



EFFECTO DE LA DEFENSINA RECOMBINANTE (*pdf1.2*) SOBRE MICROORGANISMOS BENÉFICOS ASOCIADOS A FRIJOL GENÉTICAMENTE MODIFICADO

EFFECT OF RECOMBINANT DEFENSIN (*pdf1.2*) ON BENEFICIAL MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH GENETICALLY MODIFIED COMMON BEANS

Miriam Granados-Vallejo¹, Oscar A. Grageda-Cabrera²,
Bertha Ma. Sánchez-García³ y Ma. Alejandra Mora-Avilés^{2*}

¹Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, Guanajuato, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Celaya, Guanajuato, México. ³Instituto Tecnológico de Roque, Celaya, Guanajuato, México.

*Autor para correspondencia (mora_alejandra@yahoo.com)

RESUMEN

Los organismos genéticamente modificados tienen como requisito para su liberación al ambiente en etapa experimental un análisis de los posibles riesgos que pudiera ocasionar al medio ambiente, a la diversidad biológica y a la sanidad vegetal, animal y acuícola, de acuerdo con la ley de bioseguridad de los organismos genéticamente modificados en México. El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) genéticamente modificado con el gen defensina de *Arabidopsis thaliana* (*pdf1.2*) tiene la característica de conferir tolerancia/resistencia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos del frijol. Se analizaron las interacciones entre cinco líneas homocigotas del cv. Flor de Mayo Anita modificadas genéticamente con el gen defensina (FMA-*pdf1.2*), con los microorganismos *Trichoderma harzianum*, hongo antagonista de patógenos, *Rhizobium tropici*, bacteria fijadora de nitrógeno y *Rhizophagus intraradices*, hongo micorrízico. El suelo estéril se inoculó con estos microorganismos y se evaluó su densidad, infección o colonización en las raíces del frijol. *T. harzianum* mostró mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) en suelo de plantas no modificadas que en las que expresaron defensina; sin embargo, los valores de UFC en las plantas modificadas se encontraron dentro del intervalo reportado por otros autores para este tipo de relaciones simbióticas. Por otra parte, aun cuando *R. tropici* se desarrolla intra e intercelularmente, espacios donde se expresa la proteína defensina, el número de nódulos superó al de las plantas testigo no modificadas. Finalmente, el porcentaje de infección de *R. intraradices* fue inconsistente, éste resultó bajo tanto en plantas FMA-*pdf1.2* como en plantas no modificadas, por lo que en este caso no fue claro el efecto de la defensina. Lo anterior sugiere que la presencia de defensina no representa un factor de riesgo contra microorganismos que no invaden el espacio inter e intracelular de las plantas modificadas, o bien contra microorganismos no incluidos en el espectro de acción de *pdf1.2*.

Palabras clave: Organismos no-blanco, antagonista, simbiosis, péptidos antimicrobianos.

SUMMARY

Genetically modified organisms have as a requirement for their release into the environment at the experimental stage an assessment of the possible risks that could be caused to the environment, to biological diversity, and to plant, animal and aquaculture health, in accordance with the biosafety law of genetically modified organisms in Mexico. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) modified with the *Arabidopsis thaliana* defensin gene (*pdf1.2*) has the characteristic of conferring broad-spectrum tolerance/resistance to plant pathogenic fungi of beans. The interactions between five common bean

homozygous lines cv. Flor de Mayo Anita modified with the defensin gene (FMA-*pdf1.2*), with the antagonistic *Trichoderma harzianum*, the symbiotic association with *Rhizobium tropici* and the *Rhizophagus intraradices* mycorrhizae association were analyzed. Sterile soil was inoculated with those microorganisms and their density and infection or colonization in bean roots were evaluated. *T. harzianum* showed a larger number of colony-forming units (CFU) in non-modified plants than in those that expressed defensin; however, CFU values in the modified plants were within the range reported by other authors for this type of symbiotic relationships. On the other hand, even though *R. tropici* develops at inter and intracellular spaces, where the defensin protein is expressed, the number of nodules exceeded that of unmodified control plants. Finally, the *R. intraradices* percentage of infection was inconsistent, being low in both FMA-*pdf1.2* and unmodified plants; therefore, the effect of defensin was not clear. The above suggests that the presence of defensin does not represent a risk factor against microorganisms that do not invade the intra and intercellular space of the modified plants, or against microorganisms not included in the spectrum of action of *pdf1.2*.

