

ACADEMIA DE INGENIERÍA

REFLEXIONES EN TORNO A LA
INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

DISCURSO DE LA ACADÉMICA ELECTA

EXCMA. SRA. D^a. PILAR CARBONERO ZALDUEGUI

LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN PÚBLICA
EL DÍA 3 DE JUNIO DE 2003

Y CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO

EXCMO. SR. D. ENRIQUE CERDÁ OLMEDO



MADRID MMIII

Editado por la Academia de Ingeniería
© 2003, Academia de Ingeniería
© 2003 del texto, Pilar Carbonero Zalduegui
ISBN: 84-95662-14-0
Depósito legal: M-24.690-2003
Impreso en España

REFLEXIONES EN TORNO A LA
INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

Excelentísimo Señor Presidente,
Excelentísimos Señores Académicos,
Señoras y Señores:

Debo empezar expresando mi alegría y mi agradecimiento a los miembros de esta Academia de Ingeniería de España por su generosa acogida y por el honor que me hacen con su elección. Quiero concretar mi gratitud haciendo mención explícita de las personas que más directamente han tenido que ver con que yo hoy reciba tan inmerecido reconocimiento. Lo haré en orden cronológico, citando en primer lugar a mis padres, ambos vinculados profesionalmente al noble arte de la agricultura y la ganadería, quienes sin duda sembraron la semilla de mi vocación; especialmente mi madre, la primera mujer –y la única durante décadas– que formó parte del Cuerpo Nacional Veterinario, quien con su ejemplo me abrió un camino que parecía vedado. Junto a mis padres, mis hijas y sobre todo, mi marido, con quien he compartido además mi aventura científica. En segundo lugar a mis maestros, los profesores Enrique Sánchez-Monge, a quien debo mi iniciación a la Genética, Juan Santa María Ledochowski, quien desveló para mí el mundo de los microbios y dirigió mi tesis doctoral, y finalmente James Jezeski, de la Universidad de Minnesota, quien me enseñó cómo los conocimientos genéticos y microbiológicos podían ser relevantes en la cotidianidad de una planta de producción industrial. En tercer lugar, debo dar mis más sinceras gracias al Profesor Enrique Cerdá, por sus sugerencias en la redacción de este discurso y por el honor que me hace con su Contestación.

He elegido centrar mi discurso de investidura en una ingeniería de reciente desarrollo, la Ingeniería Genética Vegetal, una especialidad híbrida que integra dos tradiciones de innovación: la que desde Mendel entronca con el descubrimiento de la estructura en doble hélice del ADN y con la transformación genética de otros tipos de organismos, y esa otra que desde la domesticación de las plantas por el hombre neolítico conduce al repertorio tecnológico de la moderna mejora vegetal, pasando por la revolución verde que supuso la obtención de los trigos semi-enanos de Norman Borlaug y los arroces de ciclo corto producidos en el International Rice Research Institute, en Filipinas. Mi intención es compartir con ustedes algunas reflexiones en torno a esta joven ingeniería y situar en su contexto algunas de mis contribuciones a ella.

1

Nuestra civilización nació hace casi diez milenios en las faldas de las montañas de Karacadag, en el sureste de Turquía, entre el Tigris y el Éufrates y lo hizo como resultado de la alteración dirigida del ADN del trigo diploide, *Triticum monococcum*. Otras grandes civilizaciones que se fundaron a partir de la domesticación del arroz en el Oriente Lejano, del sorgo en África o del maíz en América, tuvieron un origen equivalente e independiente.

Ha sido posible identificar el lugar donde se produjo el hecho fundacional de la domesticación del trigo debido a las nuevas técnicas para analizar el ADN, gracias a la moderna Ingeniería Genética. En efecto, la comparación detallada del material genético de los cientos de accesiones que se conservan del trigo diploide domesticado, la escaña menor, cuyo cultivo pervivió hasta entrado el siglo xx, y del de más de un millar de las poblaciones silvestres existentes ha permitido muy recientemente concluir que la domesticación del mencionado trigo se realizó una sola vez en la historia, dada la escasa variabilidad genética de las muestras cultivadas, y que el ADN de dichas muestras sólo se parece al de una población silvestre cuyo hábitat se restringe a la mencionada localidad de Karacadag, difiriendo significativamente de cualquier otra investigada¹.

