva Granada) (Singh *et al.*, 1991a; Rosales *et al.*, 2005). Las razas fueron definidas como poblaciones similares en la morfología de la planta y semilla, adaptación a determinadas regiones y presencia de ciertos tipos de faseolina, una proteína del grano de frijol (Singh *et al.*, 1991a, b, c).

En la evaluación de la diversidad genética del frijol se han utilizado descriptores morfológicos (Cárdenas 1984, 2000; Singh *et al.*, 1991a; Voysest 2000; Rosales *et al.*, 2003), agronómicos (Rosales *et al.*, 2003, 2005) y de rendimiento (Acosta *et al.*, 2004), así como marcadores bioquímicos (Singh *et al.*, 1991a, c; Avendaño, 2001) y moleculares, tales como RAPD (Beebe *et al.*, 2000), RFLP (Adam *et al.*, 1994), AFLP (Pallottini *et al.*, 2004; Rosales *et al.*, 2005) e ISSR (Rosales *et al.*, 2003; González *et al.*, 2005), y las secuencias ITS de genes del núcleo ribosómico (Delgado *et al.*, 2006).

Desde su domesticación, el frijol combinado con el maíz ha formado parte fundamental de la alimentación de los mexicanos (Sánchez *et al.*, 2001). En México, la superficie anual sembrada con frijol es de 2.2 millones de hectáreas (Sánchez *et al.*, 2001; Acosta *et al.*, 2002). Se considera que cada mexicano consume anualmente entre 12.6 y 15 kg de frijol (Shellie-Dessert y Bliss, 1991; Sánchez *et al.*, 2001), por lo que este cultivo es el segundo en importancia en México, con base en la superficie sembrada y el volumen consumido.

El frijol se siembra en todos los estados de México, en diferentes épocas y con varios sistemas de producción, lo cual favorece la diversidad genética. El consumo del frijol es principalmente de grano seco y ejote (vaina tierna) verde. En la Sierra Norte de Puebla se presenta el consumo de flores y grano fresco, principalmente del frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*) y ayocote (*P. coccineus*) (Martínez *et al.*, 1995). Existen distintas preferencias según el color, la forma y el tamaño del grano de frijol, lo cual combinado con su versatilidad biológica, las tendencias de mercado y la recombinación genética ha permitido conservar la diversidad de la especie (Rosales *et al.*, 2005). No solo el grano es valioso, sino que el esquilmo (paja) - un subproducto del frijol compuesto por tallos, ramas y valvas de las vainas - es también apreciado por su valor forrajero (Acosta *et al.*, 2002).

Hoy día se cultivan en México principalmente las especies *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* y *P. acutifolius*. Eso sin contar las decenas de poblaciones silvestres y en cuya diversidad se distinguen múltiples factores como el tamaño y el color, el rango de adaptación, la capacidad de rendimiento en distintas condiciones y las relaciones con plagas y enfermedades. En la región del noroeste de México predominan los frijoles amarillos claros (peruano, azufrado, mayocoba); en la región norte centro, los pintos, bayos, flor de mayo, garbancillo y negro; en el centro, varios frijoles locales como flor de mayo, flor de junio, negros y variedades criollas como rebosero, garrapato, coconita, entre otros y hacia el trópico húmedo los frijoles de grano pequeño, negros y opacos. Tal pluralidad se explica porque la especie se adapta en climas tropicales y templados y en diversas altitudes (se le encuentra en el amplio rango que va de los 50 a los 2 300 metros). Una ventaja adicional es que crece casi en todos los tipos de suelo, exceptuando los alcalinos, pues requiere ligeros niveles de acidez. El frijol común es una especie termófila, por lo que su adaptación en climas fríos es limitada, mientras algunas especies como *P. coccineus* (frijol ayocote) toleran más las temperaturas bajas. Por esas características se produce en zonas de riego, temporal y humedad residual en todos los estados del país, donde se siembran al año 2.2 millones de hectáreas y se cosechan 1.2 millones de toneladas de frijol, cantidad equivalente a 7% de la producción mundial, en la que también destacan India, Brasil, China y Estados Unidos (Muñoz, 2010).

Referencias

- Acosta, J.A., S.H. Guzmán, G. Esquivel y R. Rosales. 2002. El mejoramiento del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en México: avances y perspectivas, en J.M. Martínez, F. Rincón y G. Martínez (eds.), *El fitomejoramiento ante los avances científicos y tecnológicos. Memoria del Simposio*. XIX Congreso Nacional de Fitogenética, Somefi, México, pp. 20-27.
- Acosta G., J.A., H. González R., C.A. Torres, I. Cuéllar R., E. Acosta D. 2004. Impacto de la genotecnia en el cultivo del frijol en México, en R.E. Preciado y S.A. Ríos (eds.), *Memoria del simposium Aportaciones de la genotecnia en la agricultura*. Sociedad Mexicana de Fitogenética, Chapingo, pp. 36-57.

- Adam B., A.F., M. Sévignac, H. Bannerot y M. Dron. 1994. scar, rapd, and rflp markers linked to the dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose. *Theoretical and Applied Genetics* 88 : 865-870.
- Avendaño, C.H. 2001. *Diversidad fenotípica e isoenzimática en cultivares nativos de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) tipo negro*. Tesis de maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco.
- Beebe, S., P.W. Sckroch, J. Thome, M.C. Duque, F. Pedraza. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of rapd. *Crop Science* 40:264-273.
- Cárdenas, F.A. 1984. *Clasificación preliminar de los frijoles en México*. Folleto técnico núm. 81, INIFAP-SARH, México.
- Cárdenas, F.A. 2000. Investigación agrícola sobre frijol en México durante el periodo 1943 a 1980. *Agricultura Técnica en México* 26:63-78.
- Debouck, D.G., y J. Smartt. 1995. Beans, en J. Smartt y N.W. Simmonds (eds.), *Evolution of crop plants*. Longman, Harlow, UK, pp. 287-294.
- Delgado, A., R. Bibler y M. Lavin. 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* 31:779-791.
- Gepts, P. y Debouck. D.G. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), en A.V. Schoonhoven y O. Voysest (eds.), *Common beans: Research for crop improvement*. CIAT-C.A.B. International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 7-53.
- González, A., A. Wong, A. Delgado, R. Papa y P. Gepts. 2005. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. *Crop Science* 45:606-615.
- Koenig, R. y P. Gepts. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: Further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics* 78:809-817.
- Martínez, M.A., V. Evangelista, M. Mendoza, G. Morales, G. Toledo 1995. *Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México*. Cuadernos del Instituto de Biología 25, UNAM, México.
- Muñoz-Saldaña, R. 2010. Frijol, rica fuente de proteínas. *CONABIO Biodiversitas* 89:7-11.
- Pallottini, L., E. García, J. Kami, G. Barcaccia y P. Gepts. 2004. The genetic anatomy of a patented yellow bean. *Crop Science* 44:968-977.
- Payró, E., P. Gepts, P. Colunga y D. Zizumbo. 2005. Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato and Michoacán, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:589-599.

- Rosales, R., J.A. Acosta, R.P. Durán, H. Guillén, P. Pérez. 2003. Diversidad genética del germoplasma mejorado de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Agricultura Técnica en México* 29:11-24.
- Rosales, R., S. Hernández., M. González, J.A. Acosta y N. Mayek. 2005. Genetic relationships and diversity revealed by aflp markers in Mexican common bean bred cultivars. *Crop Science* 45:1951-1957.
- Sánchez R., G., J.A. Manríquez N., F.A. Martínez M. y L.A. López I. 2001. El frijol en México: competitividad y oportunidades de desarrollo. *Boletín Informativo FIRA*. XXXIII 316:1-87.
- Shellie-Dessert, C.K., y A.F. Bliss. 1991. Genetic improvement of food quality factors, en A. Van Schoonhoven y O. Voysest (eds.), *Common beans: Research for crop improvement*. C.A.B. International. Wallingford, U.K. y CIAT, Cali, Colombia, pp. 649-650.
- Singh, S.P., J.A. Gutiérrez, A. Molina, C. Urrea y P. Gepts. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Science* 31:23-29.
- Singh, S.P., P. Gepts y D.G. Debouck. 1991a. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris* Fabaceae). *Economy Botany* 45:379-396.
- Singh, S.P., R. Nodari y P. Gepts. 1991c. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. *Crop Science* 31 : 19-23.
- Voysest, O. 2000. *Mejoramiento genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.)*. Legado de variedades de América Latina 1930-1999, ciat-Profriza, Cosude, Cali, Colombia.

1.3. Existencia de especies sexualmente compatibles

Se ha reportado la presencia en México de especies del género *Phaseolus* como:

P. vulgaris var. *mexicanus*, *P. coccineus* subesp. *coccineus* (frijol ayocote), *P. coccineus* subesp. *glabellus*, *P. acutifolius* var. *acutifolius* (frijol tépari), *P. acutifolius* var. *latifolius*, *P. lunatus* var. *silvester* (frijol lima), *P. lunatus* var. *lunatus*, *P. leptostachyus* var. *leptostachyus*, *P. pedicellatus* var. *pedicellatus*, *P. ritensis*, *P. maculatus*, *P. neglectus*, *P. terckheimii*, *P. palyanthus* var. *polyanthus*, *P. grayanus*, *P. oligospermus*, *P. pluriflorus*, *P. xanthotrichus*, *P. chiapsanus*, *P. microcarpus*, *P. jaliscanus*, *P. nelsonii*, *P. oaxacanus*, y *P. parvulus*.

Estudios han mostrado que formas silvestres y cultivadas se encuentran en *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* y *P. acutifolius*. Algunas barreras citogenéticas aparentemente han evolucionado entre las versiones silvestres y cultivadas (Smartt, 1969). Las cuatro especies han desarrollado mecanismos de aislamiento los cuales previenen el flujo génico excepto entre *P. vulgaris* y *P. coccineus*. La posibilidad de intercambio de genes entre estas dos especies ha resultado en un extenso estudio de hibridación interespecífica (Mendel, 1866; Uphof, 1922; Tschermak-Seysenegg, 1942; Lamprecht, 1948; Rudorf, 1953; Wall and York, 1959; Kedar and Bemis, 1960; Kroh, 1962; Thomas, 1964; Al-Yasiri and Coyne, 1966; Miranda, 1967; Rutger and

Beckham, 1970; Smartt, 1970; Wall, 1970; Le Marchand, 1971; Marechal, 1971; Ibrahim and Coyne, 1975).

Honma (1956), reportó que se pudieron producir híbridos viables entre la cruce de *P. vulgaris* x *P. acutifolius* por cultivo de embriones y que la progenie F1 fue fértil, sin embargo, de acuerdo a Kusolwa, (2008), la hibridación interespecífica entre *P. acutifolius* accesión G40199 y *P. vulgaris* para introgresar resistencia a *Acanthoscelides obtectus* (bean seed weevil) derivó en embriones que requirieron procedimiento de rescate *in vitro* y la mayoría fueron híbridos estériles los cuales fueron retrocruzados dos veces con el frijol común ICA Pijao para recuperar suficiente fertilidad. Por otro lado, Smartt (1970) obtuvo híbridos recíprocos entre estas dos especies sin cultivo de embriones en algunos casos, sin embargo, encontró que el híbrido *P. vulgaris* x *P. acutifolius* era estéril y el híbrido recíproco no sobrevivió más allá de la iniciación de la floración. La semilla producida de estos intentos fue muy pequeña y enjuta. El problema para establecer la autenticidad de híbridos interespecíficos en *Phaseolus* se complica cuando el crecimiento es anormal como frecuentemente sucede en desarrollos tempranos (e.g., *P. vulgaris* x *P. acutifolius*). La flor escarlata es un buen marcador de *P. coccineus* en cruces con *P. vulgaris* y *P. acutifolius* como progenitores femeninos (Coyne, 1964). Otros caracteres útiles incluyen el hábito de germinación, epigeal vs. hipogeal (*P. coccineus*, *P. polystachyus*), posición del estigma interno vs. externo (*P. coccineus*), longitud del pecíolo de la hoja primaria largo vs. corto (*P. acutifolius*), pigmentación del tallo presente vs. ausente y la forma de la inflorescencia la cual es variable entre especies.

Aun cuando es posible producir híbridos viables entre especies aparte de *P. vulgaris* y *P. coccineus*, operan barreras de esterilidad completa y no es posible la introgresión entre las especies parentales de tales híbridos. La hibridación entre *P. vulgaris* y *P. coccineus* resulta interesante pues las barreras de cruzamiento están más fuertemente desarrolladas en *P. coccineus* que en *P. vulgaris*, resultando en una compatibilidad casi completa de una vía. La fertilización recíproca ocurre sin dificultad, sin embargo, con *P. coccineus* como progenitor femenino los híbridos usualmente abortan y esto puede ocurrir a cualquier estado del desarrollo del embrión. La semilla que llega a la madurez con frecuencia representa solo una pequeña porción de los óvulos fertilizados originalmente producidos. La semilla madura también puede no germinar o dar lugar a plántulas anormales y necróticas, y solamente una minoría de ellas son de apariencia y crecimiento vegetativo normal. Paradójicamente, este pequeño grupo de sobrevivientes muestra una inesperada alta fertilidad la cual es, sin embargo, menor a la de sus progenitores (Smartt, 1979).

Referencias

- Al-Yasiri, S. A., y D. P. Coyne. 1966. Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*. *Crop Sci.* 6:59-61.
- Coyne, D. P. 1964. Species hybridization in *Phaseolus*. *J. Heredity* 55:5-6.
- Honma, S. 1956. A bean interspecific hybrid. *J. Heredity* 47:217-220.

- Ibrahim, A. M., y D. P. Coyne. 1975. Genetics of stigma shape, cotyledon position and flower color in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* (Lam.) and implications in breeding. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100:622-626.
- Kedar, N., y W. P. Bemis. 1960. Hybridization between two species of *Phaseolus* separated by physiological and morphological blocks. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 76:397-402.
- Kroh, M. 1962. Vergleichende untersuchungen an *Phaseolus coccineus* und Kreuzungen zwischen *Ph. vulgaris* und *Ph. coccineus*. Z. Pflanzenzichtung 5:201-216.
- Kusolwa, PM. 2008 Breeding for bruchid resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) : interspecific introgression of lectin-like seed proteins from tepary bean (*P. acutifolius* A. Gray), genetic control and bruchid resistance characterization. Ph.D. Dissertation. Oregon State University
- Lamprecht, H. 1948. Lösung des Artsproblems. Neue und bisher bekannte Ergebnisse der Kreuzung *Phaseolus vulgaris* L. x *Ph. coccineus* L. und Reziprok. Agric. Hort. Genet. Landskrona. 6:87-145.
- Le Marchand, G. 1971. Observations sur quelques hybrides dans le genre *Phaseolus* I. Le probleme des incompatibilites interspecifiques. Bull. Rech. Agron. Gembloux 6:441-452.
- Marechal, R. 1971. Observations sur quelques hybrides dans le genre *Phaseolus* 11. Les phenomenes meiotiques. Bull. Rech. Agron. Gembloux 6:461-489.
- Mendel, G. 1866. Versuche fiber Pflanzenhybriden. Verh. Naturf. Briinn 4:3-47.
- Miranda C., S. 1967. Infiltración genética entre *Phaseolus coccineus* L. y *Phaseolus vulgaris* L. Colegio de Postgraduados, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México Serie de Investigación No. 9, 48 pp.
- Rudorf, W. 1953. Neue Beobachtungen an Bastarden von *Phaseolus vulgaris* L. • *Phaseolus multiflorus* Lam. und *Ph. multiflorus* • *P. vulgaris*. Proc. 9th Int. Congress Genetics. pp 844-845.
- Rutger, J. N., y L. S. Beckham. 1970. Natural hybridization of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95:659-661.
- Smartt J. 1969. Evolution of American *Phaseolus* beans under domestication, pp. 451-462. In P. J. Ucko and G. W. Dimbleby, eds. The Domestication and Exploitation of Plants and Animals. Duckworth, London.
- Smartt J. 1970. Interspecific hybridization between cultivated American species of the genus *Phaseolus*. Euphytica 19:480-489.
- Smartt J. 1979. Interspecific hybridization in the grain legumes---A review *Economic Botany* 33:329-337.
- Thomas, H. 1964. Investigations into the inter-relationships of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* Lam. Genetica 35:59-74.

- Tschermak-Seysenegg, E. 1942. Über Bastarde zwischen Físole (*Phaseolus vulgaris* L.) und Feuerbone (*Phaseolus multiflorus* Lam.) und ihre Eventuelle Praktische Verwertbarkeit. Züchter 14: 153-164.
- Uphof, J. C. T. 1922. Eine polymorphe F1 Generation aus der Kreuzung von *Phaseolus vulgaris* und *Ph. multiflorus*. Z. Vererbungsl. 29: 186-192.
- Wall, J. R. 1970. Experimental introgression in the genus *Phaseolus*. I. Effect of mating systems on interspecific gene flow. Evolution 24:356-366.
- Wall, J. R., y T. L. York. 1959. Gametic diversity as an aid to interspecific hybridization in *Phaseolus* and *Cucurbita*. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 75:419-428.

1.4. Hábitats de persistencia o proliferación

Entendiéndose por persistencia a la habilidad de la planta a reproducirse en temporadas subsecuentes como planta voluntaria en ecosistemas con o sin manejo.

A pesar de que el frijol es fundamental en la gastronomía mexicana, su cultivo ha sido desplazado en muchos casos a regiones marginales con suelos poco profundos y lluvias escasas y mal distribuidas, lo que ha derivado en pérdidas de diversidad genética, reducción de rendimiento y disminución de competitividad de este cultivo.

El género *Phaseolus* se encuentra representado prácticamente en todas las variantes climáticas del país ya que de los 28 climas de la República Mexicana (Medina *et al.*, 1998), en 26 de ellos se observó por lo menos una especie del género. Sólo en los climas templado húmedo frío (tipo 8) y trópico árido muy cálido (tipo 29), no se registró accesión alguna; estos datos indican la amplia adaptación del género *Phaseolus* a las diferentes condiciones climáticas del país. Se identificó gran diversidad en la presencia de las especies en los diferentes tipos climáticos. Así, mientras especies como *P. leptostachyus*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, y *P. acutifolius* se encuentran presentes en 20, 19, 17 y 14 tipos climáticos, respectivamente otras como *P. esperanzae* y *P. pluriflorus*, sólo se encontraron en tres tipos climáticos. Llama la atención el hecho que de las especies silvestres que han sido domesticadas, *P. vulgaris* es la que se ha reportado en el menor número de variantes climáticas (Figura 1).