Index words: Non-target organisms, antagonistic, symbiosis, antimicrobial peptides.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo con gran diversidad genética que incluye germoplasma con características agronómicas de interés, como la resistencia a condiciones climáticas adversas, resistencia a plagas y enfermedades y una alta calidad nutricional (de Carvalho *et al.*, 2000); sin embargo, algunos genes que confieren características específicas pueden estar o no presentes en el germoplasma del frijol común y el mejoramiento convencional puede tomar mucho tiempo. Cuando los genes de resistencia o genes asociados a proporcionar ventajas agronómicas no se encuentran dentro de los parientes silvestres o especies compatibles para realizar cruces sexuales, es posible recurrir a fuentes alternativas de resistencia vía ADN recombinante como método alternativo de mejoramiento genético.

El control de enfermedades ocasionadas por micoparásitos en cultivos como el frijol, particularmente

aquellos que se encuentran en el suelo, ha sido un tema largamente abordado. Diferentes tipos de control como el químico, biológico y mejoramiento genético han sido empleados con mayor o menor éxito, dependiendo de la virulencia del patógeno, la eficiencia del organismo antagonista, el permiso de uso del producto químico en países determinados, el desarrollo de resistencias y la existencia de genes de resistencia (Sallam *et al.*, 2008).

El control biológico es una alternativa complementaria eficiente y económica para el control de enfermedades foliares y las ocasionadas por patógenos del suelo (Infante *et al.*, 2009). El género *Trichoderma* incluye varias especies que sirven como agentes de control biológico con efecto estimulante en los cultivos e inductor de resistencia localizada y sistémica en plantas, a diferentes patógenos (Harman, 2000; Martínez-Medina *et al.*, 2010). *Trichoderma* es considerado un hongo antagonista de hongos fitopatógenos, ya que posee diferentes mecanismos de acción, como la competencia directa por espacio y nutrientes, producción de metabolitos, antibióticos y parasitismo directo en los hongos que le permiten controlar su crecimiento y por tanto la enfermedad (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Los hongos micorrizógenos como *Rhizophagus 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), 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, d) ayudar a establecer cultivos en suelos erosionados o degradados y e) formar agregados en el suelo para mejorar su estructura y porosidad. Aunque el principal beneficio es de carácter nutricional, una planta puede obtener ventajas adicionales de la micorriza como la tolerancia a patógenos, tolerancia a estrés hídrico, tolerancia a salinidad, detoxificación, entre otros; se trata de una simbiosis multifuncional, cuya actividad gira alrededor de la interacción planta-hongo-suelo (Guerrero, 1996).

Rhizobium tropici es una especie rizobial aún poco estudiada, originalmente aislada de nódulos de raíz en frijol común y especies de *Leucaena* en Sudamérica. La especie puede establecer simbiosis con varios hospederos, incluyendo a las fabáceas autóctonas de América y Australia. El interés en la evolución de *R. tropici*

es el resultado de su cercano parecido genético con las agrobacterias, lo que indica la interesante posibilidad de descubrir el vínculo entre la simbiosis y la patogenicidad. En términos agronómicos, la alta estabilidad genética del plásmido simbiótico (pSym), la tolerancia al estrés ambiental y la alta capacidad de fijación del nitrógeno de algunas cepas de élite han dado lugar a un mayor uso de cepas de *R. tropici* en inoculantes (Gomes *et al.*, 2015; López-Ortiz *et al.*, 2012). La fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico y fijación de nutrientes en leguminosas se lleva a cabo a través de nódulos que se desarrollan en la raíz de las plantas (Lloret y Martínez-Romero, 2005), lo que favorece la asimilación de nitrógeno y las hace más competitivas en suelos con baja fertilidad, por lo que mantener esta relación simbiótica es de enorme relevancia para la productividad del cultivo.

En los últimos tiempos, el desarrollo de organismos genéticamente modificados con genes de defensa contra hongos fitopatógenos ha sido implementado a través de modelos de tecnología recombinante que proporcionaron tolerancia/resistencia como en tabaco (*Nicotiana tabacum*) a *Alternaria longipes* (Terras *et al.*, 1995), tomate (*Solanum lycopersicum*) a *Alternaria solani* (Parashina *et al.*, 2000), canola (*Brassica napus*) a *Leptosphaeria maculans* (Wang *et al.*, 1999) y papa (*Solanum tuberosum*) a *Verticillium dahliae* (Gao *et al.*, 2000) y frijol común a *Colletotrichum lindemuthianum* (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013).

De acuerdo con la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (Secretaría de Salud, 2005), en México todos los modelos tecnológicos de ADN recombinante que soliciten un permiso de liberación al ambiente en etapa experimental deberán realizar un análisis de riesgo ambiental para establecer los posibles riesgos que las características de esta tecnología pudieran ocasionar al medio ambiente, a la diversidad biológica y a la sanidad vegetal, animal y acuícola.