Por comparación de los genomas de las especies cultivadas con las silvestres de las que se derivaron, puede concluirse que las domesticaciones consistieron en alteraciones del ADN, que fueron extensas y empujaron sus contenidos informativos *contra natura*, de lo silvestre a lo doméstico, de lo tóxico a lo inocuo, de la vida autónoma a la estrictamente dependiente del hombre. Cuando se analizan cuáles fueron los cambios cruciales introducidos en cada uno de los eventos de domesticación, se puede constatar que éstos fueron esencialmente los mismos en los distintos casos fundacionales, que en definitiva se trató del mismo invento, repetido con independencia en distintas áreas geográficas.

Hace diez milenios que lo que el ser humano consume dejó de ser natural porque tanto los cambios iniciales como la mejora subsiguiente incapacitaron por completo a la especie cultivada para la vida libre en la naturaleza, que es el criterio determinante para considerar a una especie como natural. Las especies cultivadas dependen del ser humano para completar sus ciclos vitales en la misma

medida que el hombre depende hoy de ellas para su supervivencia: sin el cultivo, la biosfera sólo podría sustentar del orden de una centésima parte de la actual población mundial.

Natural no es sinónimo de *inocuo*. Entre las alteraciones genéticas introducidas en la domesticación se incluye lo que en terminología actual llamaríamos el *bloqueo* de genes responsables de las rutas sintéticas de muchas sustancias tóxicas: las patatas o las cerezas que podemos adquirir en el mercado tienen sustancias tóxicas en concentraciones que son varios órdenes de magnitud inferiores a las de sus antecesoras silvestres.

La domesticación supuso la adición del elemento final e integrador de un repertorio científico y tecnológico que se había venido forjando paulatinamente –conocimiento botánico, concepción del campo de cultivo, siembra, recolección, riego–, al que propiamente podemos denominar ‘Ingeniería Agronómica’. Ese elemento, que completó el invento básico de la tecnología agrícola, de la agricultura, fue de índole genética: parafraseando a Molière, hace diez milenios que la humanidad ha hecho genética sin saberlo, que ha hecho tecnología antes que ciencia. En términos moleculares, los cambios introducidos en esa fase de nuestra historia no difieren en absoluto de los que ahora pueden dirigirse por las modernas técnicas de la Ingeniería Genética. De un cambio genético, lo único importante es en qué ha consistido, no el método seguido para conseguirlo. El ADN alterado no guarda memoria del procedimiento que lo alumbró, ni de la habilidad, torpeza o grado de conocimiento de quien lo llevó a cabo. Recordando a Gertrude Stein, diremos que un cambio es un cambio es un cambio.

2

Tampoco Gregor Mendel alcanzó a saber que su excelso arte recibiría más tarde el nombre de *Genética* y que provocaría una revolución científica y tecnológica a finales del siguiente siglo. En 1865, hace 138 años, el famoso monje empezó a sacarnos de nuestra ignorancia respecto a lo que veníamos haciendo. Mendel jugó sin saberlo con el ADN del guisante: liso/rugoso, alto/bajo, verde/amarillo... Mendel no llegó tampoco a saber que en realidad jugaba con alteraciones del ADN. Hoy, gracias a la Ingeniería Genética, conocemos las precisas alteraciones del ADN que son responsables de muchas de esas mágicas parejas de caracteres.

Luego vino Charles Darwin, que no leyó a Mendel y no pudo asumir a ciencia cierta la base genética del fenómeno evolutivo. En cambio Mendel, que sí leyó a Darwin, supo señalar en los márgenes de las obras de éste la relevancia de los nexos entre sus respectivas observaciones.

Bien entrado el siglo xx, se alcanzó la gran síntesis mendeliana-darwiniana, pero los mejoradores vegetales siguieron teniendo éxito –en la obtención de nuevas variedades cultivadas– no ya ignorando que, al hacerlo, hacían genética sino desdeñando explícitamente la nueva ciencia. Así por ejemplo, como ha señalado Enrique Sánchez-Monge, el conocido mejorador italiano Nazareno Strampelli (1866-1942) obtuvo excelentes variedades de trigo hexaploide mientras se jactaba de no prestar atención a los avances genéticos. Por supuesto ignoraba que su juego consistía en salvar alteraciones del ADN que de otra forma no hubieran sobrevivido en la naturaleza.