Los climas subtropicales son los más propicios para el género *Phaseolus* (Freytag y Debouck, 2002), ya que 22 de las 25 especies fueron colectadas en el tipo climático subtropical semiárido templado, seguido por los tipos subtropical subhúmedo templado y subtropical subhúmedo semicálido, en los cuales se ubicaron un total de 21 y 19 especies, respectivamente. Esto concuerda con lo señalado por González (1984), quien estableció la preferencia que tiene *Phaseolus* por condiciones subhúmedas y semiáridas frescas de regiones tropicales y subtropicales.

En contraparte, los climas templado-fríos parecen ser restrictivos para *Phaseolus*, ya que sólo 10 de las 25 especies se han colectado en estos climas. Entre las especies que se desarrollan en ese

clima destaca *P. coccineus*, cuyas accesiones se reportan en tres de las cuatro variantes del clima templado-frío. Esto indica que esta especie podría contribuir al desarrollo de germoplasma tolerante a las bajas temperaturas. No obstante, los climas áridos y semiáridos, extremos en temperatura, también cuentan con especies tolerantes a bajas temperaturas, como lo es *P. angustisimus* (Balasubramanian *et al.*, 2002).

Los climas tropicales extremos en las condiciones de temperatura y humedad, parecen ser aún más restrictivos que los climas templado-fríos, dado que son pocas las especies que muestran accesiones en estos ambientes. En climas tropicales cálidos y muy cálidos, con excepción del árido muy cálido, sobresale la presencia de especies tales como *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. leptostachyus*, *P. microcarpus*, *P. tuerckheimii*, *P. coccineus* y *P. pedicellatus*, lo que señala su capacidad de tolerar condiciones extremas de calor y sequía. En el clima tropical húmedo muy cálido, condición que es considerada muy desfavorable para el desarrollo del frijol libre de enfermedades (Ruiz *et al.*, 1999), destaca la presencia de *P. tuerckheimii*, *P. lunatus* y *P. leptostachyus*, por lo que podría esperarse que estas especies pudieran constituir fuentes de germoplasma tolerante a altas temperaturas y a algunos patógenos. De acuerdo con lo señalado anteriormente, *P. coccineus* podría considerarse como una especie tolerante tanto a condiciones frías como cálidas, lo cual podría explicar su capacidad de distribución en casi todos los tipos climáticos del país (Figura 1).

De los valores altitudinales se puede inferir que las especies *P. acutifolius*, *P. filiformis*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. micranthus*, *P. microcarpus*, *P. ritensis* y *P. tuerckheimii*, pueden ser encontradas prácticamente desde el nivel del mar, mientras que el resto de las especies parecen preferir ambientes de mayor altitud. Las especies *P. esperanzae*, *P. oaxacanus* y *P. pluriflorus* sólo registran sitios con altitudes mayores a los 1600 m. Según el valor altitudinal promedio, *P. coccineus*, *P. esperanzae*, *P. grayanus*, *P. maculatus*, *P. nelsonii*, *P. oaxacanus*, *P. parvulus*, *P. pedicellatus*, *P. pluriflorus* y *P. polymorphus*, abundan más en regiones de tierras altas (>1900 m); mientras *P. jaliscanus*, *P. leptostachyus*, *P. micranthus*, *P. microcarpus*, *P. neglectus*, *P. oligospermus*, *P. pauciflorus*, *P. ritensis*, *P. tuerckheimii*, *P. vulgaris* y *P. xanthotrichus* tienden a predominar en zonas de transición entre tierras altas y tierras bajas. Esta diferencia entre *P. vulgaris* y *P. coccineus*, coincide con lo reportado previamente por Miranda (1979), quien señala que *P. vulgaris* predomina en altitudes de 1200 m y *P. coccineus* en las de 2200 m. El resto de las especies, esto es *P. filiformis* y *P. lunatus*, muestran mayor abundancia en las tierras bajas.

Con respecto a la precipitación promedio, las especies que habitan en regiones de menor precipitación son *P. filiformis*, *P. grayanus*, *P. maculatus*, *P. neglectus*, *P. polymorphus* y *P. ritensis*, se distribuyen en tipos climáticos con precipitación inferior a 600 mm durante el ciclo de lluvias, e inferior a 135 mm en el periodo noviembre-abril. Estas especies podrían ser consideradas como adaptables a condiciones de aridez, sobre todo *P. filiformis*, que se ha encontrado en áreas con menos de 105 mm de lluvia en verano y menos de 80 mm en invierno, lo que coincide con Buhrow (1983) quien afirma que esta especie se adapta a condiciones de extrema aridez, con temperaturas de 38 °C y suelos con pH elevado. Esta especie también ha mostrado tolerancia a salinidad (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002). Al considerar los intervalos de precipitación destacan *P. acutifolius* y *P. lunatus* pues aunque prosperan en condiciones favorables de humedad, también

están adaptados a condiciones de baja precipitación. En contraparte, las especies con mayor distribución en áreas de alta precipitación mayo-octubre son *P. chiapasanus*, *P. jaliscanus*, *P. micranthus*, *P. oaxacanus*, *P. oligospermus*, *P. pluriflorus* y *P. tuerckheimii*, mientras que las especies que se distribuyen en áreas con mayor precipitación noviembre-abril son *P. chiapasanus*, *P. lunatus*, *P. oaxacanus*, *P. oligospermus*, *P. tuerckheimii* y *P. xanthotrichus*, ya que de estas especies se han obtenido accesiones de sitios con más de 150 mm de lluvia en el periodo. Sobresale *P. tuerckheimii*, que se adapta a sitios de 1701 y 270 mm para los periodos mayo-octubre y noviembre-abril, respectivamente. La especie *P. vulgaris*, con una gama de 406 a 1867 mm anuales, parece tener una adaptación a ambientes muy diversos de humedad, lo cual explica en parte la amplia dispersión de su cultivo en el país y en el mundo, y el lugar importante que ocupa entre las leguminosas de mayor consumo global (Núñez *et al.*, 1990).

Con relación a los valores térmicos de las especies de *Phaseolus*, y en complemento a la discusión que se estableció acerca de la influencia del tipo climático sobre la distribución de las especies, los valores promedio de la temperatura media de mayo a octubre señalan que en términos generales las especies pueden clasificarse de la siguiente manera: con adaptación a climas templados (5 a 18 °C; Medina *et al.*, 1998): *P. coccineus*, *P. esperanzae*, *P. nelsonii*, *P. oaxacanus*, *P. pedicellatus* y *P. pluriflorus*; con adaptación a climas semicálidos (18 a 22 °C; García, 1988): *P. chiapasanus*, *P. grayanus*, *P. jaliscanus*, *P. leptostachyus*, *P. maculatus*, *P. neglectus*, *P. oligospermus*, *P. parvulus*, *P. pauciflorus*, *P. polymorphus*, *P. ritensis*, *P. tuerckheimii*, *P. vulgaris* y *P. xanthotrichus*; con adaptación a climas cálidos (22 a 26 °C; García, 1988): *P. acutifolius*, *P. filiformis*, *P. micranthus* y *P. microcarpus*; y con adaptación a climas muy cálidos (>26 °C; García, 1988) solamente *P. lunatus*.

Tanto las especies de tendencia cálida como de tendencia muy cálida, podrían considerarse como las más tolerantes a altas temperaturas, ya que además son las especies que toleran los más altos niveles de temperatura máxima (mayo-octubre), por arriba de 29 °C; entre ellas destacan *P. filiformis* con 32.3 °C. Las especies más adaptadas al frío podrían considerarse como las especies de tendencia templada y algunas de tendencia semicálida, como *P. pauciflorus* y *P. ritensis*, ya que se distribuyen en climas con una temperatura mínima media entre mayo y octubre, incluso por debajo de 4 °C. Llamen la atención *P. coccineus* y *P. pedicellatus*, que registraron una accesión en clima con temperatura media por debajo de 10 °C, temperatura reportada por varios autores como la temperatura base promedio para frijol común (Medina *et al.*, 2004), aunque de acuerdo con Qi *et al.*, (1998) la temperatura base se encuentra en el rango de 7.1 a 13.2 °C, según la variedad.

En *P. vulgaris*, la especie de mayor importancia económica en México, se obtuvieron como límites altitudinales 493 y 2700 m, donde el valor inferior coincide con los 500 msnm reportados por Benacchio (1982), y el límite superior con los 2800 msnm señalados por Brücher (citado por Miranda, 1979). El límite inferior de precipitación obtenido (406 mm) coincide con los requerimientos de agua del ciclo del frijol (300-500 mm) reportados por Doorenbos y Kassam (1979). De acuerdo con estos límites de tolerancia climática, la forma silvestre de *P. vulgaris* manifiesta un menor rango de adaptación que en su forma domesticada, lo que se puede deber al mejoramiento genético que se ha realizado sobre *P. vulgaris*, tanto en México como en otros países, que ha modificado aspectos importantes de la planta, como reducción en ciclo biológico y

tolerancia a enfermedades, lo que probablemente le ha permitido desarrollarse en un mayor número de ambientes.

Con base en los valores climáticos de las especies se puede inferir que *P. leptostachyus* y *P. coccineus* son las especies que ocurren en una mayor amplitud ambiental, lo cual se manifiesta tanto en el rango altitudinal, como térmico y de precipitación. Las accesiones de *P. coccineus* fueron recolectadas en sitios con altitudes que van de 340 hasta 3628 m, temperatura media entre 8.9 y 29.2 °C, y una precipitación acumulada promedio de 281 a 2490 mm. En cuanto a lluvia, el valor límite de 281 mm es incluso ligeramente inferior a un reporte previo de 300 mm (FAO, 1994); y el valor extremo de 2490 mm (mayo a octubre) y 384 mm (noviembre a abril) mantiene correspondencia con el valor extremo anual de lluvia reportado en Costa Rica para esta especie, que es de 3000 mm (Maquet, 1997). Las accesiones de *P. leptostachyus* reportaron rangos de 0 a 2900 msnm, 12.7 a 28.8 °C y de 227 a 2498 mm de lluvia en el periodo de mayo a octubre. Estos valores confirman que estas dos especies son adaptables a una amplia gama de condiciones climáticas.

Algunas especies como *P. esperanzae*, *P. pluriflorus*, *P. filiformis*, *P. grayanus*, *P. neglectus* y *P. oaxacanus*, mostraron cierto endemismo. En *P. esperanzae* el endemismo parece estar relacionado con condiciones de temperatura, ya que se desarrolla tanto en condiciones áridas como semiáridas y subhúmedas, siempre que se trate de zonas templadas. Casos similares son los de *P. pluriflorus*, *P. neglectus* y *P. oaxacanus*, que se circunscriben a zonas templadas y semicálidas. En cambio, *P. filiformis* y *P. grayanus* relacionan su endemismo con la tolerancia o escape a la sequía, ya que se desarrollan solamente en zonas áridas y semiáridas.

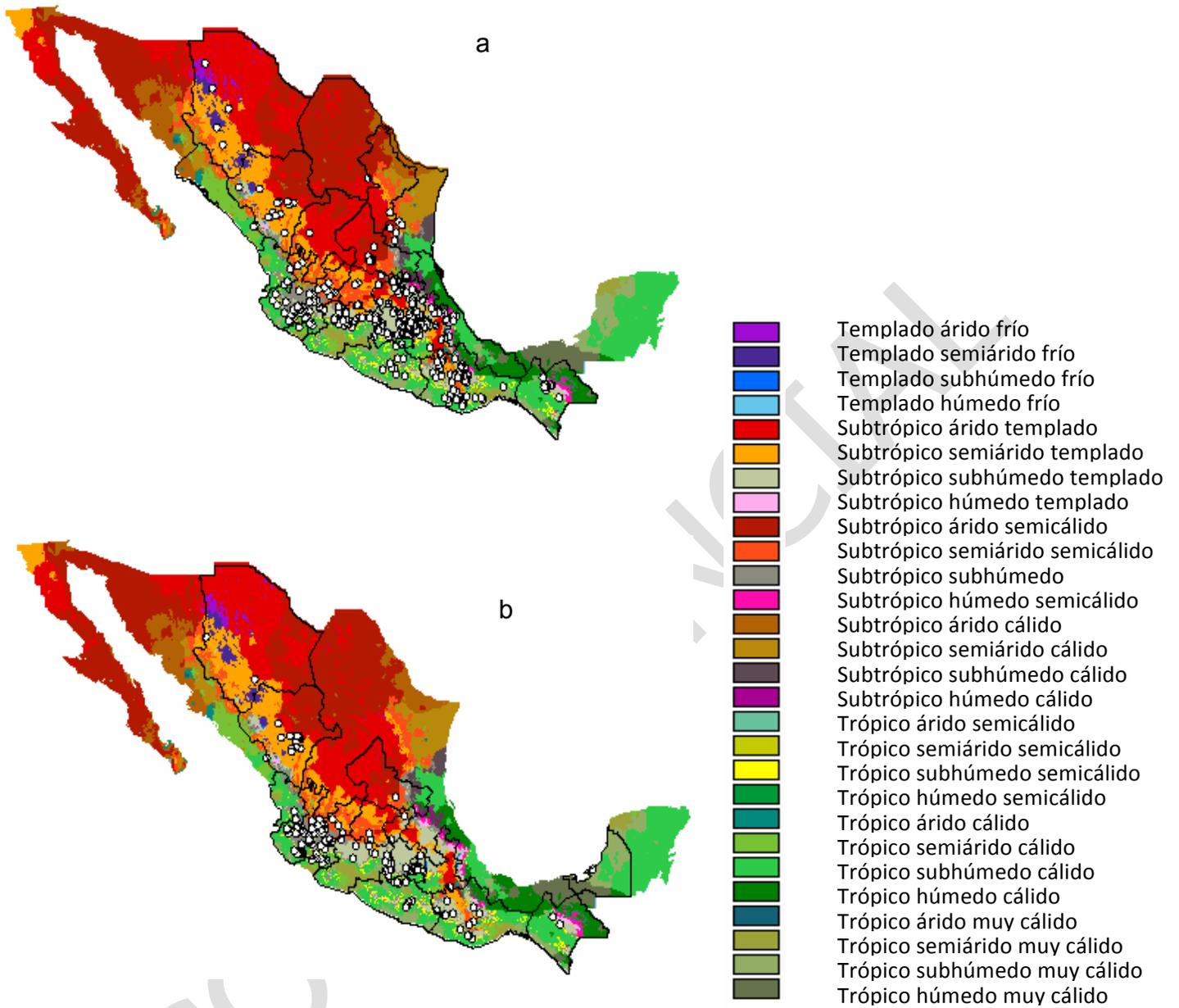


Figura 1. Distribución geográfica y climática de accesiones de a) *P. coccineus*; b) *P. vulgaris* (López-Soto *et al.*, 2005).

Referencias

- Bayuelo J J S, R Craig, J P Lynch. 2002. Salinity tolerance of *Phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop Sci.* 42:1584–1594.
- Benacchio S S. 1982. Algunas exigencias agroecológicas en 58 especies de cultivo con potencial de producción en el Trópico Americano. FONAIAP-Centro Nal. de Inv. Agropecuarias. Ministerio de Agricultura y Cría. Venezuela. 202 p.
- Balasubramanian P, A Vanderberg, P Huel, L Gusta. 2002. Physiology of freezing resistance in the genus *Phaseolus*. *Am. Rep. Bean Improv. Coop.* 45:6-7.
- Buhrow R. 1983. The wild beans of southwestern North America. *Desert Plants* 5:67–88.
- Doorenbos J, A H Kassam. 1979. Efectos del Agua sobre el Rendimiento de los Cultivos. Estudio FAO: Riego y Drenaje No. 33. FAO. Roma. 212 p.
- FAO (1994) ECOCROP 1. The Adaptability Level of the FAO Crop Environmental Requirements Database. Version 1.0 AGLS. Base de datos en formato DBASE. FAO. Rome, Italy.
- Freytag F G, D G Debouck. 2002. Taxonomy, Distribution and Ecology of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, México and Central America. Botanical Research Institute of Texas. U.S.A. 297 p.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Offset Larios. México, D.F. 71 p.
- González de C M. 1984. Especies Vegetales de Importancia Económica en México. Ed. Porrúa. México, D.F. 305 p.
- López-Soto JL, Ruiz Corral JA, Sánchez-González JJ y Lépiz-Ildefonso R. (2005). Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp) en la República Mexicana. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:221-230.
- Maquet A, B J P. 1997. A survey of the neotropical distribution of *Phaseolus lunatus*. *Belgian J. Bot.* 130(1):93-116.
- Medina G G, J A Ruiz C., R A Martínez P. 1998. Los Climas de México: Una Estratificación Ambiental Basada en el Componente Climático. Libro técnico núm. 1. INIFAP-CIRPAC. Ed. Conexión Gráfica. Guadalajara, Jalisco. México. 103 p.
- Medina G G, J A Ruiz C. 2004. SICA Sistema de Información para Caracterizaciones Agroclimáticas versión 2.5. Documentación y manual del usuario. Tema Didáctico Núm. 2. INIFAP-CIRNOCC. E. Zacatecas. Calera de V.R., Zacatecas, México. 73 p.
- Miranda C S. 1979. Evolución de *Phaseolus vulgaris* y *P. coccineus*. In: Contribuciones al Conocimiento del Frijol. E M Engleman (ed). Colegio de Postgraduados. Rama de Botánica. Montecillo, México. pp:83-99.

Núñez G S, L A Ledesma G, V Alemán M, P Alemán R, M Chuela B, F Monjaras A. 1990. Guía para Cultivar Frijol en Jalisco. Folleto para productores Núm. 2. INIFAP-CIFAP Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México. 14 p.

Qi A, J B Smithson, R J Summerfield. 1998. Adaptation to climate in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): photothermal flowering responses in the eastern, southern and great lakes regions of Africa. Exp. Agric. 34:153-170.

Ruiz C J A, G Medina G, I J González A, C Ortiz T, H E Flores L, R Martínez P, K F Byerly M. 1999. Requerimientos Agroecológicos de Cultivos. Libro Técnico Núm. 3. INIFAP-CIRPAC. 1a. Ed. Conexión Gráfica. Guadalajara, Jalisco, México. 324 p.

CONFIDENCIAL

1.5. Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Phaseolus vulgaris* L.

	Organismo receptor	Organismo donador
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>	<i>Tracheobionta</i>
Súper división	<i>Spermatophyta</i>	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>	<i>Capparales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>	<i>Brassicaceae</i>
Género	<i>Phaseolus</i> L.	<i>Arabidopsis</i> Heynh.
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.

USDA, Natural Resource Conservation Service, Plants Database.

1.6 País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido

México, Guanajuato, Celaya. Campo Experimental Bajío, INIFAP.