El frijol cv. Flor de Mayo Anita genéticamente modificado con el gen defensina de *Arabidopsis thaliana* (FMA-*pdf1.2*) ha sido analizado por sus características para conferir tolerancia de amplio espectro contra hongos fitopatógenos como *Colletotrichum lindemuthianum* (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). Los objetivos del presente estudio fueron evaluar las interacciones entre cinco líneas homocigotas del cv. Flor de Mayo Anita modificadas genéticamente con el gen defensina (FMA-*pdf1.2*), con los microorganismos *Trichoderma harzianum*, *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices*, bajo la hipótesis de que la defensina pudiera ocasionar inhibición en la interacción entre la planta de frijol modificada y los microorganismos benéficos dentro de un ambiente confinado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de inóculo

La cepa de *T. harzianum* se sembró en placas con medio PDA a partir de un inóculo previamente aislado e identificado molecularmente (Sánchez-García *et al.*, 2017), el cual se incubó durante 6 d a 25 °C, en oscuridad. Después de la incubación se adicionaron de 5 a 10 mL de agua desionizada estéril sobre la placa para remover las conidias y la suspensión se colocó en un matraz Erlenmeyer adicionado con 100 mL de agua desionizada estéril.

La cepa de *R. tropici* se inoculó en medio YMB a partir del crecimiento de una colonia definida en cajas Petri con el mismo medio, el cual se incubó durante 5 d a 28 °C en oscuridad, de acuerdo con el protocolo utilizado por Martínez-Romero *et al.* (1991); de esta suspensión se tomaron de 5 a 10 mL y se colocaron en un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL agua desionizada estéril. El conteo de bacterias se realizó por medio de una cámara de Neubauer (hematocitómetro).

Cultivo de frijol en sustrato con inóculo de *T. harzianum* y *R. tropici*

Cinco líneas T5 homocigotas (L2, L3, L4, L7 y L9) cv. Flor de Mayo Anita (Castellanos *et al.*, 2003), transformadas genéticamente con el gen defensina (FMA-*pdf1.2*) (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013) fueron germinadas en macetas con sustrato Sunshine® Mix No. 3. Al sustrato se le aplicó un riego ligero y se realizaron cinco perforaciones de 5 cm de profundidad para la adición del inóculo de esporas de *T. harzianum* (10^6 conidias mL⁻¹) o de bacteria *R. tropici* (10^6 UFC mL⁻¹). Se colocó una semilla de frijol, previamente desinfectada con hipoclorito de sodio, por maceta. Las condiciones ambientales fueron un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, un intervalo de temperatura a lo largo del día de entre 15 y 32 °C y una iluminación provista por la luz solar a través del techo de cristal en invernadero.

Cuantificación poblacional de inóculo de *T. harzianum* presente en el sustrato

A los 46 días después de la siembra se muestreó 1g de sustrato de las macetas de cada una de las líneas de frijol y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de agua doble desionizada, se mantuvo en agitación a 150 rpm durante media hora y se procedió a realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de *T. harzianum* en una cámara de Neubauer.

Conteo de nódulos en plantas de frijol

A los 40 días después de la siembra se retiró la planta de la maceta procurando mantener la raíz íntegra, se sacudió el sustrato presente de este tejido y se enjuagó con agua para facilitar el conteo. Una vez que la raíz se encontró libre de sustrato, se colocó en una charola y se agregó un poco de agua para evitar su deshidratación. La raíz se dividió longitudinalmente, se tomó una tercera parte y se contó el número de nódulos presentes (Grageda C. O. A., 2014; Com. Pers.)¹.

Inoculación con *R. intraradices*

Rhizophagus intraradices (Micorriza INIFAP®) (INVAM, 2017), cepa aislada de huerto de naranja en Nuevo León, México y ampliamente usada en diversos cultivos, fue inoculado en semillas provenientes de poblaciones tolerantes o resistentes a *C. lindemuthianum* (cepas 448 o 1472) de las cinco líneas modificadas de frijol FMA-*pdf1.2* (L2, L3, L4, L7 y L9), y en semillas del cv. Flor de Mayo Anita no modificado. La inoculación se realizó con 0.1 g de biofertilizante micorrízico, el cual contenía 100 esporas g⁻¹. El sustrato fue una mezcla tierra lama:arena (1:1) previamente esterilizada. Se procedió a la siembra y se llevó a cabo un muestreo destructivo a los 45 días después de la misma.