Hace poco más de medio siglo, justo antes del descubrimiento de la estructura en doble hélice del ADN, Barbara McClintock se adelantó a su tiempo cuando supo ver que unos colores cambiantes en el grano de maíz delataban una realidad de genes que saltaban de un lugar a otro del genoma, de forma autónoma o a las órdenes de otros genes. Hoy, gracias a la nueva ingeniería, conocemos las precisas características del ADN correspondiente a esos genes saltarines.

El descubrimiento de la estructura en doble hélice del ADN, cuyo cincuentenario se celebra en estos días, dio cuerpo físico a ese ente de razón que había sido el gen hasta el momento. Y de propina sugirió de forma inmediata los posibles mecanismos de su transmisión y expresión. Puede decirse, tal vez exagerando un poco, que también sugería un camino hacia un desarrollo tecnológico que tardaría aún dos décadas en empezar a producirse, y tres décadas en desembocar en la Ingeniería Genética Vegetal.

Cuando poco después de ese descubrimiento se inicia la revolución verde –la segunda revolución verde, si se considera como primera a la neolítica– se incorpora a la práctica de la mejora el contenido conceptual de la gran síntesis mendeliana-darwiniana, pero es pronto aún para incorporar la idea del gen como ente físico. De hecho, la gracia de los trigos semi-ena-

nos de Norman Borlaug –que fueron cruciales para derrotar la maldición maltusiana en la segunda mitad del siglo xx– consiste en un gen para enanismo que es el equivalente exacto en el trigo del que manejó Mendel en el guisante. Pero eso no se sabría hasta que más tarde, gracias a la Ingeniería Genética Vegetal, se clonaron los trozos de ADN correspondientes y se comprobaron sus efectos *in planta*.

3

Todos los caminos que emprendimos a mediados de los años sesenta y que proseguimos con ahínco en la siguiente década, conducían hacia la nueva tecnología y no se pudieron recorrer del todo hasta que ésta estuvo a punto. Para ilustrar esta idea me referiré de forma sucinta y a modo de ejemplo a dos aventuras en las que participé activamente: la elaboración de rudimentarios mapas genéticos de los trigos y especies afines, mediante marcadores moleculares, y el desvelamiento inicial de un mecanismo de defensa de las plantas frente a sus patógenos.

Ernest Sears, famoso citogenético que durante un tiempo presidió la Sociedad Americana de Genética, desarrolló a lo largo de muchos años variantes genéticas del cultivar 'Chinese Spring', un trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.). Dichas variantes consistían en deleciones o adiciones de segmentos cromosómicos, brazos cromosómicos o cromosomas enteros, así como de sustituciones totales o parciales de cromosomas del trigo por cromosomas equivalentes de especies silvestres más o menos distantes. Nosotros aprovechamos este rico material genético para localizar –en regiones concretas de los distintos genomas– los genes correspondientes a proteínas y lípidos del grano de trigo, y luego usamos esa información para aprovechar dichos caracteres bioquímicos como marcadores en la manipulación de caracteres de interés agronómico. Entre las diversas aplicaciones directas de nuestro trabajo merece mencionarse el uso de los marcadores en el primer injerto de un segmento interno de un cromosoma foráneo a una especie cultivada, lo que alguien reseñó en su momento como primer logro de la 'Ingeniería Cromosómica'. Concretamente, la transferencia de un segmento interno (portador de un gen de resistencia al hongo *Puccinia recondita*) del brazo α del cromosoma 3A de la gramínea silvestre *Agropyron elongatum* al cromosoma 3B del trigo, conseguido por Sears, fue posible gracias a nuestro marcadores². El continuado apoyo del mencionado investiga-

dor a nuestro trabajo quedó reflejado en muchas de las publicaciones suyas y nuestras, así como en las decenas de cartas que intercambiamos en esa época. Sears medió también de forma entusiasta en la publicación de nuestro trabajo en los selectos *Proceedings of the National Academy of Sciences*³. Siempre le recordaremos con agradecimiento y cariño. Ni él ni nosotros podíamos imaginar entonces que en menos de una década, gracias a la Ingeniería Genética Vegetal, ese mismo trabajo se hubiera podido realizar con gran facilidad mediante el uso como marcadores moleculares de segmentos clonados del ADN de trigo.