1.7 Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor

La organización actual en lo que a diversidad genética del pool génico de frijol cultivado se refiere es el resultado de evolución bajo condiciones naturales (previo a la domesticación) y su cultivo. Previo a su domesticación *P. vulgaris* ya se había separado en dos grupos principales cada uno con características geográficas de distribución muy particulares Mesoamérica y los Andes (Debouck *et al.*, 1993).

Hallazgos arqueológicos, datos botánicos y tradiciones orales, han demostrado que el frijol silvestre se desarrolló en una gran variedad de ambientes, desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina (Gepts y Debouck, 1991). Formas cultivadas de frijol estuvieron presentes hace 7000-8000 años en los valles de Tehuacán y Oaxaca, en México, en América Central y en Sudamérica Perú, Ecuador, Argentina y Chile (Gepts y Debouck, 1991).

Gepts y Bliss (1988) y Singh *et al.*, (1991a, b) encontraron un interesante paralelismo geográfico entre el tipo de faseolina presente en la semilla y el tamaño de esta. Ellos encontraron que en América Central los cultivares poseen predominantemente faseolina tipo "S", semillas pequeñas (17-28 g/100 semillas), están más adaptadas a zonas bajas y cálidas, y cultivadas principalmente

en México y América Central. Por el contrario, en los países andinos los cultivares mayoritariamente contienen faseolina tipo "T", semillas más grandes (mayor de 40 g/100 semillas), y están adaptadas a zonas de cultivo de mayor altitud.

Otros estudios sobre variabilidad de proteínas en la semilla (Gepts y Bliss, 1986), aloenzimas (Singh *et al.*, 1991c), caracteres morfológicos de la planta (Singh *et al.*, 1991b), y marcadores moleculares (Nodari *et al.*, 1992; Becerra-Velázquez y Gepts, 1994) indican la presencia de dos centros de domesticación del frijol cultivado. En 1991 Singh *et al.*, (a,b) los describieron como producto de un proceso de domesticación simultáneo en diferentes regiones de América del Sur y Central, a partir de un ancestro que había pasado por una evolución divergente. Los acervos genéticos fueron denominados Andino y Mesoamericano, respectivamente. Estos dos grupos pueden ser distinguidos a nivel morfológico (Gepts y Debouck, 1991) y molecular (Becerra Velázquez y Gepts 1994; Freyre *et al.*, 1996; Gepts *et al.*, 1986; Koenig y Gepts 1989; Tohme *et al.*, 1996). Asimismo, estos dos grupos están divididos por aislamiento reproductivo incompleto, es decir, el híbrido F1 es letal en la mayoría aunque no en todos los casos (Koinange y Gepts 1992). La existencia de aislamiento reproductivo y el nivel de divergencia a nivel molecular sugieren que estos dos grupos genéticos pueden representar dos subespecies.

Con base en sus características morfológicas y tipo de faseolina (Gepts y Bliss, 1986), las variedades silvestres y cultivadas de la región Mesoamericana se dividieron en tres razas: Mesoamericana, Jalisco y Durango. Recientemente se determinó un cuarto grupo conteniendo frijoles de origen mayoritariamente guatemalteco, trepadores, algunos de hábito de crecimiento tipo III, designada raza Guatemala. Análogamente, las variedades de frijol provenientes de la zona Andina fueron clasificadas como razas Nueva Granada, Perú y Chile (Blair *et al.*, 2006) (Figura 2).

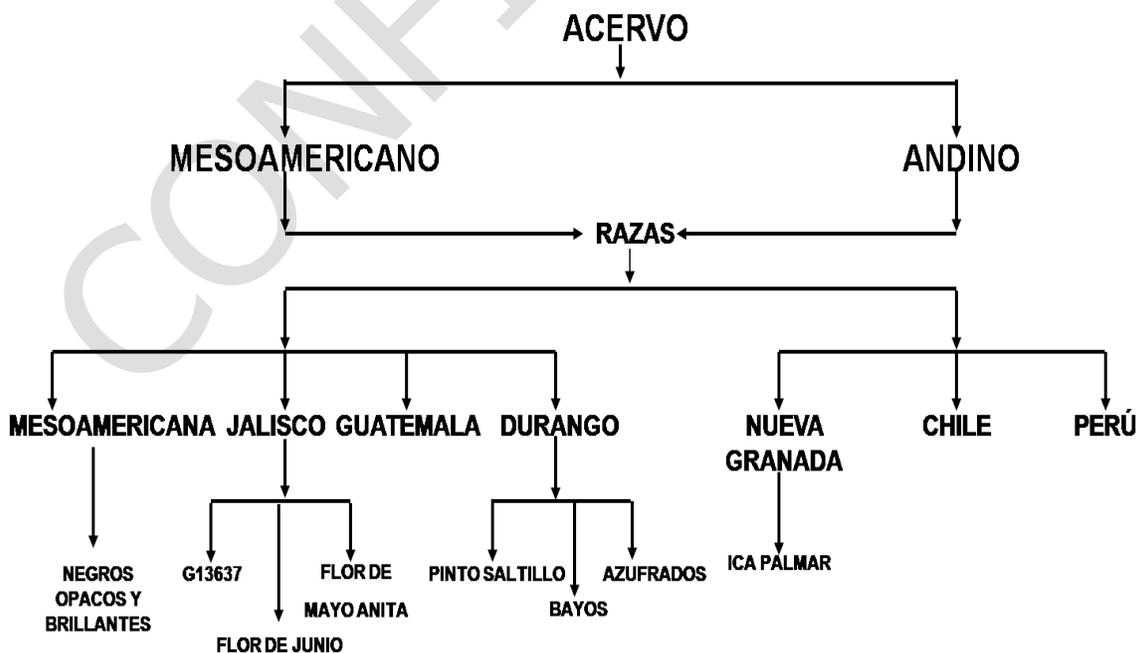


Figura 2. Diagrama del origen geográfico de diferentes cultivares de frijol común

Empleando marcadores tipo AFLPs se analizó la estructura genética del frijol silvestre y domesticado del acervo mesoamericano a diferentes niveles geográficos para probar la hipótesis de asimetría en el flujo génico e investigar el origen de las poblaciones tipo maleza (weedy) (Papa y Gepts, 2003). Papa y Gepts (2003) demuestran que el flujo génico es de tres a cuatro veces mayor de las poblaciones domesticadas a las silvestres que en la dirección opuesta. Las poblaciones tipo maleza parecen ser genéticamente intermedias entre las poblaciones domesticadas y las silvestres, sugiriendo que se originaron de la hibridación entre tipos silvestres y domesticados en lugar de ser escapes de cultivos. Además, las razas domesticadas fueron genéticamente similares confirmando una solo evento de domesticación para el grupo génico Mesoamericano. Finalmente, la diversidad del frijol domesticado mostró un nivel inferior en la estructura geográfica en comparación con aquella de las poblaciones silvestres (Papa y Gepts 2003).

Evidencia adicional de éstos dos grupos genéticos fue provista por marcadores morfológicos (Gepts *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1991a, b), marcadores moleculares (Singh *et al.*, 1991c; Khairallah *et al.*, 1990, 1992; Becerra-Velázquez y Gepts 1994; Tohme *et al.*, 1996; Chacón *et al.*, 2007), y datos fitopatológicos (Guzmán *et al.*, 1995; Kelly y Vallejo, 2004).

Diversificación del frijol en México.

El origen de la domesticación del frijol y su centro de domesticación Mesoamericano han sido objeto de estudio empleando un amplio rango de poblaciones silvestres (Freytag y Debouck, 2002) y un set de marcadores tipo microsatelite distribuidos en 11 grupos de ligación de frijol (Blair *et al.*, 2003). De acuerdo con lo reportado por Kwak *et al.*, (2009), un grupo de siete poblaciones de frijol silvestre más cercanamente relacionados con el clado de domesticados (G11051, G11056, G12910, G12949, G 12952, G12953, G12957) están distribuidos en una región angosta orientada este-oeste a través del estado de Jalisco y hacia la parte oeste del estado de Guanajuato. Esta región está centrada en el Río Lerma-Río Grande de Santiago. También fue identificado previamente usando patrones electroforéticos de la proteína de semilla faseolina codificada por el locus Phs (Gepts, 1988). Tres poblaciones de frijol silvestre combinan la cercanía de los tipos domesticados basados en los datos de faseolina y microsatélites (de oeste a este: G11056 de Mascota, Jalisco; G12957 de Santa María del Valle, Jalisco; y G12910 de Pénjamo, Guanajuato). De esta manera, tanto los datos de faseolina como los de microsatélites confirman independientemente que el área principal de domesticación de frijol en Mesoamérica puede estar centrado en el oeste de México (estado de Jalisco y oeste de Guanajuato. Por otra parte, las accesiones de frijol silvestre del Río Balsas (accesiones de Guerrero y Michoacán), área que forma parte del centro de domesticación del maíz, no se reportaron cercanamente relacionados a los grupos domesticados como lo hicieron los de Jalisco y oeste de Guanajuato (Kwak *et al.*, 2009).

Referencias

Becerra-Velázquez VL, y Gepts P. 1994. RFLPs Diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genome 37:256-263.

- Blair MW, Giraldo MC, Buendía HF, Tovar E, Duque MC, Beebe SE. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 113:100-109. DOI: 10.1007/s00122-006-0276-4
- Blair, M.W., F. Pedraza, H.F. Buendia, E. Gaitán-Solís, S.E. Beebe, P. Gepts, and J. Tohme. 2003. Development of a genome wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107:1362–1374.
- Chacón, S., M.I., B. Pickersgill, D.G. Debouck, and J.S. Arias. 2007. Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Syst. Evol.* 10, doi:1007/s00606-007-0536-z.
- Debouck DG, Toro O, Paredes OM, Johnson WC, Gepts P. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* in Northwestern South America. *Econ Bot* 47:408-423.
- Freyre R, Rios R, Guzmán L, Debouck D, Gepts P. 1996. Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp. (Fabaceae) in Bolivia. *Econ Bot.* 50:195-215.
- Freytag, GF, Debouck DG. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. Botanical Research Inst. of Texas, Fort Worth.
- Gepts P, Bliss FA. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability . II. Europe and Africa *Econ Bot* 42:86-104,
- Gepts P, Bliss, FA. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Colombia. *Economic Botany* 40:469-478.
- Gepts P, Debouck DG. 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*, p 7-53, In; O. Voysest and A Van Shoonhoven (eds.) *Common beans: Research for crop improvement* . CAB Intern., Willingford, Oxon, UK.
- Gepts P, Osborn TC, Rasca K, Bliss FA. 1986. Phaseolin- Protein variability in wild forms and landraces of common bean (*Phaseolus vilgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botany.* 40:451-468.
- Guzmán, P., R.L. Gilbertson, R. Nodari, W.C. Johnson, S.R. Temple, D. Mandala, A.B.C. Mkandawire, and P. Gepts. 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology* 85:600–607.
- Kelly, J.D., and V.A. Vallejo. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience* 39:1196–1207.
- Khairallah, M.M., B.B. Sears, and M.W. Adams. 1992. Mitochondrial restriction fragment polymorphisms in wild *Phaseolus vulgaris*: insights in the domestication of common bean. *Theor. Appl. Genet.* 84:915–922.

- Khairallah, M.M., M.W. Adams, and B.B. Sears. 1990. Mitochondrial DNA polymorphisms of Malawian bean lines: Further evidence for two major gene pools. *Theor. Appl. Genet.* 80:753–761.
- Koenig R, Gepts P. 1989. Allozyme Diversity in wild *Phaseolus vulgaris* : Further evidence for two major centres of Diversity. *Theor Appl Genet.* 78:809-817.
- Koinange EMK, Gepts P. 1992. Hybrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. *J Hered* 83:135-139
- Kwak M, Kami JA, Gepts P. 2009. The Putative Mesoamerican Domestication Center of *Phaseolus vulgaris* Is Located in the Lerma–Santiago Basin of Mexico. *Crop Sci.* 49:554–563 doi: 10.2135/cropsci2008.07.0421
- Nodari RO, Koinange EMK, Kelly JD, Gepts P. 1992. Towards an integrated linkage map of common bean. I. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. *Theor Appl Genet*84:186-192.
- Papa R, Gepts P. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. 106:239-250, DOI: 10.1007/s00122-002-1085-z.
- Singh SP, Gepts P, Debouck DG. 1991c. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economy Botany.* 45:379-396.
- Singh SP, Gutierrez JA, Molina A, Urrea C, Gepts P. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: Marker based analysis of morphological and agronomics traits. *Crop Sci* 31:23-29.
- Singh, S.; Nodari, R.; Gepts, P. 1991a. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. *Crop Science.* 31: 19-23.
- Tohme J, González DO, Beebe S, Duque MC. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core Collection. *Crop Sci* 36:1375-1384.

1.8 Secuencia génica detallada del evento de transformación (tamaño del fragmento, sitio de inserción y oligonucleótidos)

Tamaño del fragmento y oligonucleótidos

Secuencia del gen pdf 1.2 (438 pb) (123809 NCBI)

```
acacaacacatacatctatacattgaaaacaaaatagtaataatcatcatggctaagtttgcttccatcatcacccttatcttcgctgctcttggt
ctcttgctgcttcgacgcaccggcaatggtggaagcacagaagtgtgcgagaagccaagtgggacatggtcaggggttgcggaacag
taatgcatgcaagaatcagtgcatcattaccttgaaggagccaaacatggatcatgcaactatgtcttcccagcacacaagtgatctgttacgt
cccatgttaaactaccaataatcttggctaaatcggtgtgtatttacataaaataagctctgtgactctatgagtaactttatgacatgcat
attctgttttaagtgttttttcccgttgtgttacaataataaaaaataatttatgt
```

Oligonucleótidos PCR punto final

Sentido pdf1.2 5'- CAT CAT GGC TAA GTT TGC TTC C -3'

Antisentido pdf1.2 3'- CTC ATA GAG TGA CAG AGA CT -5'

Tamaño del fragmento 60 pb

Oligonucleótidos PCR Cuantitativo

Sentido pdf1.2 5'-AGT TGT GCG AGA AGC CAA GT-3'

Antisentido pdf1.2 3'-GCA TGC ATT ACT GTT TCC GCA AA-5'

Sonda TaqMan® pdf1.2 5'-CCC TGA CCA TGT CCC-3'

Sitio de inserción

La identificación del sitio de inserción del evento de transformación en el genoma de frijol se propone realizarlo a través de la secuenciación masiva. Esta tecnología tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones).

Se establecerá un convenio con el laboratorio del Centro Nacional de Referencia de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) de SENASICA, Sin embargo cabe mencionar que éste laboratorio cuenta con todo el equipo necesario para llevar a cabo este análisis, pero aún está trabajando en un protocolo establecido para frijol, para insertos de bajo peso molecular (como en nuestro sistema).

1.9 Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros con demostración de resultados

Secuencias flanqueantes

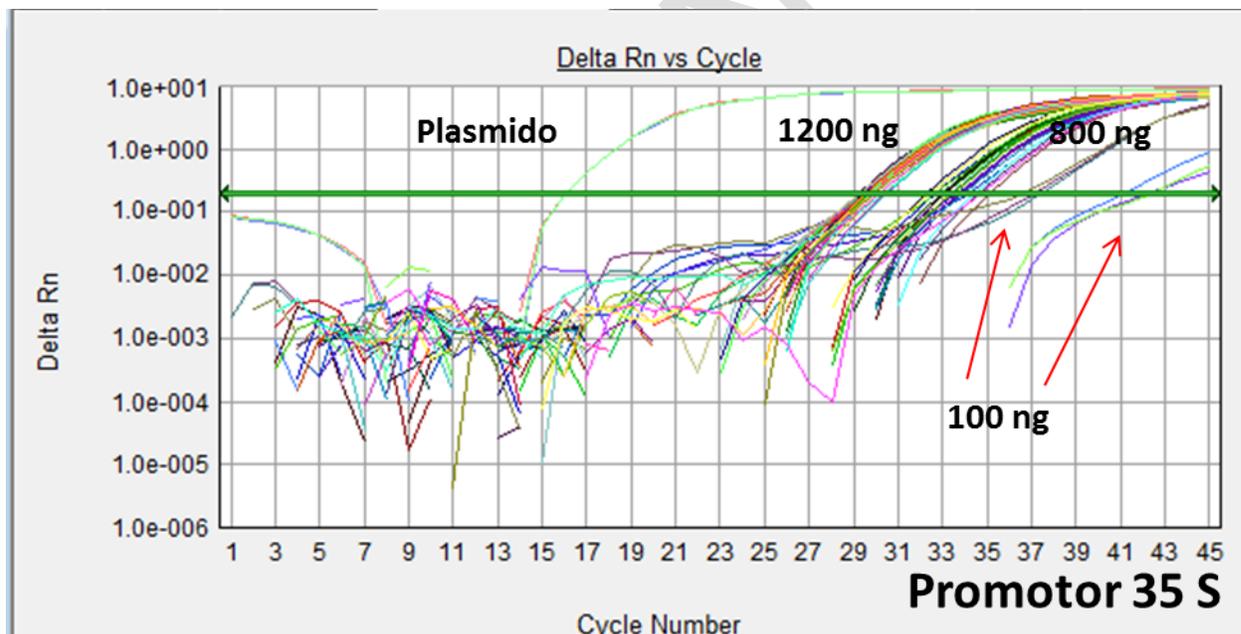
La identificación de las secuencias flanqueantes y el número de copias insertadas se identificarán en el laboratorio del Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) a través de un convenio. Resta establecer los protocolos para el genoma de frijol.

Número de copias insertadas

El análisis de segregación inicial (T1) indica una proporción 3:1 evidenciando la presencia de una copia en el genoma de las líneas de frijol modificadas genéticamente (Cuadro 2) (Sección 1.19). Tradicionalmente, las transferencias Southern se han utilizado para determinar el número de copias de genes (Southern, 1975). El número de copias insertadas en el frijol genéticamente modificado se trató de definir a través de Southern blot, sin embargo no se logró detectar la presencia del inserto, a pesar de incrementar la concentración de ADN del frijol transformado genéticamente, se requiere establecer un protocolo para insertos de bajo peso molecular como es nuestro sistema. En recientes estudios se postula que el Southern Blot y la hibridación in situ eran los métodos estándar para la detección de la deleción, duplicación o amplificación de un gen, ambos métodos tienen sus propias limitaciones importantes, por ejemplo la no detección cuando

tenemos un bajo contenido de la secuencia blanco en la matriz a analizar (poco sensible). Recientemente, se han realizado estudios que examinan el potencial de usar la qPCR para sustituir el proceso de transferencia Southern típica para determinar el número de copias del gen. La PCR cuantitativa en tiempo real ha demostrado ser una buena alternativa para la detección de genes, número de copias y cambios en el genoma. Sus principales ventajas son la gran gama dinámica de la cuantificación exacta, la ausencia de manipulaciones después de la PCR, su capacidad de cribado de alto rendimiento y el grado de automatización, y la posibilidad de realizar el ensayo en cantidades mínimas de ADN de la muestra en tan sólo unas pocas horas de tiempo (mayor sensibilidad) (Hoebeeck et al., 2007; Kubista et al., 2006, Solomon et. Al., 2008; Huang et. al., 2013).