Las plantas fueron extraídas de los vasos para realizar los muestreos. Las raíces se humedecieron para retirar el sustrato sin dañar la raíz, y proceder a la detección de infección radical. La cuantificación de infección radical se realizó mediante el procedimiento de Kormanik y McGraw (1982) modificado, las raíces se sometieron a un aclareo, seguido de una tinción con azul tripano y se observaron al microscopio para detectar estructuras del hongo micorrízico (hifas, vesículas y arbusculos). En cada unidad experimental se determinó el porcentaje de colonización en un total de 15 raicillas analizadas.

Diseño de experimento y análisis estadístico

Los experimentos de interacción entre cada organismo benéfico y las líneas modificadas se realizaron de manera independiente bajo un diseño completamente al azar. Cada microorganismo benéfico (*T. harzianum*, *R. tropici* o *R. intraradices*) fue inoculado en las cinco líneas de frijol modificado genéticamente con el gen *pdf1.2* (L2, L3, L4, L7 y L9) y el testigo no modificado Flor de Mayo Anita, en al menos tres repeticiones. La unidad experimental fue una maceta con una planta. El análisis estadístico consistió en

¹Dr. Oscar A. Grageda Cabrera, Investigador, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato.

un análisis de varianza y comparación de medias a través de la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$), mediante el paquete estadístico Minitab®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación poblacional de *T. harzianum*

La evaluación de la concentración final de *T. harzianum* presente en el suelo que estuvo en contacto con las plantas FMA-*pdf1.2* L2, L3, L4, L7 y L9 mostró un incremento a los 46 días después de la inoculación con respecto a la concentración inicial aplicada (Figura 1). Aunque el incremento de la concentración de *Trichoderma* en las plantas FMA no modificadas fue significativamente mayor en comparación con las poblaciones de frijol FMA-*pdf1.2*; en ambos casos lograron un aumento en la concentración final en un espectro de 3.6×10^5 a 4.6×10^5 UFC mL⁻¹. La comparación de medias entre poblaciones de frijol FMA-*pdf1.2* indicó un comportamiento homogéneo en la concentración final de UFC de *Trichoderma*, por lo que la disminución en la colonización no parece deberse únicamente a la defensina recombinante, pues se encontraron diferencias importantes en los niveles de expresión transcripcional en cada línea FMA-*pdf1.2* (Espinosa-Huerta *et al.*, 2013). De acuerdo con Salas-Marina *et al.* (2011), la inoculación de *Trichoderma atroviride* en raíces de *Arabidopsis* promueve la expresión de genes de resistencia como PR-1a (función desconocida), PR-2 (β -1, 3-glucanasa), PDF1.2 (defensina), LOX-1 (lipoxygenasa 1) y ATPCA (peroxidasa a) en hojas y raíces a partir de las

96 h de su inoculación; esto sugiere que la inoculación de *T. harzianum* en raíces de frijol podría promover vía señalización, la expresión de otros genes de defensa y que se haya detonado un efecto sinérgico transitorio entre éstos y la defensina recombinante que pudieran reducir la capacidad de reproducción (UFC) de *T. harzianum* en las plantas FMA-*pdf1.2*.

Conteo de nódulos en plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium tropici*

Las plantas de frijol inoculadas presentaron un efecto de simbiosis con la bacteria *R. tropici* y visualmente no se percibieron diferencias en la densidad de nódulos formados en las raíces de plantas no modificadas y las plantas de las líneas FMA-*pdf1.2* (Figura 2); sin embargo, hay diferencias estadísticas significativas entre las poblaciones de frijol FMA-*pdf1.2* y la población de plantas de frijol no modificado, así como entre las poblaciones de las líneas L3 y L7 ($P = 0.0019$) (Figura 3). En este sentido, se observó una correlación entre la producción de defensina de estas líneas y su capacidad para formar nódulos, ya que de acuerdo con Espinosa-Huerta *et al.* (2013), la línea L3 mostró una reducción en los niveles de expresión transcripcional del gen *pdf1.2* de hasta 30 % con respecto a la línea L7.

Los valores de número de nódulos de todas las líneas FMA-*pdf1.2* y el frijol no modificado se encontraron dentro del intervalo definido por el CIAT (1987) como Excelente (> 80) para un frijol de hábito de crecimiento indeterminado