El segundo ejemplo es tal vez más relevante, aunque en su día no fuéramos plenamente conscientes de ello. Hace más de treinta años, nosotros habíamos constatado la presencia de variantes genéticas de unos péptidos antibióticos, que se habían denominado *purotioninas*, en gramíneas silvestres y cultivadas de la familia del trigo⁴. De estas observaciones nos surgió la idea de que éstos podrían formar parte del sistema de defensa de las plantas frente a las enfermedades y sometimos dicha hipótesis a prueba al demostrar que dichos péptidos eran en efecto activos frente a patógenos vegetales en el tubo de ensayo^{5,6}. Ésta fue la primera vez que un péptido antibiótico producido por un organismo superior mostró actividad *in vitro* frente a patógenos del mismo tipo de organismo. Una década después se encontraron péptidos antibióticos en insectos y en humanos, lo que generalizó el interés por este mecanismo de defensa, en la actualidad conocido y estudiado como 'Inmunidad Innata'. De nuevo, la demostración fehaciente de que este fenómeno se produce *in planta* lo mismo que *in vitro* se ha basado en experimentos de Ingeniería Genética: de acuerdo con la hipótesis, la sobre-expresión transgénica de los genes que codifican para estos péptidos reducen los síntomas producidos por una cepa dada de patógeno⁷, y lo mismo ocurre si se inutilizan los genes responsables de la defensa del patógeno frente a los péptidos.

4

Tuve el privilegio de participar en el Miami Winter Symposium, en Miami Beach, en el que se anunció oficialmente al mundo la obtención de las primeras plantas transgénicas. Era el mes de enero de 1983, por lo que han pasado veinte años desde que se abrió la vía hacia la Ingeniería Genética Vegetal. Yo no estaba allí por casualidad, ya que llevaba meses esperando

el acontecimiento. Primero había aprendido los rudimentos de la nueva tecnología bajo los auspicios de EMBO, y después había pasado un año sabbático con el excelente científico y añorado amigo Eladio Viñuela, adquiriendo experiencia mientras ayudaba a la caracterización del genoma del virus de la peste porcina africana. A continuación había pasado parte de un verano en un curioso curso experimental en el mítico laboratorio de Cold Spring Harbor. Bajo el lema '*Molecular biologists look at green plants*' nos habíamos congregado poco más de una docena de científicos a aprender los últimos avances relativos a las plantas. Varios de los alumnos eran mucho más conocidos que algunos de los profesores. Estos últimos debían repetir experimentalmente sus propias aportaciones y a menudo fracasaban porque todavía no estaban muy refinadas. La razón de esta insólita situación era que se había desatado una verdadera fiebre del oro con respecto a las plantas, y notables científicos de otras áreas andaban deseosos de desembarcar sin demora en la nueva tierra de promisión. No era nuestro caso, porque nosotros estábamos en la tesitura de tener que cambiar deprisa si queríamos seguir en el mismo tajo donde veníamos estando. Todos los participantes tuvimos que dar conferencias sobre nuestro trabajo y a ellas solía asistir mi admirada Barbara McClintock⁸, que todavía hubo de esperar a cumplir 83 años para que su trabajo fuera finalmente reconocido con el Premio Nobel. McClintock era temida por lo incisivo de sus preguntas y no me fue nada fácil dar mi conferencia con ella en primera fila. Sin embargo, en mi caso sólo recibí de ella amabilidad, interés por mi investigación y buenos consejos.

La posibilidad de obtener plantas transgénicas puso en nuestras manos una herramienta de conocimiento científico antes que un instrumento útil en la vida cotidiana, y dio lugar a una revolución científica antes que a una revolución tecnológica. Esto es lo habitual. Sin embargo, casi nunca con anterioridad conocimiento y aplicación han evolucionado tan unidos: unidos en el tiempo, ya que a menudo ambos han estado surgiendo de modo sincrónico, y unidos en el espacio, ya que con frecuencia uno y otra han surgido del mismo banco de laboratorio.