En la Figura 3, se muestra la detección de la secuencia blanco (*pdf1.2*) en diferentes concentraciones de ADN de plantas de frijol GM a través de qPCR, obsérvese que las concentraciones de ADN que se requiere es de 1200 ng totales, para lograr detectar la secuencia del gen *pdf1.2*.



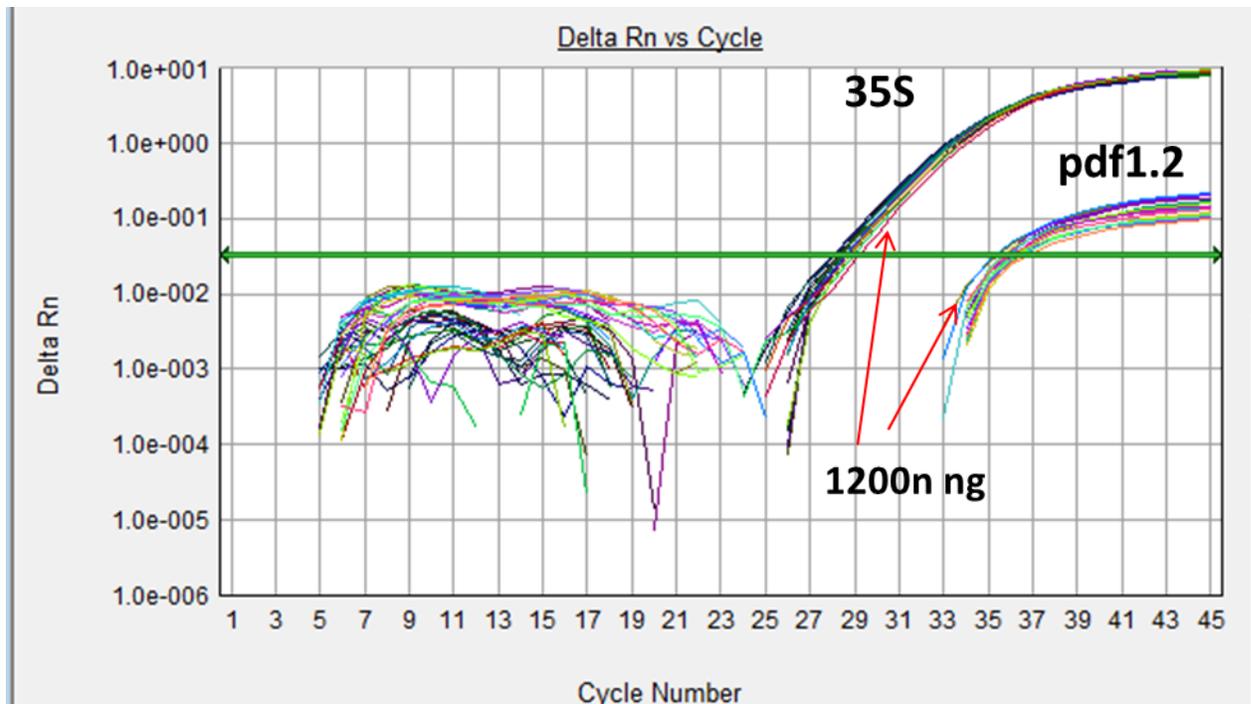


Figura 3. Detección cuantitativa del gen pdf1.2 y el promotor 35S.

Sin embargo, para realizar una cuantificación del número de copias de la secuencia blanco se necesitan materiales de referencia para establecer una curva estándar; proyecto que se está proponiendo para establecer en con colaboración con el Centro Nacional de Metrología (CENAM).

Expresión transcripcional.

El ARN celular total se extrajo del tejido de las hojas de las plantas utilizando Trizol® (reactivo, Carisbald, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por fluorometría (TBS-380 Mini-Fluorómetro) utilizando el kit Ribo-Green (Molecular Probes, Eugene, Oregón, Estados Unidos).

El cDNA de la primera cadena se sintetizó mediante RT-PCR a través la mezcla de un sólo paso de RT-PCR (One-Step RT-PCR Master Mix) de Applied Biosystems (Cat. No.4309169). El sistema TaqMan® se utilizó para la amplificación de genes. Las condiciones de amplificación fueron: 48° C, por 30 min (transcripción inversa); 95° C, 10 min (desnaturalización); 45 ciclos (amplificación por PCR) a 95° C; 15 seg a 60° C; 1 min (ABI PRISM® 7000 Sistemas de Detección de Secuencias/Sequence Detection Systems, Applied Biosystems).

La relación de expresión relativa se calculó mediante la normalización del Ct del gen blanco pdf1.2 con el Ct del gen endógeno de referencia (18S) para obtener sólo la eficiencia del gen pdf1.2 ($D_{Ct} = C_{t \text{ pdf1.2}} - C_{t \text{ 18Sr}}$). Cada D_{Ct} se comparó con un calibrador dentro de las repeticiones ($DD_{Ct} = D_{Ct} (\text{muestra}) - D_{Ct} (\text{calibrador})$). La expresión relativa se reveló como $2^{-DD_{Ct}}$, unidad de medida de la expresión del gen (Livak y Schmittgen, 2001; Espinosa *et al.*, 2013).

El análisis de expresión del gen *pdf1.2* en líneas T1 muestran que la línea transgénica L9 (0.9) tuvo el más alto nivel de expresión relativa que las otras cuatro líneas T1; L7 (0.66), L2 (0.53), L4 (0.50) y L3 (0.41) ($P < 0.001$). Todas las plantas T1, transformadas y no transformadas, amplificaron el gen 18S ribosomal, indicando que el análisis de expresión observado es producto de la presencia del gen *pdf 1.2*.

La expresión transcripcional de gen *pdf1.2* en las plantas transformadas T3 resistentes y tolerantes a *C. lindemuthanium* muestran que las plantas resistentes a la cepa 448 fue la L9, esta expresa los más altos niveles de expresión del gen *pdf1.2* (0.91), mientras que las plantas de las líneas L2(cepa 1472), L7 (cepa 1472) y L4 (cepa 448 o 1472) tuvieron los valores más bajos de expresión, con respuesta de resistencia o tolerancia (0.61-0.76) (Figura 4). Por otra parte, no hubo diferencia estadística en los niveles de expresión entre las plantas resistentes y tolerantes (Espinosa *et al.*, 2013).

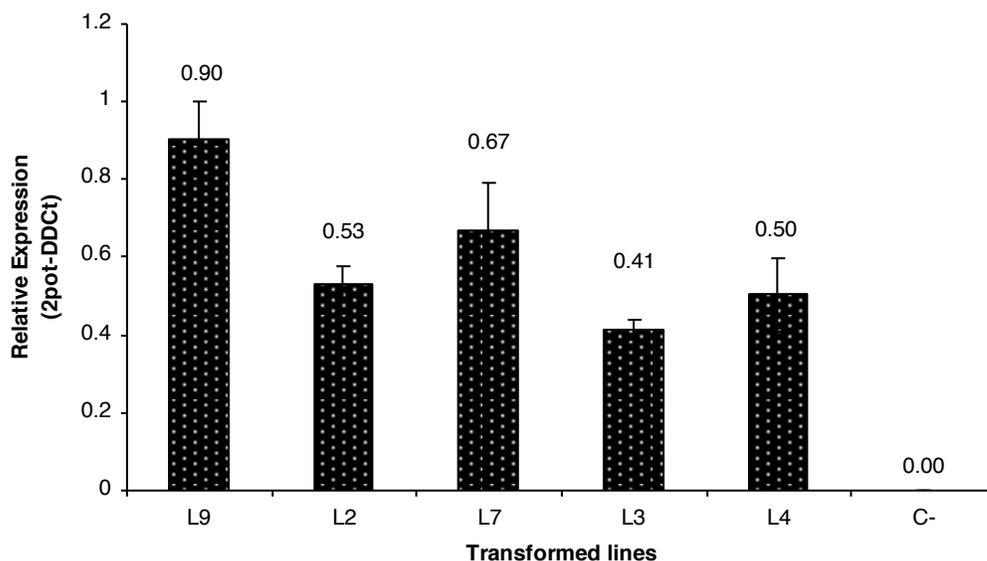


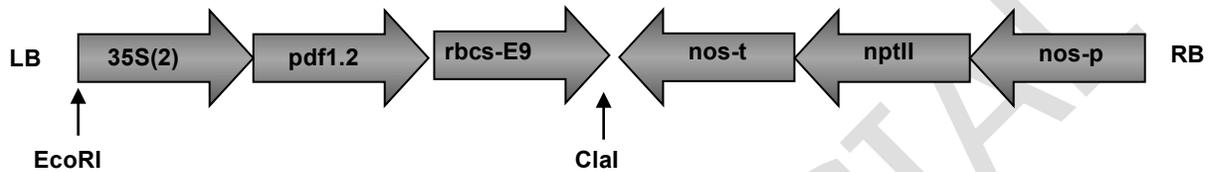
Figura 4. Expresión transcripcional por PCR cuantitativo del gen *pdf1.2* en 5 líneas independientes de frijol modificadas genéticamente.

Referencias

- Maldonado C., Álvarez E. L. y Castellanos J. (comp.) 2007. Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 70 p.
- Hoebbeck J, Speleman F, Vandesompele J. 2007. Real-time quantitative PCR as an alternative to Southern blot or fluorescence in situ hybridization for detection of gene copy number changes. *Methods Mol Biol.* 2007; 353:205-26.
- Solomon S. Peter, Simon V.S. Ipcho, James K. Hane, Kar-Chun Tan, Richard P. Oliver. (2008) A quantitative PCR approach to determine gene copy number. *Fungal Genetics Reports* 55:5-8.

Yuji Huang, Xueren Yin, Changqing Zhu, Weiwei Wang, Donald Grierson, Changjie Xu1, Kunsong Chen. 2013. Standard Addition Quantitative Real-Time PCR (SAQPCR): A Novel Approach for Determination of Transgene Copy Number Avoiding PCR Efficiency Estimation. PLoS ONE 8(1): e53489. doi:10.1371/journal.pone.0053489

1.10 Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres, expresión de las proteínas y su localización



Elementos	Origen y función
RB Right Border	Fragmento de DNA que contiene la secuencia del borde derecho (24 pb) del gen de la nopalina sintasa tipo T-DNA, derivado de <i>A. tumefaciens</i> . La secuencia del borde derecho se utiliza como el punto de iniciación del T-DNA de transferencia de <i>A. tumefaciens</i> al genoma de la planta.
T-nos	Región 3' de transcripción de la nopalina sintasa (nos) gen derivado de <i>A. tumefaciens</i> . Termina la transcripción del RNAm e induce la poliadenilación.
nptII	Gen derivado del transposón TN5 de <i>E. coli</i> (Referencia 61). Codifica a la neomicina fosfotransferasa II y confiere resistencia en la planta a la kanamicina. Utilizado como marcador selectivo de la planta transgénica durante la transferencia de genes.
P-35S(2)	Región promotora 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Involucrado en la expresión constante del gen blanco en todos los tejidos de la planta
rbcS-E9	Pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polyadenylation site
pdf1.2	Gen que codifica la proteína PDF1.2
LB Left Border	Fragmento de DNA que contiene la secuencia del borde izquierdo (25 pb) derivadas de <i>A. tumefaciens</i> . Es el punto de terminación del T-DNA (DNA de transferencia) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> al genoma de la planta.

Expresión de proteínas y localización

El análisis de expresión de la proteína defensina se encuentra en proceso, esto se realizará mediante Western Blot. La especificidad de Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés, en este caso de la defensina. Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de nuestra proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras.

En nuestro laboratorio se está estableciendo la técnica para identificar la proteína defensina, codificada por el gen *pdf 1.2* insertado en plantas de frijol cultivar Flor de Mayo Anita. Se aislará la proteína total de tejido foliar de la planta, mediante disrupción mecánica con un homogeneizador que disgrega el tejido y así lograr el fraccionamiento subcelular. Posteriormente se llevará a cabo la determinación de la concentración total de proteína por el método de Bradford utilizando placas de lectura en un espectrofotómetro (Multiskan EX) a 590 nm, se tomará como referencia la concentración estándar conocida (γ -globulina). Las proteínas en el extracto se separan de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis. Se preparan en un gel de acrilamida, bisacrilamida (10%) en dodecilsulfato de sodio (SDS), el gel se une a las proteínas y confiere, de forma proporcional a la masa de cada proteína, una carga negativa a cada una de ellas. Las proteínas son transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa la cual es un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así que la hibridación de un anticuerpo las pueda detectar utilizando un campo eléctrico. Posteriormente se efectúa el bloqueo de la membrana con una solución de leche baja en grasa al 5%, para bloquear las zonas con ausencia de proteínas y prevenir la unión no específica de anticuerpos y otras proteínas involucradas. A continuación se incubaba con un anticuerpo primario dirigido contra el epítipo específico de la proteína diana. Tras varios lavados de la membrana, se adiciona un anticuerpo secundario marcado que se unirá de forma específica al anticuerpo primario, proporcionando una forma de detección.

Los anticuerpos para la proteína defensina ya se encuentran desarrollados y disponibles en el laboratorio. En este tipo de inmunoensayos para la detección de OGM es de vital importancia la selección y caracterización adecuada de las proteínas que actúan como antígenos. La pureza de un antígeno debe ser idealmente mayor del 75% (Miraglia *et al.*, 2004). Algunas características de los antígenos que determinan la probabilidad de éxito, son: tamaño, hidrofobicidad, estructura terciaria, maduración de proteínas y glicosilación. Posiblemente la mayor variable asociada a los inmunoensayos es el tipo de antígeno empleado para la producción de anticuerpos (Miraglia *et al.*, 2004; Anklam *et al.*, 2002). La especificidad de determinado anticuerpo por un epítipo único permite que el uso de esta tecnología sea ideal para la detección cuantitativa y cualitativa de proteínas. Una de las principales ventajas de emplear inmunoensayos para la detección de OGM es su alta especificidad, lo que permite el reconocimiento de una sustancia antigénica aún cuando haya presencia de sustancias contaminantes (Lübeck, 2007; Ahmed, 2002, Anklam *et al.*, 2002).

Finalmente se llevará a cabo el revelado en donde se emplea un método quimioluminiscente. Después de un lavado de la membrana para eliminar el anticuerpo no unido, se procede a detectar

la localización de la banda en la membrana. Para la detección de quimioluminiscencia, se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa (HRP); la adición de un sustrato de HRP provoca una reacción enzimática que da como resultado final la emisión de luz. Dicha luz puede ser detectada en una película de rayos X, o de forma digital, mediante un sistema de captación de imágenes. La detección de fluorescencia se basa en la captación de luz emitida por sustancias fluoróforas conjugadas con el anticuerpo secundario.

El modelo tecnológico de frijol genéticamente modificado denominado FMA-pdf1.2-INIFAP con resistencia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos se encuentra en desarrollo en el invernadero de contención de OGM, para cosechar la hoja y proceder al análisis western.

Referencias

- Ahmed F. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods TRENDS in Biotechnology. 20(5):215-223.
- An G, Watson BG, Stachel S, Gordon MP, Nester EW. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J. 4:277-284.
- Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H. and Van Den Eede G. 2002. Analytical Methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms in Agricultural Crops and Plant- Derived Food Products. European Food Research Technology. 214:3–26.
- Lübeck, M. 2007. Detection of Genetically Modified Plants. Danish Forest and Nature Agency.
- Maldonado C., Álvarez E. L. y Castellanos J. (comp.) 2007. Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 70 p.
- Miraglia M., Berdal K., Brera C., Corbisier C., Holst-Jensen A., Kok E., Marvin H., Schimmel H., Rentsch J., van Rie J. and Zagon J. 2004. Detection and Traceability of Genetically Modified Organisms in the Food Production Chain. Food and Chemical Toxicology 42: 1157–1180.
- Schardl C, Byrd AD, Benzion GB, Altschuler MA, Hildebrand DF, Hunt AG. (1987). Design and construction of a versatile system for the expression of foreign genes in plants. Gene 61:1-11.
- Towbin, H. et. al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9):4350-4.

1.11 Descripción del método de transformación

El método de transformación fue por medio de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV2260 empleando como explante inicial hipocotilos (Espinosa *et al.*, 2013).

La germinación de las semillas, la disección de los hipocótilos y los componentes de los medios fueron descritos anteriormente (Quintero-Jiménez et al., 2010). El medio líquido GM (Gamborg et al., 1968), modificado con 2 % de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ piridoxina, 10 mg L⁻¹ de tiamina, fue agregado a las cepas GV2260 de *A. tumefaciens* cultivadas a O.D.₆₀₀ = 0.8 en una proporción 5:1 (v/v). Los hipocotilos se incubaron en esta solución durante 10 min con movimiento suave. Después de este tiempo, el líquido se desechó y el exceso se eliminó con toallas de papel estériles. Los explantes se colocaron en un medio de co-cultivo, que consistió en un medio de inducción y multiplicación (IMM) (Quintero-Jiménez et al., 2010) al que se le agregaron 200 µM de acetosiringona. Los explantes se incubaron en un medio de co-cultivo durante 5 días a 25° C, 16 h de luz (45 - 70 µmol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad (Espinosa et al., 2013).

1.12 Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de los efectos no esperados.

Sitio de inserción

El número de copias, el sitio de inserción y las secuencias irrelevantes del evento de transformación en el genoma de frijol se propone realizarlo a través de la secuenciación masiva. Esta tecnología tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones).