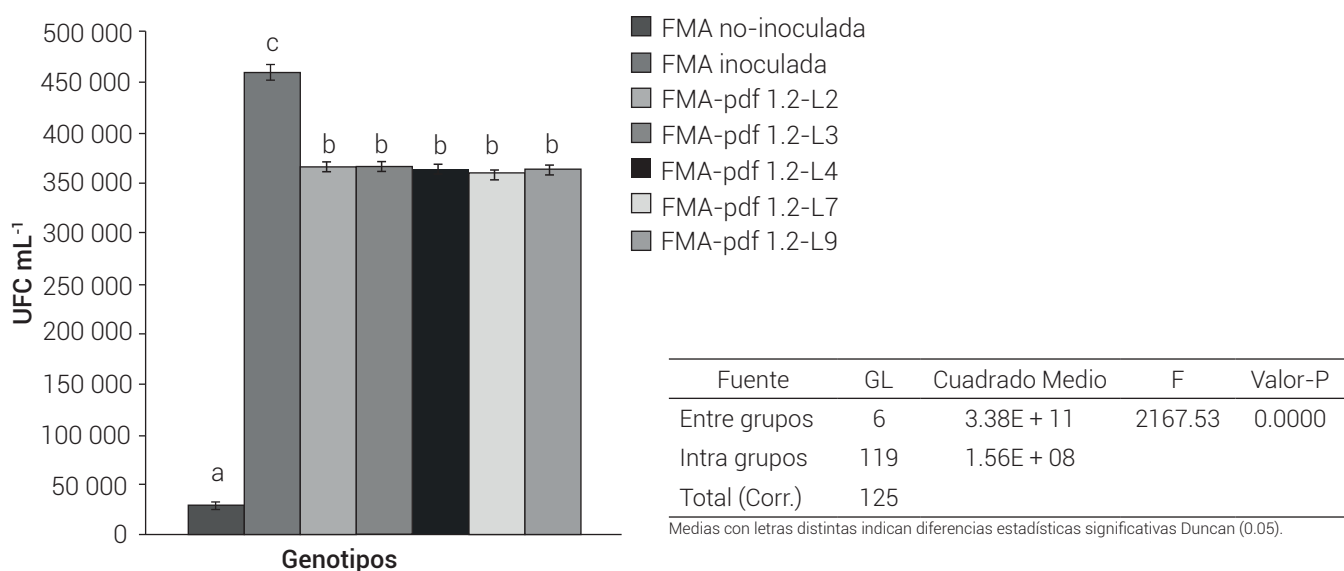
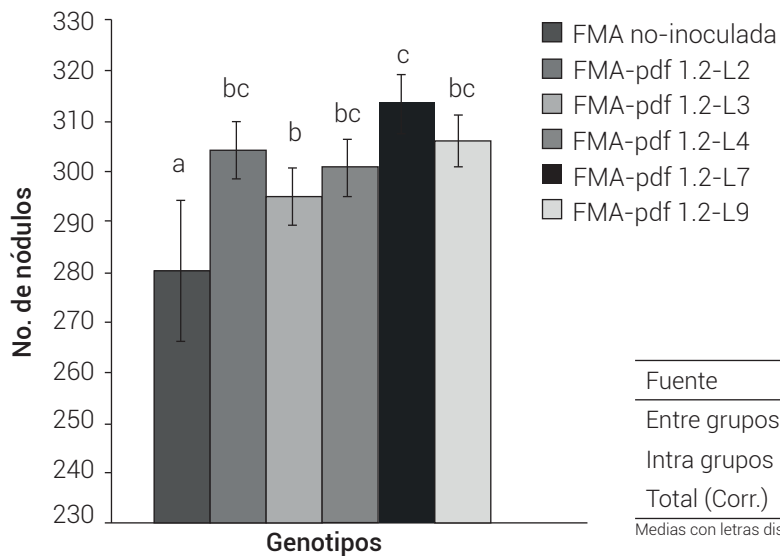


Figura 1. Contenido poblacional de *Trichoderma harzianum* a los 46 días después de la inoculación en plantas de frijol. Testigo FMA: Frijol Flor de Mayo Anita no modificada; FMA-*pdf1.2*-L2 a L9: líneas de frijol Flor de Mayo Anita modificadas con el gen *pdf1.2* e inoculadas.



Figura 2. Formación de nódulos en raíces de frijol inoculadas con *Rhizobium tropici*. A. Raíces de plantas de frijol Flor de Mayo Anita no modificada; B. Línea de frijol FMA-*pdf1.2-L9*.



| Fuente | GL | Cuadrado Medio | F | Valor-P |
|---------------|----|----------------|------|---------|
| Entre grupos | 5 | 664.705 | 5.36 | 0.0019 |
| Intra grupos | 24 | 124.015 | | |
| Total (Corr.) | 29 | | | |

Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas Duncan (0.05).

Figura 3. Conteo de nódulos presentes en plantas de frijol Flor de Mayo Anita a los 40 días posteriores a su inoculación con *Rhizobium tropici*. FMA-inóculo testigo: Frijol sin transformar inoculado y FMA-*pdf1.2-L2* a L9: Líneas de frijol modificadas con el gen *pdf1.2* inoculadas.

como lo es Flor de Mayo Anita. Los valores promedio del número de nódulos por planta oscilaron entre 280 y 313, por lo que se puede concluir que la relación simbiótica entre las poblaciones de líneas de frijol FMA-*pdf1.2* y la bacteria benéfica fijadora de nitrógeno *R. tropici* se ve favorecida por efecto de la defensina.