La nueva tecnología ha dado un impulso incalculable a nuestro conocimiento del mundo vegetal. Nuevas hormonas vegetales, cuando parecía que ya estaban todas descubiertas; genes que se activan cuando el viento mece a una planta, o al tocarla, o cuando la visita la helada o el golpe de

calor; cadenas intra o intercelulares de transducción de señales; las señales de la enfermedad o de la vil herida por un insecto; cómo las plantas se avisan unas a otras; el control genético del desarrollo floral... y la lista sería interminable si quisiéramos seguir enumerando los nuevos conocimientos que tal vez nunca hubiéramos adquirido sin el concurso de una nueva metodología que nos permite añadir o suprimir piezas de una maquinaria compleja, precisamente para tratar de averiguar sus funciones.

5

Nosotros, que éramos y somos científicos, nos convertimos sin sentirlo en ingenieros cuando de nuestras observaciones básicas nos surgían ideas para alterar beneficiosamente la compleja maquinaria productiva que es una planta cultivada, y esas ideas resultaban ejecutables precisamente mediante la aplicación de los mismos trucos tecnológicos usados en la búsqueda de nuevo conocimiento: añadir y quitar información funcional. Hace quince años, no podíamos imaginar que de nuestras investigaciones surgirían aplicaciones cuya propiedad intelectual se vendería por nuestra universidad en el mercado internacional sin que siquiera nos lo propusiéramos.

La primera generación de variedades transgénicas responde comprensiblemente a las aplicaciones más sencillas, a aquéllas en las que el carácter de interés agronómico depende de un solo gen. Así se obtiene, por ejemplo, tolerancia a herbicidas o resistencia a insectos.

Las pérdidas de las cosechas causadas por insectos se cifran como media en torno al 20%, pero pueden llegar a ser superiores al 50% cuando las condiciones ambientales son favorables al desarrollo de la plaga, como ocurre con frecuencia en zonas tropicales y subtropicales. Incluso en una agricultura altamente tecnificada, estas pérdidas pueden ser importantes a pesar de la utilización racional de insecticidas. No hay que olvidar que a las pérdidas causadas por los insectos de un modo directo por ingestión de hojas, flores, raíces y semillas, hay que añadir las causadas indirectamente: en su papel de vectores de virus y bacterias fitopatógenas o de facilitadores de infecciones oportunistas por hongos o bacterias. Las prácticas agrícolas modernas (regadíos, monocultivos, etc.) así como el aumento de la temperatura a escala global y la pérdida de sus enemigos naturales, tienden a favorecer el desarrollo de las plagas de insectos en los cultivos.

Una de las primeras aplicaciones prácticas de la Ingeniería Genética Vegetal consistió en hacer que las plantas expresaran una proteína insecticida, la proteína Bt producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis*. En 1987, una pequeña empresa de Biotecnología, Plant Genetics Systems, creada al amparo de la Universidad de Gante (Bélgica), demostró que unos tabacos transgénicos que expresaban la proteína Bt eran más resistentes al ataque de las voraces larvas del lepidóptero *Manduca sexta* que los controles sin transformar⁹. A partir de este momento aparecen numerosas patentes relativas a distintas variantes de la proteína Bt, incluidas las referentes a los maíces transgénicos resistentes al taladro europeo, y las patatas transgénicas resistentes al escarabajo.

En los granos de cereales, una fracción sustancial del contenido proteico está representada por péptidos antimicrobianos e inhibidores de enzimas digestivas de insectos. En particular, nuestros estudios se han centrado en una única familia proteica que engloba inhibidores de α -amilasa y de tripsina. Se han clonado los genes de una veintena de miembros de esta familia y se han estudiado sus propiedades insecticidas *in vitro*. De este modo se han seleccionado aquellos cuya sobre-expresión pudiera ser de interés práctico y se han obtenido las plantas transgénicas correspondientes^{10,11,12}.

El inhibidor de tripsina de cebada BTI-CMe (gen *Itr1*), que es uno de los miembros de esta familia mejor caracterizados, inhibe *in vitro* no sólo tripsina pancreática sino también proteasas tipo-tripsina extraídas del tubo digestivo de larvas de insectos lepidópteros. Hemos obtenido trigos transgénicos que expresan la proteína BTI-CMe y son más resistentes a la polilla de los graneros (*Sitotroga cerealella*). Las larvas alimentadas con las semillas transgénicas alcanzan un peso menor y el porcentaje de las que llegan al último estadio larvario, y al de pupa, es un 30% inferior al de las alimentadas con semillas control no transformadas^{10,11}.