Se establecerá un convenio con el laboratorio del Centro Nacional de Referencia de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) de SENASICA, Sin embargo cabe mencionar que éste laboratorio cuenta con todo el equipo necesario para llevar a cabo este análisis, pero aún está trabajando en un protocolo establecido para frijol, para insertos de bajo peso molecular (como en nuestro sistema) . además aunado a esto nuestro sistema

1.13 Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples

Secuencia de aminoácidos

80 Aminoácidos de defensiva

makfasiitl ifaallvfaa fdapamveaq klcekpstgw sgvcgnsnac knqcinlega khgscnyvfp ahkcicyvpc

Tamaño del producto del gen pdf 1.2

PUNTO FINAL

NCBI Reference Sequence: NM_123809.3

>gi|30694524|ref|NM_123809.3| Arabidopsis thaliana ethylene- and jasmonate-responsive plant defensin mRNA, complete cds

```
ACACAACACATACATCTATACATTGAAAACAAAATAGTAATAATCATCATGGCTAAGTTTGCTTCCATCA
TCACCCCTTATCTTCGCTGCTCTTGTCTCTTTGCTGCTTTTCGACGCACCGCAATGGTGGGAAGCACAGAA
GTTGTGCGAGAAGCCAAGTGGGACATGGTCAGGGTTTTCGGGAAACAGTAATGCATGCAAGAATCAGTGC
ATTAACCTTGAAGGAGCCAAACATGGATCATGCAACTATGTCTTCCCAGCACACAAGTGTATCTGTTACG
TCCCATGTTAAATCTACCAATAATCTTTGGTGCTAAATCGTGTGTATTTTACATAAAATAAGTCTCTGTC
ACTCTATGAGTAACTTTATGACATGCATATTTCTGTTTTAATGTTTATTTTCCCCTTGTGTTACAATAA
TATAAAAATAATTTATGT
```

Tamaño del producto = 316

Sentido pdf1.2 primer 1 CATCATGGCTAAGTTTGCTTCC 22
Template 45

Antisentido pdf1.2 primer 1 CTCATAGAGTGACAGAGACT 20
Template 360

PCR Q

NCBI Reference Sequence: NM_123809.3

>gi|30694524|ref|NM_123809.3| Arabidopsis thaliana ethylene- and jasmonate-responsive plant defensin mRNA, complete cds

```
ACACAACACATACATCTATACATTGAAAACAAAATAGTAATAATCATCATGGCTAAGTTTGCTTCCATCA
TCACCCCTTATCTTCGCTGCTCTTGTCTCTTTGCTGCTTTTCGACGCACCGCAATGGTGGGAAGCACAGAA
GTTGTGCGAGAAGCCAAGTGGGACATGGTCAGGGTTTTCGGGAAACAGTAATGCATGCAAGAATCAGTGC
ATTAACCTTGAAGGAGCCAAACATGGATCATGCAACTATGTCTTCCCAGCACACAAGTGTATCTGTTACG
TCCCATGTTAAATCTACCAATAATCTTTGGTGCTAAATCGTGTGTATTTTACATAAAATAAGTCTCTGTC
ACTCTATGAGTAACTTTATGACATGCATATTTCTGTTTTAATGTTTATTTTCCCCTTGTGTTACAATAA
TATAAAAATAATTTATGT
```

Tamaño del inserto= 59

Sentido pdf1.2 1 AGTTGTGCGAGAAGCCAAGT 20
Template 140

Antisentido pdf1.2 primer 1 GCATGCATTACTGTTTCCGCAA 23
Template 198

Sonda 1 CCCTGACCATGTCCC 15
Template 174

Expresión de copias múltiples

Por el momento el análisis de segregación observado en nuestro sistema evidencia que hay una única inserción, esto nos indica que no hay evidencia de copias múltiples, se verificara la presencia de copias múltiples tándem a través de la secuenciación.

1.14 Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgén y sus cambios

La proteína defensina no presenta efecto en el metabolismo de la planta en cada uno de los eventos en forma individual. El frijol tiene genes homólogos a la defensina caracterizados como genes PR que forman parte de la resistencia adquirida sistémica los cuales son transcritos por efecto de inducción derivado del ataque de patógenos. La secuencia de *pdf1.2* no es encontrada en plantas no modificadas genéticamente por lo que no se espera que presente efectos interactivos en el metabolismo de la planta debido a que involucran distintos modos de inducción.

1.15 Productos de degradación de la proteína codificada por el transgén en subproductos

La proteína se encuentra en el apoplasto por efecto de la acción del péptido de tránsito el cual asegura que la proteína tenga actividad intercelular. El péptido de tránsito es removido de la proteína de fusión y eliminado por proteasas endógenas después de que la proteína de interés es transferida.

1.16 Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras (promotores, terminadores y otras), descripción, número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora

35S (808 pb) (AF234300.1 NCBI) Esta secuencia está inmersa en la siguiente

```
gaattcccgatcctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtggcactacaaatgcatcattgcgataaaggaaaggcta  
tcgttcaagatgcctctgccacagtggtcccaaagatggacccccacccagaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtct  
taaagcaagtggattgatgtgatctccactgacgtaaggatgacgcacaatcccactatccttcgaagacccttctctatataagga  
agttcatttcattggagaggacacgctgaaatcaccagctctctctacaagatctctagacgatcgtttcgcgatg
```

ó

35S

```
agattagcctttcaatttcagaaagaatgctaaccacagatggttagagaggcttacgcagcaggtctcatcaagacgatctaccgagca  
ataatctccaggaatcaataccttccaagaaggttaaagatgcagtcaaaagattcaggactaactgcatcaagaacacagagaaaga  
tatatttcaagatcagaagtactattccagatggacgattcaaggttgccttcacaaaccaaggcaagtaatagagattggagctcttaa  
aaagtgattcccactgaatcaaaagccatggagtcгааagattcaaatagaggacctaacagaactcgcgtaaagactggcgaacagttc  
atacagagctcttacgactcaatgacaagaagaaaatcttctgcaacatggtggagcacgacacactgtctactccaaaaatatcaaga  
tacagtctcagaagaccaaaagggcaattgagactttcaacaaagggtaatatccggaacctcctcgattccattgccagctatctgtca  
ctttattgtgaagatagtgaaaaggaaggtggctctcaaatgcatcattgcgataaaggaaaggccatcgttgaagatgcctctgccg  
acagtggtcccaaagatggacccccacccagaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgttcaaagcaagtggattgatg
```

tgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagacccttctctatataaggaagttcatttcatttgagaga
acacg

rbcs 3' UTR (297 pb) (FM177582.1 NCBI)

tcattctcaaattaatattatttgtttttcttatttgttgtgttgaattgaaattataagagatatgcaaacattttgttttgagtaaaaatg
tgtcaaatcgtggcctctaatgaccgaagtaatatgaggagtaaaacactttagttgtaccattatgcttattcactaggcaacaatatatt
ttcagacctagaaaagctgcaaattactgaatacaagatgtcctctgtgttttagacattatgaactttcctttatgtaattttccagaatc
ctgtcagattctaactattgctttataattatagttatactcatggattttagttgagatgaaaatatttttaagcattttatgacttgccaa
ttgattgacaacatgcatcaat

nos-t (256 pb) (AF485783.1 NCBI)

gatcgttcaaacatttgcaataaagtttctaagattgaatcctgttccggcttgcgatgattatcatataatttctgtgaattacgttaagc
atgtaataattaacatgtaatgcatgacgttatttatgagatgggttttatgattagagtcgcccaattatacatttaatacgcgatagaaaac
aaaatatagcgcgcaaactaggataaattatcgcgcggtgtcatctatgttactagatctctag

nptII (790 pb) (AAR17784.1)

atgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctg
ctctgatgcccgcttccggctgtcagcgcaggggcccgggtcttttgcagaccgacctgtccgggtccctgaatgaactcaggac
gaggcagcgggctatcgtggctggccacgacggcgcttcttgcgcagctgtgctcagcttgcactgaagcgggaaggactggctgct
attgggcgaagtccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctcctccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatcggcggctgcat
acgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaacatcgcacgcagcagcactcggatggaagccggcttctgcatca
ggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttccaggtcaaggcgcgatgccgacggcggatgatctcgtc
gtgacctatggcggatgctgcttccgaatatcatgggtgaaaatggcgccttttctggattcatcactgtggcgggctgggtgtggcggacc
gctatcaggacatagcgttggctaccctgtatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcctgctttacggtatcggcc
tcccattcgcagcgccttctatcgccttcttgcaggttcttctga 795

ó

tctcagatctcggtagcgggcaggaccggcggggcggtaaccggcaggctgaagtccagctgccagaaaccacgtcatccagttcccgtg
cttgaagccggcccccagcatgccgccccggggcatatccgagcgcctcgtgcatgcccacgctcgggtcgttggcagcccgatgacag
cgaccacgctcttgaagccctgtgcctccagggacttcagcaggtgggttagagcgtggagcccagctccgctccgctggcggggggag
acgtacacggctgactcggccgtcagctgtaggcgttgcgtgccttcaggggcccgcgtaggcgatccggcgcacctcgcctccacctg
gagcagaccaggatagcgtccccgagacggacgaggtcgtccgtccactcctcgggttctcggctcggtagcgaagttagcctgtct
gtctcgtatgtaggtgacgatggtgcagaccgccgatgtccgcctcgggtggcagcgggatgtcggccggcgctcgttctgggttcat
554

nos-p (307 pb) (HM047294.1 NCBI)

gatcatgagcgggagaattaaggagtcacgttatgacccccccgatgacgcgggacaagccgttttacgttggactgacagaaccgcaa
cgttgaaggagccactcagccggtttctggagttaatgagctaagcacatacgtcagaaaccattattgcgcttcaaaagtgcctaa
ggtcactatcagctagcaaatatttctgtcaaaaatgctccactgacgttcataaattcccctcgggtatccaattagagtctcatattcactct
caatccaataatctgaccggatct

Número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora.

El análisis de segregación inicial (T1) indica una proporción 3:1 evidenciando la presencia de una copia en el genoma de las líneas de frijol modificadas genéticamente (Cuadro 2) (Sección 1.19). El sitio de inserción y las secuencias irrelevantes del evento de transformación en el genoma de frijol se propone realizarlo a través de la secuenciación masiva. Esta tecnología tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones).

Se establecerá un convenio con el laboratorio del Centro Nacional de Referencia de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) de SENASICA, pues éste laboratorio cuenta con todo el equipo necesario para llevar a cabo este análisis, pero aún está trabajando en un protocolo establecido para frijol, para insertos de bajo peso molecular (como en nuestro sistema).

1.17 Patogenicidad o virulencia de los organismos receptores y donadores

Organismo donador del gen *pdf1.2 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Brassicacea

Organismo receptor *Phaseolus vulgaris* L.

No hay evidencias relativas a la posibilidad de que tanto el organismos donador (*Arabidopsis thaliana*) como el receptor (*Phaseolus vulgaris*) tengan características de patogenicidad o virulencia. El primero ha sido ampliamente estudiado como modelo de estudio en análisis genotípicos y fenotípicos, y el segundo como cultivo de amplio consumo.

1.18 Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotipo que confiere estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de estos genes

El gen *nptII* (790 PB) (AAR17784.1) es empleado como gen de selección en el evento de transformación. Este gen confiere resistencia a kanamicina a las células transformadas. El modo de acción incluye a la enzima bacteriana (*Escherichia coli*) que cataliza la fosforilación del antibiótico aminoglicósidos incluyendo la neomicina y kanamicina. La reacción envuelve la transferencia del grupo γ del adenosin trifosfato (ATP) a la molécula del antibiótico, la cual detoxifica al antibiótico previniendo su interacción con su molécula blanco – el ribosoma.

1.19 Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgén

El análisis de segregación inicial (T1) indica una proporción 3:1 evidenciando la presencia de una copia en el genoma de las líneas de frijol modificadas genéticamente (Cuadro 2). Los análisis de segregación posteriores (T2 a T5) establecen la presencia de los principales genes contenidos en el evento de transformación por medio de PCR punto final y tiempo real.

Cuadro 2. Prueba χ^2 de análisis de segregación en plantas resistentes a kanamicina en plantas de T1 de frijol modificado genéticamente.

	Observado		Esperado		χ^2
	Kan ^{Ra}	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
L2	69	10	59.25	19.75	6.41* ^b
L3	43	5	36	12	5.44*
L4	29	16	33.75	11.25	2.66*
L7	74	30	78	26	0.81*
L9	80	27	80.25	26.75	0.003*

^a El fenotipo evaluado fue Resistencia a kanamicina (Kan^R) o susceptibilidad (Kan^S). No se hizo distinción entre plantas homocigotas y heterocigotas.

^b χ^2 tab 1 gl, 99%=6.63

En la figura 5 se puede observar la detección de los diferentes componentes de la construcción en el genoma de frijol GM en la generación T0, mientras que en la figura X por PCRQ podemos observar que las mismas líneas de la generación T1 que se detectaron con el gen pdf 1.2 son las que se detectaron en punto final, esto nos indica la estabilidad del gen a través de las diferentes generaciones.

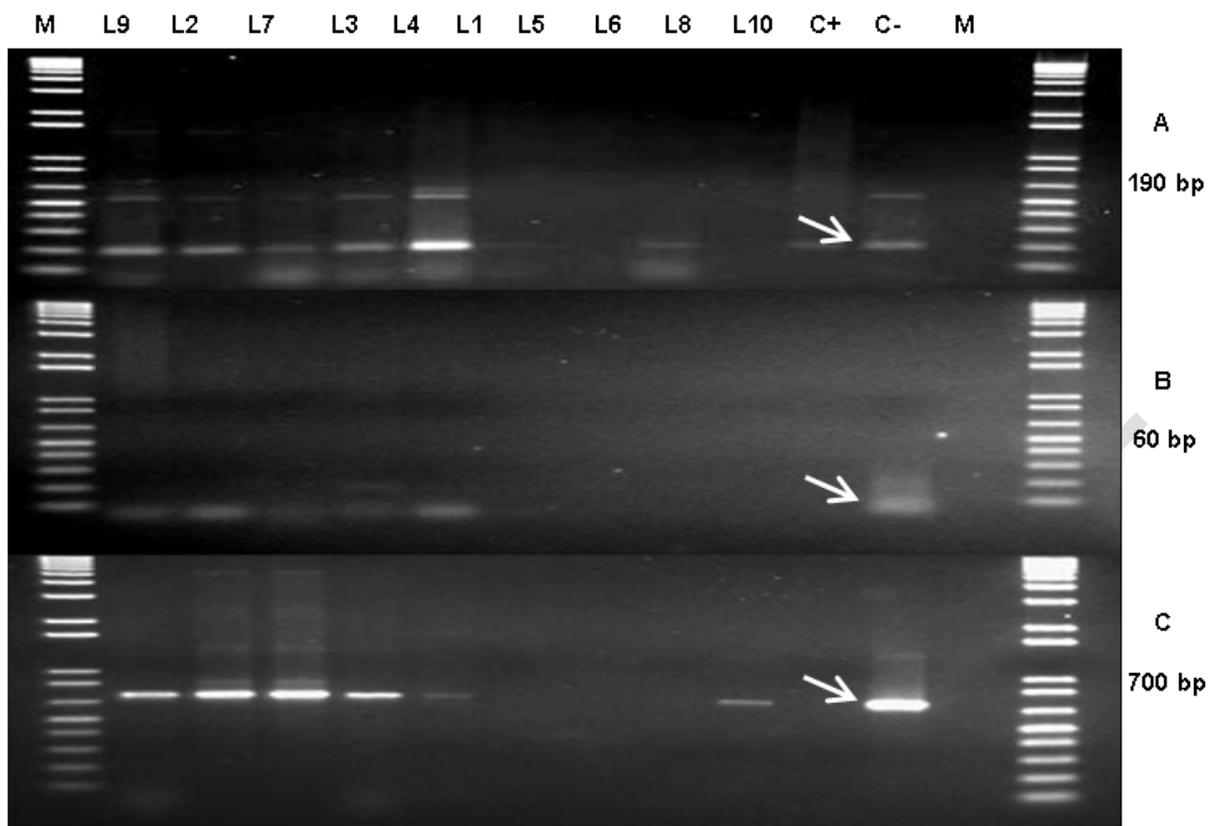


Figura 5. Amplificación por Punto final .: A, *35S*; B, *pdf1.2* y C, *nptII*. Líneas de 1 a 10: plantas resistentes a kanamicina; C+ (A): pGEM-T plasmido con el promotor 35-S; C+ (B): pKYLX80 plasmido; C+ (C): pCAMBIA 2300 plasmido; C-: Agua; M: marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen, Inc.).

2.1 Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

Metodología para la liberación experimental de frijol FMA-pdf1.2-INIFAP en el Campo Experimental Bajío.

Muestreo de suelo

Durante el mes de septiembre del 2013, se realizó un muestreo en el lote 1 del Campo Experimental Bajío, con el propósito de extraer muestras de suelo, a diferentes profundidades, 5, 10 y 15 cm., respectivamente, y realizar un escrutinio de la microbiota existente. Las muestras de suelo fueron etiquetadas, de tal manera que no haya errores al momento de procesarlas, estas fueron llevadas al laboratorio de cultivo de tejidos, que se encuentra en la Unidad de Biotecnología. De cada muestra se tomó un gramo, y de éste se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} en tubos de Ensaye con 9 mL de agua destilada estéril, se colocaron 0.1 mL de cada dilución por triplicado en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo Agar Agua (AA), para el recuento de hongos patógenos (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.*), así como hongos benéficos (*Trichoderma sp.*) específicamente.

Aislamiento y purificación de hongos

Al obtener el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), por gramo de suelo, se realizaron aislamientos de hongos de los géneros antes mencionados, con el propósito de ser utilizados en experimentos posteriores, el aislamiento se realizó mediante la extracción de punta de hifa, y esta fue colocada en cajas de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), para el caso de *R. solani* solo se verificó que no existía crecimiento de algún contaminante, para los otros 2 hongos se les dió tiempo suficiente para su esporación, y así realizar una suspensión de esporas y obtener un cultivo monospórico.

Pruebas de patogenicidad *in vitro*

De las cepas de microorganismos aislados, se seleccionaron al azar las más representativas, donde se confrontaron los hongos patógenos vs. *Trichoderma*, esta prueba se realizó utilizando cajas Petri con PDA, donde se colocó un fragmento de colonia de un patógeno (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*) en un extremo y en el otro extremo un fragmento de colonia de *Trichoderma*. Transcurridos 10 días o en cuanto el hongo haya crecido en toda el área de la caja Petri, se midió el diámetro de crecimiento del patógeno y en base a ello se obtuvo el porcentaje de inhibición de *Trichoderma*.

Según los resultados obtenidos se seleccionó la cepa de *Trichoderma* que tuvo el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento contra los patógenos. Esta cepa será utilizada como tecnología control de patógenos de raíz y será contrastada con la eficacia biológica del gen *pdf1.2* para proveer protección contra hongos de raíz.