Si bien la proteína que codifica el gen *pdf1.2* es específica para el control de hongos y no se esperaba efecto sobre bacterias, era importante evaluarlo con *Rhizobium* sp., particularmente por tratarse de una relación simbiótica esencial con frijol desde el punto de vista de producción agrícola. La capacidad de las líneas FMA-*pdf1.2* para formar nódulos fue mayor que en las plantas de frijol no modificadas. No es claro el efecto que pudo haber tenido la expresión de la proteína PDF1.2 en la formación de nódulos a favor de las líneas modificadas.

Colonización de *R. intraradices* en raíces de frijol

Derivado de la inoculación de *R. intraradices* en poblaciones de líneas de frijol FMA-*pdf1.2* que habían mostrado resistencia a *C. lindemuthianum* (patotipos 1472 y 448) en un bioensayo previo (Espinosa-Huerta et al., 2013), se observó que las poblaciones de plantas de frijol Flor de Mayo Anita no modificadas mostraron una baja colonización del hongo en las raíces (25 %) y ésta se vió más reducida de manera inconsistente en las raíces de las líneas de frijol FMA-*pdf1.2* en sus tres repeticiones 45 días posterior a su germinación (Cuadro 1). Es posible que en este caso se trate de una baja especificidad de *R. intraradices* por la planta hospedera, o bien que las condiciones experimentales no hayan favorecido la colonización.

Aun cuando los niveles de colonización micorrízica fueron menores en las poblaciones de líneas FMA-*pdf1.2*, la colonización no mostró diferencias entre poblaciones de líneas de frijol FMA-*pdf1.2* (Figura 4); asimismo, esta reducción no afectó el desarrollo de las plantas; es decir, tanto las plantas colonizadas como las no colonizadas tuvieron un desempeño similar en su desarrollo.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Stewart et al. (2007), quienes reportaron que plantas de *N. tabacum* transformadas con los genes de péptidos antimicrobianos MSI-99 (transformación de cloroplastos) y D4E1 (transformación nuclear) fueron probados por su habilidad para formar asociaciones micorrízicas comparadas con el genotipo silvestre; no observaron efectos deletéreos en el porcentaje de colonización con *Gigaspora rosea* o *Glomus mosseae*; además, las líneas de tabaco transformadas que expresaban MSI-99 en cloroplastos tuvieron un porcentaje mayor de colonización que el genotipo silvestre. Los resultados indican que las asociaciones micorrízicas en tabaco no fueron afectadas negativamente por la expresión de los genes probados (Stewart et al., 2007).

En el caso de las líneas de frijol FMA-*pdf1.2*, en las que la transformación es nuclear y la expresión de la proteína defensina es constitutiva, el hongo arbuscular *R. intraradices* estuvo expuesto a la proteína, a diferencia de la defensina expresada en cloroplastos (MSI-99). La proteína codificada por el gen *pdf1.2* tiene la habilidad de inhibir hongos, por lo que existe la posibilidad de que ocurra una limitación de la colonización de la micorriza con *R. intraradices* a nivel de espacios intercelulares entre células corticales y en el apoplasto intracelular.

Cuadro 1. Porcentaje de infección radical por *Rhizophagus intraradices* en plantas de frijol Flor de Mayo Anita modificado con el gen defensina *pdf1.2*.

| Tratamiento | Infección radical (%) | | |
|------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| | R1 ^{††} | R2 ^{††} | R3 ^{††} |
| FMA [†] | 0 | 0 | 0 |
| 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 |

[†]FMA: Flor de Mayo Anita, i: inoculado con *Rhizophagus intraradices*. 448 y 1472 son cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* para las cuales las líneas de frijol modificadas fueron R: resistentes o T: tolerantes. ^{††} Réplica de experimento.