Germinación en invernadero

Trescientas semillas de cada uno de los genotipos a utilizar en el experimento (Pinto Villa, Bayo Mecentral, Flor de Mayo Anita, FMA-pdf1.2-INIFAP, Canario 60 y Flor de Junio Marcela), se germinarán previamente en el invernadero para asegurar la sobrevivencia de las 10 plantas por metro lineal que se trasplantarán en campo abierto, y asegurar el tamaño de la población experimental hasta la inoculación con los patógenos. Es importante mencionar que las plantas control ya habrán sido inoculadas con *Trichoderma*, donde se le agregarán 3 mL de esporas a una concentración de 9×10^7 conidios/mL, por cada 10 g de semilla de frijol, concentración recomendada por Samaniego-Gaxiola y Gámez-Escobedo (2000).

Establecimiento en campo de la línea FMA-pdf1.2-INIFAP de frijol

Diseño del estudio

Material de Prueba: Frijol FMA-pdf1.2-INIFAP

Controles: Flor de Mayo Anita (FMA), Flor de Junio Marcela (FMJ), Pinto Villa (PV), Bayo Mecentral 90 (ByM) y Canario 60 (C60), son genotipos obtenidos bajo el sistema de mejoramiento convencional. El objetivo de utilizar 5 genotipos como controles es validar la efectividad de los hongos patógenos de la raíz (*Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*) inoculados en materiales de frijol previamente caracterizados respecto a su tolerancia/resistencia o susceptibilidad a estos patógenos y así establecer la efectividad biológica de FMA-pdf1.2-INIFAP.

Características de los testigos

FMA: Tiene hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III; presenta resistencia a los biotipos de Virus del Mosaico Común del frijol (BCMV), resistencia media-alta a las razas de roya presentes en la región central de México y moderadamente resistente al tizón común y antracnosis (Castellanos *et al.*, 2003).

FMJ: Tiene hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III, presenta resistencia a los biotipos de Virus del Mosaico Común del frijol (BCMV), moderadamente susceptible a roya, algunas razas de antracnosis, tizón de halo y común (Rosales *et al.*, 2004).

PV: Hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III; es resistente a la antracnosis, tolerante a la roya y pudriciones de la raíz. Moderadamente susceptible al tizón común tizón de halo (Rosales *et al.*, 2004).

ByM: Posee hábito de crecimiento indeterminado postrado tipo III, es resistente al ataque de antracnosis, tolerante al ataque de roya, tizón común, tizón de halo y pudriciones de raíz (Rosales *et al.*, 2004).

C60: Hábito de crecimiento determinado (mata) tipo I, susceptible a pudriciones de raíz, estrés hídrico (Acosta-Gallegos, comunicación personal).

Sitio para el establecimiento del ensayo: Se establecerá este experimento en el lote 1, del Campo Experimental Bajío del INIFAP, bajo un manejo agronómico tradicional.

Descripción del diseño experimental

Diseño: Bloques son un conjunto de parcelas, donde se despliegan las 48 combinaciones, obtenidas de los 8 tratamientos y los 6 genotipos, las cuales constituyen una repetición. Estos bloques tendrán un diseño completo al azar con 3 repeticiones (Figura 6).

Dimensiones de parcela: El nombre de parcela se asigna al espacio que contiene un conjunto de surcos a los cuales se aplica el tratamiento según la combinación asignada; cada bloque reunirá 6 parcelas y cada parcela estará conformada de 8 surcos.

- Distancia entre surcos: 76 cm (0.76 m lineales)
- Longitud de surcos: 3 metros lineales
- Numero de surcos por parcela: 8; la disposición en campo contempla separación entre parcelas (1m); las calles separan entre repeticiones (bloque) 3 surcos (2.28 m).
- Numero de surcos por combinación: 1
- Superficie de parcela experimental: 3 m lineales; longitud de surco x 6.08 m lineales (8 surcos x 0.76 m de distancia entre ellos)= 18.24 m²
- Superficie por bloque: 23 m lineales, incluyendo calle entre parcelas x 6.8m lineales = 139.84 m²
- Superficie total del experimento: Incluyendo calles y bordos 35.44 m lineales x 35 m lineales = 1240.4 m²
- Superficie de parcela útil: 1 surco de 3m de longitud, a los cuales solo se tomara 2 metros eliminando 0.5 m de los extremos.
- Tipo de siembra: manual; se trasplantarán 30 plantas de frijol por surco.

Información sobre tratamientos

Se establecerán las plantas de frijol del material de prueba (FMA-pdf1.2-INIFAP) y controles bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. La combinación de los tratamientos y los genotipos se aprecian en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Combinación de tratamientos y genotipos a utilizar.

Tratamientos	Genotipos						
	1	2	3	4	5	6	
A	FMA T*	FMA	FJM	C60	PV	BYM	
A	Trichoderma (T)	A1	A2	A3	A4	A5	A6
B	Fusarium (F)	B1	B2	B3	B4	B5	B6
C	Rhizoctonia (R)	C1	C2	C3	C4	C5	C6
D	TF	D1	D2	D3	D4	D5	D6
E	TR	E1	E2	E3	E4	E5	E6
F	FR	F1	F2	F3	F4	F5	F6
G	TFR	G1	G2	G3	G4	G5	G6
H	H ₂ O (testigo)	H1	H2	H3	H4	H5	H6

*FMA T= FMA-pdf1.2-INIFAP, FMA= Flor de Mayo Anita, FJM= Flor de Junio Marcela, C60= Canario 60, PV= Pinto Villa y BYM= Bayo Madero 90.

El ensayo estará rodeado por un bordo de frijol de la variedad Pinto Saltillo, donde a los laterales habrá siete surcos de 35 metros de qué longitud y en los extremos (anterior y posterior) surcos de cinco metros de longitud.

En el Cuadro 4 se mencionan de manera resumida la cantidad de plantas que serán utilizadas en el ensayo, así como las dimensiones de parcelas, bloque y distancias entre surcos, etc.

Cuadro 4. Cantidad de plantas de frijol FMA-pdf1.2-INIFAP y genotipos convencionales a utilizar en el diseño experimental.

Características de diseño experimental	Genotipos					
	FMA-pdf1.2-INIFAP	FMA	FJM	C60	PV	BYM
Surcos	8	8	8	8	8	8
Distancia entre surco	0.76 m	0.76 m	0.76 m	0.76 m	0.76 m	0.76 m
Distancia entre bloque	2.28 m	2.28 m	2.28 m	2.28 m	2.28 m	2.28 m
Metros lineales de siembra/parcela (1)	24 m	24 m	24 m	24 m	24 m	24 m
Plantas/metro lineal (2)	10	10	10	10	10	10
Plantas para las 48 combinaciones (3)	240	240	240	240	240	240
Cantidad de planta total en ensayo con 3 repeticiones (bloques) (4)	720	720	720	720	720	720
Planta total/bloque (5)			1440			

(1)= 8 surcos de 3 metros lineales cada uno = 24 m lineales

(2)= 10 plantas por metro lineal x 3 m lineales = 30 plantas por surco

(3)= 30 plantas por surco x 8 tratamientos = 240 plantas

(4)= 240 plantas por bloque por 3 repeticiones= 720 plantas por genotipo para el ensayo.

(5)= 30 plantas por surco; 30 plantas por 48 combinaciones (bloque) = 1440 plantas

Se anexa croquis representativo del experimento (Figura 6).

Diseño experimental: Bloques completos al azar con 3 repeticiones.

Se utilizaran 8 tratamientos de diferentes microorganismos y 6 genotipos de frijol, con combinaciones respectivas, obteniendo 48 combinaciones como se muestra en el cuadro 3.

Inoculación de microorganismos (tratamientos) a genotipos de frijol

Trichoderma spp.: Microorganismo fungoso que posee cualidades para controlar de forma biológica enfermedades radiculares ocasionadas por hongos fitopatógenos (*Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Pythium*, etc.) en diferentes cultivos.

Las semillas serán inoculadas con *Trichoderma*, a las que se les agregará 3 mL de esporas a una concentración de 9×10^7 conidios/mL, por cada 10 g de semilla de frijol, también se le agregarán 2 gotas de Tween 20® como adherente (Samaniego-Gaxiola y Gámez-Escobedo, 2000).

Fusarium oxysporum: Forma parte de un complejo de hongos patógenos que ocasionan pudriciones de raíz al igual que otros como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, entre otros, afectando diversos cultivos (Bolkan, 1980). En el cultivo de frijol es el agente causal de la enfermedad conocida como amarillamiento o marchitamiento por *Fusarium*. Este hongo invade y deteriora el sistema vascular de la planta, por lo que la planta se marchita y finalmente muere. A los tratamientos que se inoculan con este patógeno, será de la siguiente manera; las plantas se sacaran con cepellón de las charolas germinadoras, a las cuales se les cortara una tercera parte del mismo, con el propósito de ocasionar heridas y el hongo pueda entrar a los vasos xilémicos de forma fácil y rápida, para ello se utilizará una concentración de 1×10^6 conidios/mL (CIAT, 2011), donde se sumergirá el cepellón en la suspensión conidial por 5 minutos (Sánchez-García, et al. 2006). La inoculación se realizará al momento del trasplante.

Rhizoctonia solani: Al igual que *Fusarium* juega un papel muy importante en las pudriciones de raíz, ya que es uno de los hongos que se encuentra en la mayoría de los suelos y tiene la habilidad de atacar a un amplio rango de hospederos, aunado a que es un patógeno que se trasmite vía semilla (Mora y Blum, 1990). En frijol la pudrición radical ocasionada por este patógeno es muy común, ya que ataca principalmente raíces. Para la inoculación de las plantas con *R. solani* se utilizará cascarilla de arroz o en su defecto grano de trigo infestado con el patógeno, utilizando una dosis de 14.5 g/m² de suelo (Mora, 1996), donde 2 días antes del trasplante se colocará el inóculo a una profundidad de 5 cm del suelo, dando oportunidad a que el patógeno empiece a desarrollarse en el sustrato.

Para el caso de tratamientos con más de un patógeno, se utilizarán las mismas concentraciones para cada patógeno y serán combinadas en el inóculo.

Variables a evaluar

Las variables a evaluar serán: 1) Resistencia/susceptibilidad de la línea transformada FMA-pdf1.2-INIFAP a patógenos de la raíz, comparada con los genotipos testigos., 2) Evaluar el antagonismo (protección) de *Trichoderma* sobre los patógenos inoculados, 3) Evaluar la resistencia de FMA-pdf1.2-INIFAP a la microbiota natural del lugar donde se establecerá el experimento, 4) Evaluar la protección de *Trichoderma* en los 6 genotipos de frijol sobre la microbiota natural del experimento, 5) Días a floración, 6) Días a madurez fisiológica, 7) Rendimiento. También se tomaran lecturas en caso de que se presenten enfermedades foliares, ya que el experimento se establecerá bajo condiciones de temporal (época de lluvias). Las variables que abarcan la fenología del cultivo y lecturas de presencia de enfermedades foliares, se medirán con el objeto de evaluar no solo la resistencia/susceptibilidad de los patógenos de la raíz en el genotipo transformado, sino también saber si el gen insertado a dicho genotipo protege contra otros microorganismos (hongos, bacterias) causantes de enfermedades en el cultivo de frijol.

Las variables serán evaluadas 21 días después de la inoculación, utilizando la escala visual de daño por el CIAT, 1987 (Centro Internacional de Agricultura Tropical), que contempla 9 valores, donde: de 1 a 3: planta resistente, de 4 a 6: planta de reacción intermedia y de 7 a 9: planta susceptible., para ello se extraerán plantas completas para evaluar el daño de la raíz, como es un experimento destructivo se sacaran 10 plantas al azar de los dos metros centrales de la parcela, con el

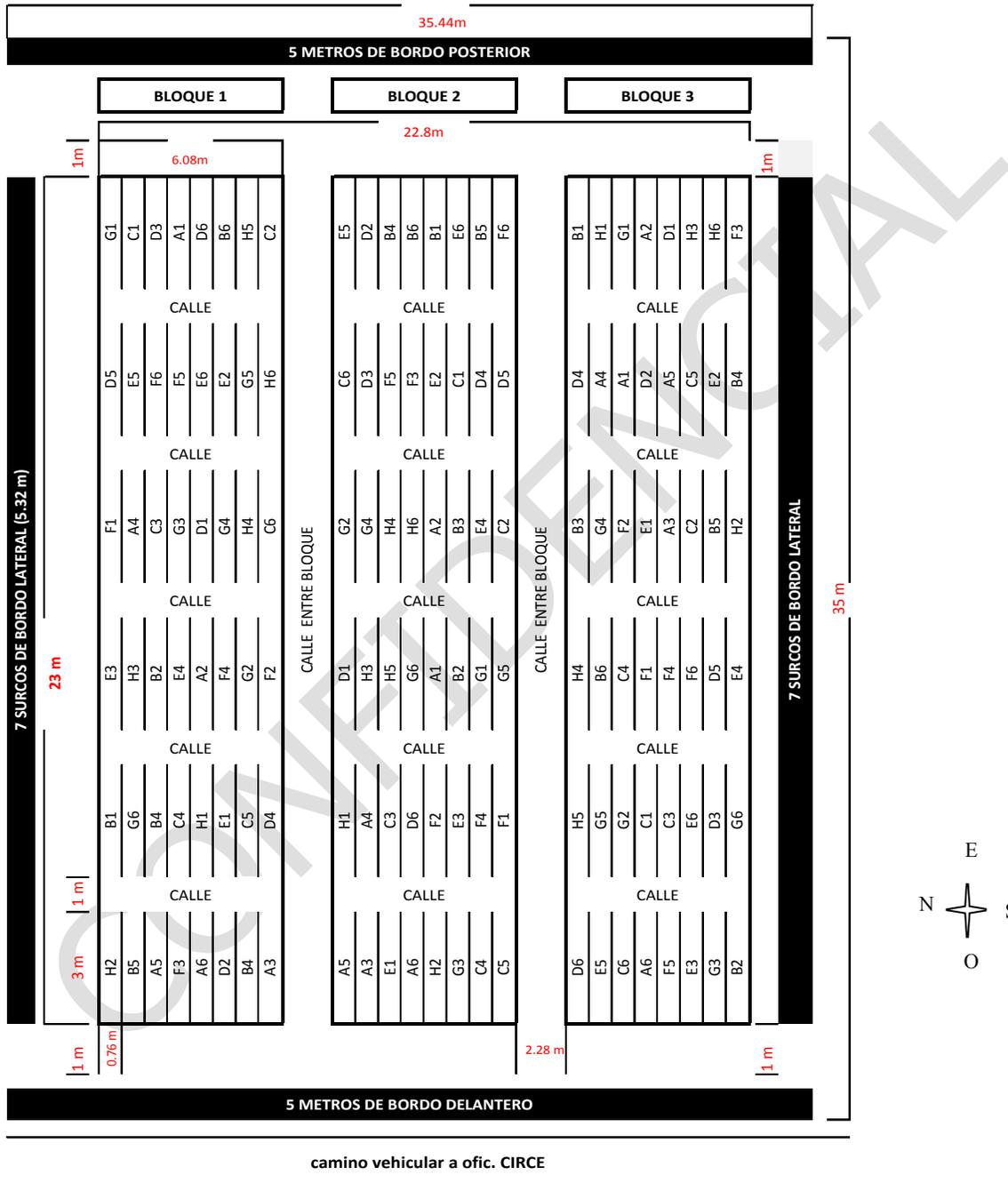
propósito de realizar 2 evaluaciones (21 días después de inoculación de patógenos y madurez fisiológica). Los valores de la variable cinco en adelante solo se obtendrán de las plantas que serán evaluadas en madurez fisiológica.

Análisis estadístico

De acuerdo a las variables a evaluar, con los datos obtenidos, se realizara un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), con el paquete estadístico SAS (1999), para establecer comparaciones entre tratamientos, dentro de parcelas, entre parcelas y dentro y entre bloques., así como también si el genotipo FMA-pdf1.2-INIFAP muestra ser más resistente/tolerante que los testigos a los patógenos de la raíz.

CONFIDENCIAL

Figura 6. Croquis representativo en el lote 1, de ensayo de tolerancia a hongos patógenos de la raíz



Referencias

- Bolkan, H. A. 1980. Las pudriciones radicales. *In*: Schwartz, H. F. y Gálvez, G. E. (eds.). Problemas de producción del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. p. 65-99.
- Castellanos, G., Jara, C., Mosquera, G. 2011. Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 232 p.
- Castellanos, R. J.Z., Guzmán-Maldonado, H., Muñoz-Ramos, J.J., Acosta-Gallegos, J.A. 2003. Flor de Mayo Anita, nueva variedad de frijol para la región central de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 26 (3): 209-211.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Van Schoonoven, A. and Pastor-Corrales, M. A. (compilers). Cali, Colombia. 54 p.
- Mora, F. 1996. Combate biológico de *Rhizoctonia solani* mediante el empleo de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* en el campo. *Agron. Mesoamericana.* 7(2): 23-30.
- Mora, F., Blum, K. L. 1990. Virulencia de aislamientos locales de *Rhizoctonia solani* en frijol (*Phaseolus vulgaris*) en invernadero. *Agron. Costarricense.* 14(2):247-290.
- Rosales, S. R., Acosta, G. J.A., Muruaga, M. J.S., Hernández, C. J.M., Esquivel, E. G., Pérez, H. P. 2004. Variedades mejoradas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Libro técnico No. 6. 148 pag.
- Samaniego-Gaxiola, J.A. y Gámez-Escobedo, I.A. 2000. Evaluación de residuos para mantener la sanidad de semillas inoculadas con *Trichoderma sp.* en suelo infestado con *Rhizoctonia solani*. *Rev. Mex. Fito.* 18(2): 71-78.
- Sánchez-García, B.M., González-Flores, F., Pons-Hernández, J.L., Acosta-Gallegos, J.A., Cabral-Enciso, M., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J. y Rodríguez-Guerra, R. 2006. *Fusarium lateritium*: Nuevo patógeno de la raíz del frijol en México. *Agri. Tec. Mex.* 32(3): 251-257.
- SAS, Institute. Inc. (1999). *SAS user's guide: Statistics*. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC, USA. 1,028 pp.

2.2 Ubicación del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

Los polígonos estarán ubicados al interior del campo experimental Bajío del INIFAP ubicado en el Km. 6.5 carr. Celaya-San Miguel de Allende, Apdo. postal 112, Celaya, Guanajuato, C.P. 38110.



Proyección UTM (DATUM WGS84 Zona 14)
Escala: 1:16,537

Campo Experimental Bajío INIFAP, Celaya

Simbología

 Limite

Localización



370 185 0 370 740
 Metros

2.3 Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según características de diseminación del OGM.

El polígono (circundado en rojo) corresponde al Lote 1 dentro del Campo Experimental Bajío del INIFAP. En este lote se tomará una fracción de aproximadamente 0.3 ha para el desarrollo del experimento. Este polígono tiene como vecinos al Norte xx m del Campo Experimentla Bajío; al Sur la mancha urbana de la ciudad de Celaya, Gto; al Poniente el Instituto Tecnológico de Roque y al Oriente un sembradío de alfalfa.