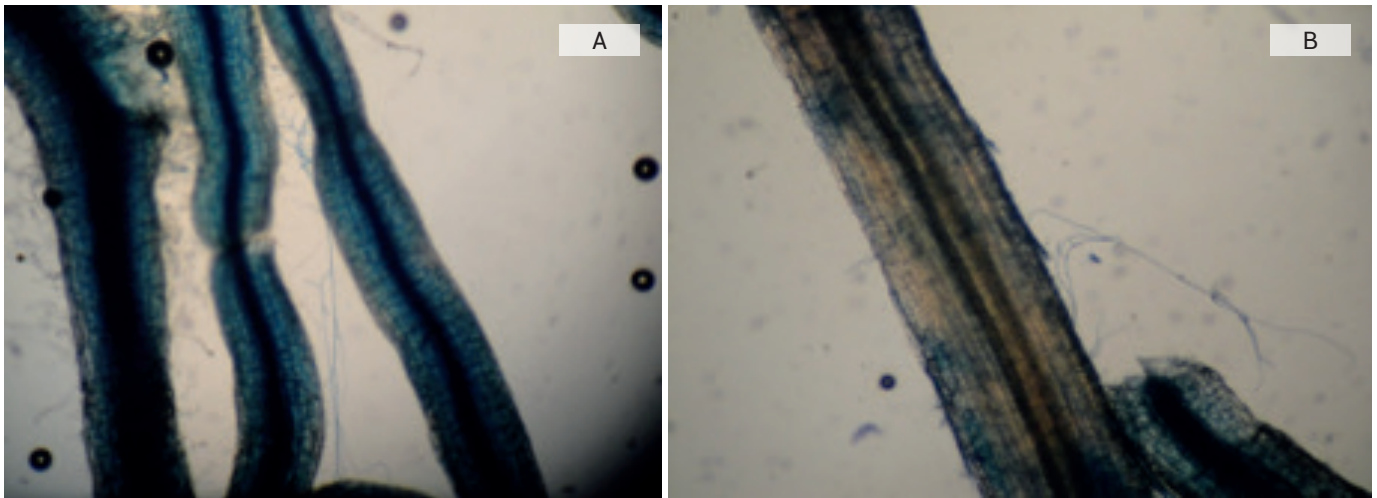


Figura 4. Colonización de raíces de frijol inoculadas con *Rhizophagus intraradices*. A. Raíces de plantas de frijol Flor de Mayo Anita no modificadas; B. Línea modificada genéticamente FMA-*pdf1.2*-L9-448-R.

Evaluación de riesgo ambiental en organismos no-blanco

La hipótesis de un posible riesgo donde la proteína PDF1.2 expresada en los tejidos del frijol afectaría a microorganismos benéficos en el agroecosistema experimental con la consecuente pérdida de su biodiversidad y limitaciones en su efecto benéfico fue originalmente planteada para reunir todos los posibles elementos que establecerían el nivel del riesgo y un posible daño durante la liberación al ambiente; sin embargo, la caracterización del riesgo (probabilidad de la exposición al riesgo y las consecuencias de esta exposición) estableció que si bien la defensina se expresa de manera constitutiva en la planta de frijol y ésta tiene contacto con microorganismos benéficos, resultando en algunos casos con reducciones en el nivel de colonización o UFC con respecto a las plantas no modificadas (*T. harzianum* y *R. intraradices*), la defensina no interfirió en la respuesta de reconocimiento para el establecimiento de simbiosis de estos hongos benéficos antagonistas de patógeno y micorrízico y, si bien afectó la abundancia alcanzada por sus poblaciones, no las erradicó; por lo tanto, se considera que la probabilidad de que estos hongos benéficos sean inhibidos completamente por la defensina dentro del agroecosistema es baja. Asimismo, el componente bacteriano *R. tropici* encargado de la fijación de nitrógeno a través de la formación de nódulos no vio afectada negativamente su capacidad nodulante; por el contrario, ésta se favoreció en comparación con las plantas no modificadas. Por lo anterior, se establece que las características del frijol FMA-*pdf1.2* no representan un riesgo para este organismo bajo las condiciones probadas.

CONCLUSIONES

Las líneas de frijol modificadas con el gen *pdf1.2* que confiere resistencia de amplio espectro contra hongos patógenos mostraron un fenotipo diferencial con respecto a la capacidad de crecimiento en la rizósfera y al establecimiento de la asociación simbiótica con los microorganismos benéficos *T. harzianum*, *R. tropici* y *R. intraradices*. La nodulación por *R. tropici* se favorece por la presencia de la defensina en las plantas FMA-*pdf1.2* en contraste con las plantas no modificadas, mientras que la colonización de *R. intraradices* y *T. harzianum* se inhibe en baja proporción por la defensina, sin riesgo de que se eliminen las poblaciones. En términos de evaluación de riesgo ambiental, el efecto de la defensina PDF1.2 sobre organismos benéficos como *T. harzianum*, *R. intraradices* y *R. tropici* en cuanto a su capacidad para reconocer, sobrevivir, desarrollarse e infectar plantas del frijol FMA-*pdf1.2* es limitado, por lo que su efecto en un agroecosistema experimental abierto puede ser mínimo.