2.4 Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos.

La población vegetal dentro y en torno al Campo Experimental Bajío está en constante cambio. El frijol es sembrado en dos épocas del año, sin embargo, se verificará que las distancias y los tiempos de siembra no coincidan con la liberación del frijol inifap-fma-pdf1.2. El levantamiento del

catálogo de especies silvestres se establecerá en 2013 en la temporada que se tiene contemplado realizar la liberación hacia el año 2014.

2.5 Descripción geográfica

Características Agro climáticas y Agro ecológicas:

Clima: semiseco y semicálido

Temperatura Media Anual: 20.85°C

Temperatura Máxima Media Anual: 25.5°C C

Temperatura Mínima Media Anual: 16°C

Precipitación Media Anual: 575.3 mm anuales

2.6 Plano de ubicación señalando vías de comunicación



3. ESTUDIOS DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

3.1 Estabilidad de la modificación genética del OGM

La introducción de la construcción al genoma de la planta de frijol ha demostrado estabilidad a través de 5 generaciones durante las cuales se han desarrollado bioensayos y análisis de expresión en tejido foliar de las plantas (ver secciones 1.9 y 1.19).

3.2 Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína en diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestran

Ver sección 1.9 en referencia a los niveles de expresión del gen en las líneas desarrolladas.

3.3 Características del fenotipo del OGM

El fenotipo del evento modificado que contiene el gen pdf1.2 implica la tolerancia/resistencia a hongos patógenos en sentido de reducción de lesiones ocasionadas por los hongos patógenos *Colletorichum lindemuthianum*, *Fusarium lateritium* y *Rhizoctonia solani* o bien, la ausencia de signos y síntomas derivados de la inoculación dirigida.

La actividad antimicrobiana de éste péptido catiónico antimicrobiano depende de las interacciones electrostáticas entre el péptido (positivamente cargado) y la capa fosfolipídica del hongo (cargada negativamente) (Broekaert *et al.*, 1995). El péptido se inserta en la membrana del hongo y forma canales permeables a través de los cuales ocurre un flujo de K^+ y toma de Ca^{2+} induciendo un cambio en el potencial de membrana y permeabilización de la misma provocando una desestabilización general y abatimiento de las células del hongo patógeno (Thevisen *et al.*, 1996, 1999; Thomma *et al.*, 2002).

Los valores de resistencia de las plantas inoculadas con suelo naturalmente infestado indican que las líneas FMA-*pdf1.2* tienen valores cercanos a 3, es decir, las plantas tuvieron lesiones que alcanzaron hasta el 10% de la planta en su mayoría a *F. lateritium*, lo que de acuerdo con la escala de evaluación son consideradas plantas resistentes. En las plantas con daño 4, es decir de hasta el 25% solo fue detectado el patógeno *F. lateritium* sin tener clara la presencia de *R. solani*. De manera clara, las plantas control tanto FMA como Montcalm tuvieron valores entre 4 y 5, considerados como intermedios susceptibles y cubriendo una superficie de daño de hasta el 35% de la planta (Figura 7 y 9), lo que asegura el nivel de inóculo apropiado para este ensayo. Las plantas con valores de daño arriba de 5 (superior al 35%) mostraron clara presencia no solo de *F. lateritium* sino también de *R. solani*, lo que indica que *F. lateritium* inicia la colonización y *R. solani* es un patógeno secundario manifestado en estadios más severos de daño en raíz.

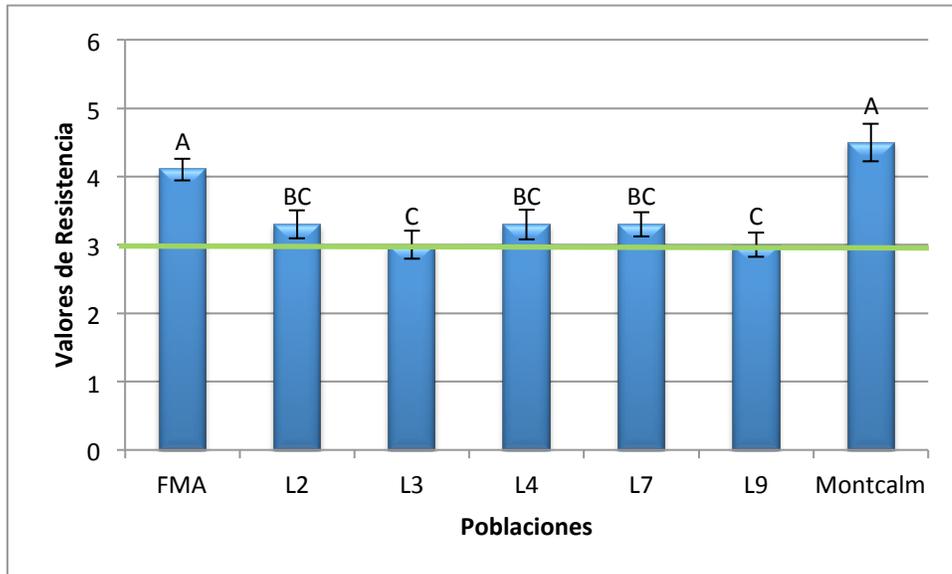


Figura 7. Niveles de resistencia/susceptibilidad de plantas inoculadas con suelo infestado con *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium spp.* Evaluación realizada 21 días posteriores a su inoculación. Los valores representan el promedio de 20 plantas por línea evaluada. Letras diferentes indican diferencia estadística (Tukey).

El análisis estadístico de la población de plantas inoculadas por segunda vez donde se establecen los valores de resistencia o susceptibilidad a altas concentraciones de inóculo indican que las plantas FMA-*pdf1.2* en todas sus líneas son estadísticamente diferentes a las plantas control (Figura 8). Si bien esta diferencia se encuentra dentro del rango intermedio de resistencia, agrónomicamente hablando esto pudiera tener un significado de pérdida inferior al 20% comparado con las plantas cercanas a valores de 6 con significancias de pérdidas superiores al 80% en condiciones de cultivo en campo.

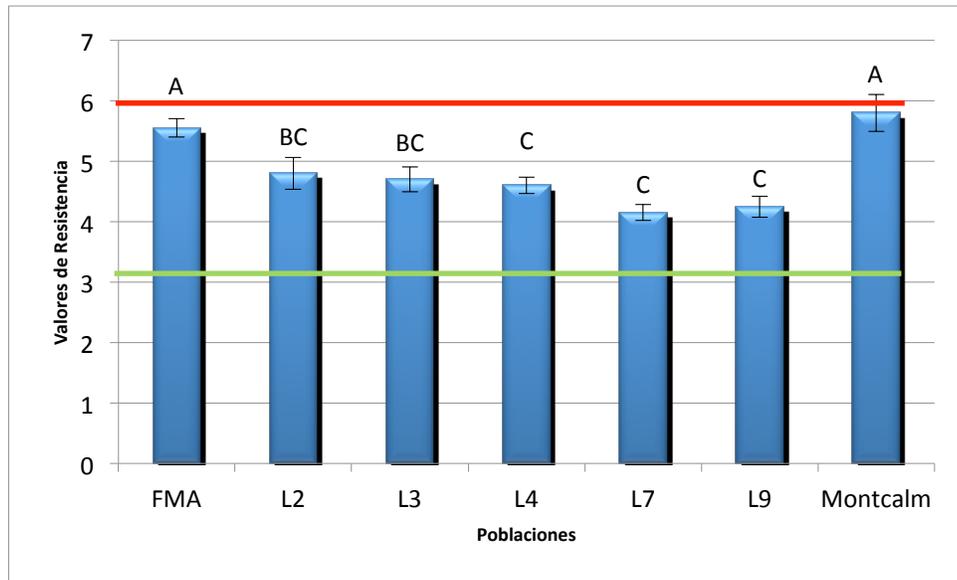


Figura 8. Niveles de resistencia/susceptibilidad de plantas inoculadas con suelo infestado con *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium spp* y reinoculadas con 2.5×10^5 conidios de *F. lateritium*. Evaluación realizada 21 días posteriores a su inoculación. Los valores representan el promedio de 20 plantas por línea evaluada. Letras diferentes indican diferencia estadística (Tukey).



Figura 9. Análisis de daño en plantas de frijol 21 días después de su traslado a suelo con patógenos de raíz *Fusarium lateritium* y *Rhizoctonia solani*. A. FMA no inoculado (vermiculita); B. FMA

inoculado C. Montcalm (testigo susceptible) inoculado D. INIFAP-FMA-pdf1.2-L4 inoculado (izquierda daño 1-3, derecha daño 7).

3.4 Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente receptor del OGM.

Durante las distintas pruebas realizadas en invernadero para el incremento de semilla o bien durante los bioensayos no se observaron alteraciones en la habilidad de Flor de Mayo Anita modificado en comparación con las plantas no modificadas. En todos los casos la emergencia, la floración (forma, número y días de floración), madurez fisiológica, tamaño de la planta, hábito de crecimiento, rendimiento por planta, y número de vainas por planta fue similar entre estos materiales. No se identificó alguna característica física y fenotípica que pudiera tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente.

Para investigar el efecto fúngico de la proteína defensina se realizó un bioensayo relativo a determinar la posible alteración en el establecimiento de hongos benéficos como *Glomus intraradices*.

Los hongos micorrizógenos como *G. intraradices* se utilizan como biofertilizantes, es decir, insumos biológicos que favorecen el desarrollo de cultivos y plantaciones sin los problemas de contaminación que ocasionan los insumos químicos. (Guerrero, 1996). Según Sieverding y Barea (1991) (citado por Guerrero, 1996), los objetivos que persigue el uso práctico de hongos formadores de micorrizas en sistemas de producción vegetal son: a) Hacer un uso más eficiente del fósforo del suelo y de los fertilizantes fosfóricos b) Optimizar la productividad de los suelos y cultivos con niveles bajos de insumos c) Hacer posible y rentable la producción vegetal en condiciones adversas e) Ayudar a establecer cultivos en suelos erosionados o degradados f) Formar agregados en el suelo, mejorando su estructura y porosidad. Desde una perspectiva práctica, los hongos micorrizógenos son bastante más que biofertilizantes. Aunque el principal beneficio es de carácter nutricional, una planta puede obtener ventajas adicionales de la micorriza como: tolerancia a patógenos, tolerancia a estrés hídrico, tolerancia a salinidad, detoxificación, entre otros. La micorriza es el principal mecanismo con que cuentan las plantas con raíz en su adaptación al suelo. Se trata de una simbiosis multifuncional, cuya actividad gira alrededor de la interacción planta-hongo-suelo (Guerrero, 1996). Su uso en la recuperación de suelos degradados o sin estructura es fundamental, ya que no solo favorece el establecimiento de las plantas sino que permite la creación de agregados en el suelo, recuperando su estructura.

Derivado de la inoculación de *G. intraradices* y su análisis 45 días posterior a su germinación se observó una reducción en la colonización del hongo a las raíces de las líneas pdf1.2. Líneas de frijol FMA que habían mostrado resistencia a *C. lindemuthianum* cepas 1472 y 448 en un bioensayo previo, demostraron limitar la posibilidad de colonización comparado con las plantas no modificadas tanto en la aislínea FMA como en el cultivar Flor de Junio Marcela (FJM) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de infección radical por *Glomus intraradices*.

Tratamiento	Infección radical (%)		
	R1	R2	R3
Frijol FJM*	0	0	0
Frijol FMA	0	0	0
Frijol FJM i	25	25	50
Frijol FMA i	25	25	25
L2-448-R i	0	0	0
L2-1472-R i	25	0	0
L3-1472-R4 i	25	0	25
L4-1472-T i	25	0	0
L7-1472-R i	Sin muestra	Sin muestra	0
L9-448-R i	0	25	0
L9-1472-R i	0	0	0

* FJM: Flor de junio Marcela, FMA: Flor de mayo Anita, i: Inoculado con *Glomus intraradices*

3.5 Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica

No se observaron cambios en el ciclo biológico ni en la morfología básica de los genotipos modificados comparados con los no modificados genéticamente. Asimismo, no se encontraron diferencias entre Flor de Mayo Anita modificado y no modificado en términos de eficiencia de producción en condiciones de invernadero. El fondo genético Flor de Mayo Anita en condiciones de riego presenta una precocidad media de 62 días de floración y 107 días de madurez. Registra un rendimiento de 3.2 t ha. Es resistente al desgrane antes de la cosecha, su grano es firme y no se quiebra durante la cosecha mecánica. La variedad Flor de Mayo Anita es resistente al virus del mosaico común (VMC).

3.6 Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM.

El frijol común es un cultivo anual, diploide ($2n = 2x = 22$) y predominantemente de autoplinización que se originó en el continente Americano y consiste de formas cultivadas y silvestres. Las formas silvestres están distribuidas desde el norte de México hasta el norte de Argentina (Brücher, 1988; Delgado Salinas *et al.*, 1988). Ambas formas, cultivada y silvestre, son morfológicamente similares a los cultivares y producen progenie viable y fértil cuando se cruzan entre ellas. (Brücher, 1988; Gentry, 1969). Debido a la extensa distribución del ancestro silvestre del frijol, el sitio exacto de su domesticación ha sido sujeto de especulación. La diversidad de datos de faseolina sugiere que el frijol cultivado surge de múltiples domesticaciones junto a su extendida distribución (Gepts and Bliss, 1986; Gepts *et al.*, 1986). En particular dos principales domesticaciones parecen haber dado lugar al acervo Mesoamericano y al andino. Una tercera y de menor distribución puede haber tenido lugar en Colombia o Centroamérica (Gepts and Bliss, 1986; Koenig *et al.*, 1990).

El análisis de aloenzimas de las formas silvestres han confirmado la existencia de estos dos grupos principales y clarificado sus límites geográficos: las formas Mesoamericanas incluyen poblaciones silvestres desde el norte de México hasta Colombia, mientras que las formas Andinas incluyen poblaciones desde Perú hasta Argentina (Koenig and Gepts, 1989b).

El perfil de aloenzimas de cada uno de estos dos grupos concuerda con la correspondiente a las poblaciones silvestres en la misma zona geográfica (Koenig and Gepts, 1989b), proporcionando evidencia adicional que favorece el origen independiente de estos dos grupos de cultivares. Como ha sido reportado por Koenig and Gepts (1989b) los cultivares con perfil de la aloenzima faseolina tipo S, Sd, Sb o B tienen perfil Mesoamericano, mientras que los cultivares con tipo de faseolina T, C y H tienen perfil Andino.

La divergencia entre las razas nativas Mesoamericanas y Andinas es por lo tanto una consecuencia de la divergencia entre los ancestros silvestres Mesoamericanos y Andinos quienes precedieron el proceso de domesticación. A nivel molecular los tipos cultivados de un grupo (como el Mesoamericano) están más cercanamente con el ancestro silvestre del mismo grupo que con los cultivares del otro grupo (para este ejemplo, el grupo Andino). En frijol, las características que distinguen a un frijol silvestre de un cultivado y entre frijoles cultivados, están codificados por pocos genes (con excepción del tamaño de semilla, el cual es una característica multigénica) (Gepts, 1990). Los principales cambios fenotípicos pueden por lo tanto, tener un control genético simple y ocurrir sin mayor divergencia a nivel molecular (Singh *et al.*, 1991).

Vieira (1960), Pompeu (1963), Junqueira Netto y Lasmar Filho (1971), Pacova and Rocha (1975) y Pereira Filho y Cavariani (1984) documentaron que la tasa de cruzamiento abierto en frijol es bajo, en un rango de 0.2 a 1.4%. Estos autores emplearon surcos adyacentes de cultivares o cimas adyacentes de diferentes fuentes de polen. Bajos condiciones medioambientales especiales, sin embargo, algunos cultivares de frijol común pudieron mostrar tasas de entrecruzamiento de hasta 6% en Pindorama, Sao Paulo (Pompeu, 1963). Una explicación a estos resultados en conflicto podría recaer en los diferentes métodos usados para el muestreo de poblaciones de semillas segregantes. Otra explicación podría ser la población de insectos polinizadores en las condiciones experimentales dadas; las abejas por ejemplo, son menos atraídas por las flores de frijol que los abejorros o las abejas carpinteras.

Durante la evaluación de riesgos con fines de liberación al ambiente de una variedad las agencias reguladoras normalmente especifican distancias de aislamiento entre los campos de cultivo de la misma especie. Consecuentemente, con el fin de mantener la pureza de la semilla, es importante determinar la distancia máxima hasta la cual el flujo génico puede ocurrir a niveles significativos. Varios estudios se han llevado a cabo con el propósito de determinar las frecuencias de la polinización cruzada entre plantas transgénicas y no transgénicas de papa (Conner and Dale 1996), canola (Scheffler *et al.*, 1993), soya (Abud *et al.*, 2003) y algodón (Llewellyn y Fitt, 1996, Shen *et al.*, 2001).

Para el caso de frijol común Ferreira *et al.* (2007), reportan que para determinar la distancia en la que el flujo génico mediado por polen alcanzaría diferenciales de taza de cruzamiento realizaron un experimento en el cual la fuente de polen se sembró en 8 surcos formando círculos concéntricos alrededor de los cuales confluían plantas de frijol receptoras también en círculos definiendo una distancia máxima del surco 36 de 18 m. En un muestreo de la generación siguiente se observó que la tasa máxima de híbridos fue de 0.136% a una distancia de 0.5 m mientras que la taza natural de hibridación fue prácticamente cero más allá de 3.25 m.

De manera similar, Chávez-Barrantes *et al.*, (2009) reportaron que con el objetivo de analizar el flujo de genes entre frijol común silvestre y cultivado, se determinó el porcentaje de alogamia en condiciones naturales de crecimiento del frijol silvestre y en estación experimental. En el 2004 se evaluó el cruzamiento natural entre frijol silvestre mexicano G23511A (*Phaseolus vulgaris* L.) y la línea blanca PAN 68, en la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica en Alajuela. Para ello se sembraron dos parcelas experimentales; cada una constó de dos bloques de PAN 68 de 10 surcos (15 m de largo y espacia dos 0.6 m). Entre los bloques y en el borde superior de los mismos, se sembraron tres surcos de frijol silvestre como donantes de polen. Se numeraron las hileras y las plantas de cada una en los bloques de frijol blanco. En Quircot de Cartago (área donde crece en forma natural *P. vulgaris* silvestre), en el 2005 y 2006, se sembraron plantas de frijol comercial (Vainica de Palo) a lo largo de seis sitios junto a las poblaciones de frijol silvestre. En ambas localidades la floración de silvestres y comerciales fue coincidente. Se cosechó toda la semilla de los ensayos y se germinó en bandejas, determinando el porcentaje de alogamia por medio del color morado del hipocotilo, indicativo de aquellas plántulas cruzadas. En Alajuela el porcentaje de cruza varió entre 0.007 y 0.028 %; mientras que en Quircot, entre 0 y 0.199 %.

Derivado de lo anterior se plantea en el diseño experimental establecer barreras vivas de frijol en la periferia de 5 m y rodeando éste un cultivo de maíz. Asimismo, se diferirá la liberación de FMA-PDF1.2-INIFAP para que no haya coincidencias en floración con parcelas de frijol del mismo campo experimental.

Referencias

- Abud S, Souza PIM, Moreira CT, Andrade SRM, Ulbrich AV, Vianna GR, Rech WL, Aragão FJL. 2003. Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado. *Pesq Agropec Bras* 38:1229–1235.
- Brücher H. 1988. The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in south America. P 185-214. In: P. Gepts (ed.) *Genetic resources of Phaseolus beans*. Luwer, Dordecht, the Netherlands.
- Chaves-Barrantes, N, Araya-Villalobos R, y Debouck D. Flujo de genes entre frijol común y silvestre en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* [en línea] 2009, vol. 20 [citado 2012-06-05]. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=43713059004>. ISSN 1021-7444.
- Conner AJ, Dale PJ. 1996. Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. *Theor Appl Genet* 92:505–508

- Delgado-Salinas A, Bonet A, Gepts P. 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America p 168-184. In: P. Gepts (ed.) *et al.*, Genetic resources of Phaseolus beans. Luwer, Dordecht, the Netherlands.
- Ferreira JL, de Souza CJE, Teixeira AL, de Lanes FF, Cecon PR, Borém A. 2007. Gene flow in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Euphytica 153:165-170.
- Gentry HS. 1969. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. Econ Bot 25:55-69.
- Gepts P, Bliss F.A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. Econ Bot 40:469-478.
- Gepts P, Osborn TC, Rashka K, Bliss FA. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication. Econ bot 40:451-468.
- Gepts P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of Phaseolus beans. Econ bot 44(3 Suppl.):28-38.
- Guerrero E. 1996. Micorriza: Fundamentos biológicos y estado del arte. Bogotá, Colombia pp31-38
En: Guerrero E. *et al.*, (Ed) Micorrizas: Recurso Biológico del Suelo.
- Junqueira Netto A, Lasmar Filho J. 1971. Taxa de alogamia do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em Lavras, Minas Gerais. Agros 1:19-21.
- Koenig R, Gepts P. 1989b. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris* : further evidence for two major centers for genetic diversity. Theor Appl Genet 78:809-817.
- Koenig R, Singh SP, Gepts P. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ Bot 44:50-60.
- Llewellyn D, Fitt G. 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. Mol Breed 2:157-166.
- Pacova BEV, Rocha ACM. 1975. Hibridação natural no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Linhares, Espírito Santo. Ceres 22:157-158.
- Pereira Filho IA, Cavariani C. 1984. Taxa de hibridação natural do feijoeiro comum em Patos de Minas, Minas Gerais. Pesq Agropec Bras 19:1181-1183.
- Pompeu AS. 1963. Polinização cruzada natural no feijoeiro. Bragantia 22:53-57.
- Scheffler JA, Parkinson R, Dale PJ. 1993. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). Transgenic Res 2:356-364.
- Shen FF, Yu YJ, Zhang XK, Bi JJ, Yin CY. 2001 Bt gene flow of transgenic cotton. Acta Genetica Sinica 28:562-567.
- Singh SP, Nodari R, Gepts P. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. Crop Sci. 31:19-23.
- Vieira C. 1960. Sobre a hibridação natural em *Phaseolus vulgaris* L. Ceres 11:103-107.

3.7 Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad

Análisis por PCR punto final

Se aisló el ADN, de acuerdo con Murray y Thompson (1980), usando 100-200 mg de tejido de hoja por muestra. La concentración final de las reacciones consistió de un molde de ADN (30 ng), iniciadores (0.2 μ M), dNTP's (0.25 mM), Taq ADN polimerasa (1 U), cloruro de magnesio (2 mM), y buffer de Taq (1X). El análisis PCR se realizó utilizando iniciadores para detectar el promotor 35S y los genes pdf1.2, nptII. Los iniciadores para detectar el promotor 35S fueron sentido 35S 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CA-3', antisentido 35S 5'-GCA CCT ACA AAT GCC ATC A-3', (Invitrogen, Life Technologies). Las condiciones de amplificación fueron 4 min a 95° C durante un ciclo, 1 min a 95° C, 1 min a 54° C, 1 min a 72° C durante 30 ciclos y una extensión final de 7 min a 72° C. Los iniciadores de pdf1.2 consistieron en sentido pdf1.2 5'-CAT CAT GGC TAA GTT TGC TTC C-3', antisentido pdf1.2 3'-CTC ATA GAG TGA CAG AGA CT-5'; los iniciadores de nptII fueron sentido nptII 5'-TCG GCT ATG ACT GGG CAC AAC AGA-3', antisentido nptII 3'-AAG AAG GCG ATA GAA GGC GAT GCG-5'. Las condiciones de amplificación, para los iniciadores pdf1.2 y nptII fueron de 3 min a 94° C durante un ciclo, 1 min a 94° C, 1 min a 55° C, y 2 min a 72° C durante 35 ciclos. Los tamaños de los fragmentos fueron 60 pb para el gen pdf1.2, 700 pb para el gen nptII, 195 pb para el promotor 35S. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 2 % y teñidos con bromuro de etidio (Espinosa et al., 2013).

Análisis por Q-PCR

Los iniciadores y la sonda fueron diseñados utilizando el programa Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) a partir de la secuencia del gen pdf1.2 (NCBI, NM_123809). Los iniciadores y sonda específicos del gen defensina (Ensayos por diseño, Applied Biosystems) para detectar el gen pdf1.2 fueron sentido 5'-AGT TGT GCG AGA AGC CAA GT-3', antisentido 3'-GCA TGC ATT ACT GTT TCC GCA AA-5' y la sonda TaqMan[®] 5'-CCC TGA CCA TGT CCC-3' con una etiqueta de marcado 6-FAM[™] y el enlazante al surco menor (MGB) en el extremo 5', y el extintor no fluorescente (NFQ) en tinte en el extremo 3'. El control interno 18S ribosomal (4319413E, Applied Biosystem) fue etiquetado con el fluoróforo VIC (Espinosa et al., 2013).

Los análisis por qPCR tienen una elevada sensibilidad (capaz de detectar 0.5 femtogramos de RNAr) y una alta reproducibilidad con un amplio rango dinámico lineal: 9-logs.

3.8 Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas

De acuerdo con Ferreira *et al.*, (2007) el flujo génico observado entendiéndose como la frecuencia de híbridos naturales en condiciones de cruzamiento abierto entre materiales de frijol fue de un máximo de 0.136% a una distancia de 0.5 m. La tasa de cruzamiento fue prácticamente cero más allá de 3.25 m.

Referencias

Ferreira JL, de Souza CJE, Teixeira AL, de Lanes FF, Cecon PR, Borém A. 2007. Gene flow in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Euphytica 153:165-170.

3.9 Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol 108:1353-1358.

Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW, Broekaert WF. 1996. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. J Biol Chem 271:15018-15025.

Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF. 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. Appl Environ Microbiol 65:5451-5458.

Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A. and Thevissen, K.2002. Plant Defensins. Planta. 216: 193-202.

4. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD A LLEVAR A CABO

4.1 Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad

- TRANSPORTE

El transporte consistirá en movilizar las semillas de la Unidad de Biotecnología al sitio de liberación. Ambos puntos se encuentran dentro del Campo Experimental Bajío a una distancia 320 m. En este trayecto la semilla estará contenida en sobres de papel Manila que a su vez estarán contenidos en una caja plástica con tapa hermética. En esta actividad la semilla será transportada por el titular técnico de esta solicitud y será entregada y supervisada su siembra.

- ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO

Durante el establecimiento del ensayo se supervisará la correcta siembra. Previa a esta, la superficie será definida por banderolas en las cuales se establecerá el material a someterse a bioensayo, así como los diferentes testigos.

- SEGUIMIENTO DEL ENSAYO

A lo largo del ensayo o liberación se mantendrá una vigilancia constante relativa a mantener las medidas de bioseguridad, reforzando aquellas que pudieran requerirlo (barreras físicas, señalamientos, etc.).

- COSECHA

La cosecha se realizará manualmente y se recogerán todos los residuos de tejido seco desprendido de la planta. Estos materiales serán trasladados a la Unidad de Contención de OGM del Campo Experimental Bajío y serán inactivados por calor (Autoclave). La semilla será separada de la vaina y guardada en sobres de papel y depositada en el refrigerador (4 °C) para su almacenamiento.

- POST COSECHA

La superficie receptora de la liberación al ambiente de frijol GM será monitoreada en las siguientes semanas. Se realizarán dos riegos para promover la germinación de alguna semilla que en posibilidad remota, haya quedado en el terreno. Asimismo, se sembrará en el siguiente ciclo maíz o trigo/cebada, dependiendo de la fecha de liberación y se monitorearán las plantas voluntarias de frijol que pudieran germinar y desarrollar en la parcela.

4.2 Plan de monitoreo detallado

Las acciones detalladas se definirán en cada nivel en que se presente el establecimiento del cultivo y los definimos en acciones antes, durante y después de la siembra liberada al ambiente. El monitoreo se fundamentará bajo dos principios, a) comprobar una hipótesis de riesgo y/o b) reducir la incertidumbre

ANTES:

Se establecerán la participación exclusiva del personal involucrado en el tema (Elsa Espinosa Huerta, Bertha María Sanchez Garcia, Baltazar Tula Aguado y María Alejandra Mora Avilés), se describirán las poblaciones de cultivos existentes alrededor de este cultivo GM. Se establecerá una barrera temporal (desfase de cultivo para impedir coincidencia floral) entre cultivos de frijol dentro del Campo Experimental.

DURANTE:

La posibilidad de que ocurra flujo génico a través de incorporación de polen en otros cultivos de frijol o plantas silvestres *P. vulgaris* es insignificante por las diferencias espacio-temporales entre el cultivo FMA-pdf1.2 –INIFAP y cultivares experimentales de frijol dentro del Campo Experimental. Asimismo, de acuerdo a la consulta realizada con el Dr. Salvador Montes Hernández, experto en Recursos Genéticos, no existe presencia de parientes silvestres de *P. vulgaris* en los alrededores del campo Experimental Bajío (dentro y fuera de sus límites) durante el periodo a realizar la liberación experimental al ambiente.

La participación de insectos polinizadores en la dispersión de polen también se establece como poco probable derivado de la condición de cleistogamia en frijol. Sin embargo, para evitar esta posibilidad, el cultivo será establecido con n adiferencia en floración con respecto a los cultivos experimentales convencionales de al menos 20 días. El monitoreo consistirá en verificar la coincidencia de floración y en su caso la eliminación de plantas convencionales fuera del rango de tiempo esperado de foración.

Los insectos polinizadores que conviven con frijol han sido poco documentados en artículos asociados a cruzamiento natural de frijol, sin embargo, se ha reportado que las abejas tienen poca preferencia por las flores de frijol y que son especies como abejorros o abejas carpinteras algunas de las especies que pudieran estar relacionadas (Ferreira *et al.*, 2007).

Organismos Benéficos

Bajo la hipótesis de que el gen defensina puede afectar los niveles de organismos benéficos en el suelo derivado de su interacción, se estableció previamente un bioensayo en condiciones confinadas en el cual se encontró que no había diferencias significativas en el número de esporas o células de *Trichoderma* o *Rhizobium*, respectivamente, que se encontraban en contacto con FMA-pdf1.2-INIFAP en comparación con las plantas de frijol no modificadas genéticamente.

Las plantas de frijol inoculadas presentan un efecto de simbiosis con la bacteria *Rhizobium spp* debido a la formación de nódulos en las raíces. La capacidad de formar nódulos de las líneas FMA-pdf1.2 fue en algunos casos mayor que en las plantas FMA no modificadas, sin embargo, los números de nódulos se mantuvieron dentro del margen reportado para frijol los cuales oscilaron entre los 280 y los 313 nódulos, por lo que se puede concluir que no se aprecian diferencias significativas entre los materiales de frijol evaluados.

En el ensayo realizado la evaluación de la concentración final de *T. harzianum* presente en plantas FMA L2, L3, L4, L7 y L9 transformadas genéticamente con el gen *pdf1.2* se incrementó a los 46 días después de la siembra, con respecto a la concentración inicial aplicada. Si bien es más notorio el incremento de la concentración de *Trichoderma* en las plantas FMA no modificadas genéticamente, ambos casos logran un aumento significativo en la concentración final de entre 3.5×10^5 - 4.5×10^5 UFC/mL con respecto a los resultados mostrados en otros ensayos de confrontación con patógenos donde la concentración máxima reportada es de 2.68×10^5 UFC/mL (González *et al.*, 1999), de tal manera que el control de patógenos por parte del gen defensina permite a *T. harzianum* utilizar su energía en la reproducción y no solo en la producción de proteínas de resistencia.

DESPUÉS:

Se analizará la presencia de plantas voluntarias se procederá a su remoción e inactivación térmica.

Referencias

Ferreira JL, de Souza CJE, Teixeira AL, de Lanes FF, Cecon PR, Borém A. 2007. Gene flow in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Euphytica 153:165-170.

4.3 Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM.

Se observará la germinación de plantas voluntarias en los siguientes dos ciclos posteriores a la cosecha, mediante riego observación puntual para eliminar las plantas manualmente.

4.4 Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona de la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación

La superficie receptora de la liberación al ambiente de frijol GM será monitoreada en las siguientes semanas. Se realizarán dos riegos para promover la germinación de alguna semilla que en posibilidad remota, haya quedado en el terreno. Asimismo, se sembrará en el siguiente ciclo maíz o trigo/cebada, dependiendo de la fecha de liberación.

Derivado de la separación temporal entre los cultivos de frijol convencionales en el campo experimental, no será necesaria la detección del OGM en las parcelas vecinas

4.5 Medidas y procedimientos de bioseguridad

La parcela será circundada por malla de alambre para limitar el acceso a este cuadrante. Asimismo, la vigilancia será permanente en tanto dure la liberación. Señalamientos relativos a la liberación de organismos modificados serán dispuestos de acuerdo a lo que la autoridad recomiende. Barreras biológicas están contempladas en el diseño experimental empleando cultivares de frijol precoces para evitar coincidencia en floración y eliminar en etapa previa a la cosecha.

4.6 Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación.

Barreras físicas y vigilancia permanecerán en tanto la liberación del frijol GM permanezca en campo. La semilla de frijol no es dehiciente por lo que no hay riesgo de diseminación por este medio. La dispersión a través de polen es muy baja derivado de que el frijol no cuenta con polinizadores y las especies de insectos visitantes que pudieran hacer las veces de dispersadores no contarán con cultivos de frijol en coincidencia con la etapa de floración de esta liberación experimental.

4.7 Medidas y procedimientos para disminuir el acceso de organismos vectores de dispersión, o de personas que no se encuentren autorizadas para ingresar al área de liberación a dicha zona o zonas

Las medidas que se implementarán para disminuir el acceso de personas incluirán un cercado físico con malla de alambre y avisos de restricción de acceso, así como vigilancia permanente por parte del personal de seguridad del Campo Experimental Bajío.

4.8 Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas

La posibilidad de que esto ocurra es limitada derivado de que en las parcelas aledañas no se sembrará frijol. El monitoreo permanente definirá la existencia de plantas fuera de sitio, las cuales serán eliminadas del sitio y trasladadas al anexo de manejo confinado de OGMS del Campo Experimental Bajío.

4.9 Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar el OGM

La zona (subparcela) destinada a la liberación del frijol GM será aislada físicamente por medio de barreras vivas de frijol y probablemente maíz, asimismo, se contempla la instalación de una cerca de metal para reforzar la colindancia y limitar el acceso.

4.10 Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado.

El organismo a liberar no tiene características que pongan en riesgo la salud humana y el ambiente toda vez que su fenotipo específico lo restringe a hongos patógenos. Estudios de impacto en organismos no blanco definirán lo anterior.

4.11 Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación

La disposición final de los residuos será a través de recolección manual de todos los residuos y su traslado a la Unidad de Contención de OGM del Campo Experimental Bajío para su tratamiento de inactivación y eliminación final.

5. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROVOMENTE.

No aplica, no existe información, se trata de un modelo tecnológico novel.

5.1 Descripción de la zona en donde se realizó la liberación

5.2 Efectos de la liberación sobre la flora y fauna

5.3 Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen (descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad)

5.4 En caso de que el promovente lo considere adecuado. Otros estudios o consideraciones en los que se analicen tanto la contribución del OGM a la solución de problemas ambientales, sociales, productivos o de otra índole

5.5 En caso de importación, copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen

CONSIDERACIONES SOBRE LOS RIESGOS DE LAS ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS CON QUE SE CUENTE PARA CONTENDER CON EL PROBLEMA PARA EL CUAL SE CONSTRUYÓ EL OGM, EN CASO DE QUE TALES ALTERNATIVAS EXISTAN

Actualmente no se cuenta con ningún paquete tecnológico eficiente para el control de hongos patógenos de raíz. Los métodos de control radican en evitar suelos muy arcillosos que mantengan altas concentraciones de inóculo. Por otra parte, no se cuenta con fondos genéticos para conferir el carácter de resistencia a estos patógenos.

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O BIORREMEDIACIÓN

**En caso de no contar con dicha autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente, anexa a un escrito libre en el que se indiquen el Número de autorización y el número de folio.*

LA PROPUESTA DE LA VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA

En el Bajío existen dos fechas de siembra de frijol, marzo (P-V) y agosto-septiembre (O-I). Derivado de que las mejores condiciones y niveles de inóculo son en el periodo de O-I se contempla que la siembra se establezca en el mes de agosto y la cosecha en el mes de noviembre del 2014.

DOS COPIAS IDENTICAS EN PAPEL DE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN LA SOLICITUD

DOS DISCOS CON LA INFORMACIÓN DE LA SOLICITUD, DE CARÁCTER PÚBLICO, CONSIDERANDO LO ESTABLECIDO EN LOS ARTÍCULOS 70 Y 71 DE LA LBOGM

OCHO DISCOS CON LA INFORMACION DE LA SOLICITUD, DE CARÁCTER CONFIDENCIAL (DEBERÁ CONTENER LA MISMA INFORMACIÓN A LA PRESENTADA DE FORMA IMPRESA)

CONFIDENCIAL