BIBLIOGRAFÍA

- Castellanos R. J. Z., H. Guzmán-Maldonado, J. J. Muñoz-Ramos y J. A. Acosta-Gallegos (2003) Flor de Mayo Anita, nueva variedad de frijol para la región central de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26:209-211.
- CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical (1987) Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Frijol. A. van Schoonhoven y M. A. Pastor-Corrales (comps.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 56 p.
- de Carvalho M. H. C., B. V. Le, Y. Zuily-Fodil, A. T. P. Thi and K. T. T. Van (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159:223-232, [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00346-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00346-0)

- Espinosa-Huerta E., A. Quintero-Jiménez, B. M. Sánchez-García, J. A. Acosta-Gallegos y M. A. Mora-Avilés (2013) Resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol común transgénico, expresando el gen defensina de *Arabidopsis thaliana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4:1027-1042.
- Ezziyyani M., M. C. Pérez S., A. Sid A., M. A. Requena y M. E. Candela (2004) *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26:35-45.
- Gao A. G., S. M. Hakimi, C. A. Mittanck, Y. Wu, B. M. Woerner, D. M. Stark, D. M. Shah, J. Liang and C. M. T. Rommens (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* 18:1307-1310, <https://doi.org/10.1038/82436>
- Gomes D. F., E. Ormeño-Orrillo and M. Hungria (2015) Biodiversity, symbiotic efficiency, and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In: Biological Nitrogen Fixation. F. J. de Bruijn (ed.). John Wiley and Sons. Hoboken, NJ, USA. pp:747-756, <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch74>
- Guerrero F. E. (1996) Micorrizas. Recurso Biológico del Suelo. Fondo FEN Colombia. Bogotá. 208 p.
- Harman G. E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84:377-393, <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>
- Infante D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes (2009) Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24:14-21.
- INVAM, International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (2017) Available cultures. West Virginia University. Morgantown, West Virginia, USA. <https://invam.wvu.edu/culture-methods/accessions-search/cultures?id=440> (Marzo 2017).
- Kormanik P. P. and A. C. McGraw (1982) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Methods and Principles of Mycorrhizal Research. N. C. Schenck (ed.). American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp:37-45.
- Lloret L. y E. Martínez-Romero (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47:43-60.
- López-Ortiz C., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón, J. J. Almaraz, E. Martínez-Romero y M. R. Mendoza-López (2012) Establecimiento y respuestas fisiológicas de la simbiosis *Rhizobium tropici*-*Leucaena leucocephala* en presencia de fenantreno y naftaleno. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28:333-342.
- Martínez-Medina A., J. A. Pascual, F. Pérez-Alfocea, A. Albacete and A. Roldán (2010) *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology* 100:682-688, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-7-0682>
- Martínez-Romero E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham and M. A. Pardo (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:417-426, <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>
- Parashina E. V., L. A. Serdobinskii, E. G. Kalle, N. V. Lavrova, V. A. Avetisov, V. G. Lunin and B. S. Naroditsky (2000) Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. *Russian Journal of Plant Physiology* 47:417-423.
- Salas-Marina M. A., M. A. Silva-Flores, E. E. Uresti-Rivera, E. Castro-Longoria, A. Herrera-Estrella and S. Casas-Flores (2011) Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology* 131:15-26, <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9782-6>
- Sallam N. M. A., K. A. M. Albo-Elyousr and M. A. E. Hassan (2008) Evaluation of *Trichoderma* species as biocontrol agents for damping-off and wilt diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. *Egyptian Journal of Phytopathology* 36:81-93.
- Sánchez-García B. M., E. Espinosa-Huerta, E. Villordo-Pineda, R. Rodríguez-Guerra y M. A. Mora-Avilés (2017) Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia* 51:63-79.
- Secretaría de Salud (2005) Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. 18 marzo 2005. pp:54-85.
- Sieverding E. y J. M. Barea (1991) Perspectivas de la inoculación de sistemas de producción vegetal con hongos formadores de micorrizas VA. In: Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Vol. II. Fijación de N y Micorrizas. J. Olivares y J. M. Barea (coords.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. pp:221-245.
- Stewart J. M., C. Nader and K. Rajasekaran (2007) Effect of antimicrobial peptides (AMPS) on mycorrhizal associations. *AAES Research Series* 562:163-166.
- Terras F. R. G., K. Eggermont, V. Kovaleva, N. V. Raikhel, R. W. Osborn, A. Kester, S. B. Rees, S. Torrekens, F. Van Leuven, J. Vanderleyden, B. P. A. Cammue and W. F. Broekaert (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell* 7:573-588, <https://doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>
- Wang Y., G. Nowak, D. Culley, L. A. Hadwiger and B. Fristensky (1999) Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:410-418, <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.5.410>