También se expresó este mismo gen *Itr 1* en arroz (*Oryza sativa*), tanto en una variedad de la subespecie *indica* como en otra de la *japonica*, y se observó su efecto insecticida en el curculiónido *Sitophilus oryzae*, una de las plagas de almacén más importantes de este grano. En este estudio, además de la posible aplicación práctica, se hizo una observación básica notable, ya que se demostró la presencia de serín-proteasas (tripsina) en el tracto digestivo de este tipo de insectos, lo que indica que su patrón proteolítico es complejo y no sólo contiene cisteín-proteasas, como se había descrito con anterioridad¹².

Hemos caracterizado también otro gen de cebada (gen *Icy*), no perteneciente a la familia multigénica descrita anteriormente, que codifica un inhibidor de cisteín-proteasas¹³. La proteína codificada por el gen *Icy*, un cistatina de cebada, inhibe papaína, quimopapaína, ficina y catepsina B *in vitro*, y es también un antifúngico potente frente a *Botrytis cinerea*, un hongo necrotrofo causante de una importante enfermedad de la vid. Por experimentos de mutagénesis dirigida hemos podido establecer que la inhibición de proteasas y el poder antifúngico residen en dos partes distintas de la molécula.

Las plantas transgénicas que expresan proteínas insecticidas deberían ocupar un lugar destacado dentro de los programas de control integrado de plagas, ya que la Ingeniería Genética permite expresarlas donde y cuando se necesitan. Al permitir una reducción sustancial en el uso de productos fitosanitarios, el uso de plantas transgénicas resistentes a plagas de insectos supone una importante disminución en la diseminación de productos químicos en el medio ambiente.

Las investigaciones que acabo de resumir, corresponden a caracteres potencialmente agronómicos cuyo control genético es simple. Sin embargo, muchos de los procesos y características de interés responden a un control genético más complejo, y comprender su regulación está entre los objetivos de las investigaciones actuales. A esto me referiré en lo que sigue.

6

La información genética, que reside en el ácido desoxirribonucleico o ADN, se transmite a la descendencia mediante la replicación de esta macromolécula, cuya estructura es una doble hebra enrollada en una doble hélice antiparalela, e inicia su expresión temporal mediante la transcripción de tramos concretos de una de las hebras. La transcripción implica la síntesis de un ácido ribonucleico o ARN (ARN mensajero) cuya secuencia es complementaria a la hebra transcrita. La maquinaria de transcripción en organismos superiores es compleja, ya que se compone de una serie de piezas de naturaleza proteica, cuyas funciones no es éste el lugar de analizar. De modo conjunto, esta compleja maquinaria realiza una reacción de polimerización ordenada en la que la naturaleza y orden de los monómeros (las bases A, U, G, C) incorporados a la cadena de ARN que se alarga vienen determinadas por la secuencia de bases (A, T,

G, C) en la hebra de ADN que le sirve de molde o guía. La regulación de este proceso es crucial para el desarrollo y funcionamiento de un organismo, ya que implica que dicha maquinaria debe transcribir selectivamente en cada momento una fracción de la información genética y hacerlo con la intensidad requerida para cada 'pieza de información'. Estas 'piezas de información' son los genes.

En efecto, los diferentes tipos de células que componen un organismo tienen todos la misma información genética, pero difieren respecto al repertorio de genes que se están expresando en cada tipo y en cada situación fisiológica, así como respecto a las intensidades con que procede la transcripción de cada uno de los genes expresados. Algunos genes, involucrados en funciones esenciales para todo tipo de células, se expresan siempre, mientras que otros sólo lo hacen en determinados tejidos: los perfiles de expresión serán distintos en un meristemo foliar que en un meristemo floral, en una célula del ápice de la raíz que en una del grano de polen, o en una célula hepática que en una de la retina. Delante de la región que se transcribe de un gen –de su región codificante– se sitúa su 'promotor', secuencia de bases en la que residen en esencia sus características 'informáticas', tramos secuenciales en *cis* a los que se suelen denominar motivos, cuya función consiste en actuar de sitios de reconocimiento para unas proteínas, entre las que se encuentran los llamados 'factores de transcripción'. Estos factores comprometen a la maquinaria de polimerización en la transcripción del gen y determinan los términos de ese compromiso: la cantidad del correspondiente ARN mensajero que producir y el período concreto en que ha de ser producido. La clave está en el control de esta interacción, en el conocimiento de los motivos involucrados en los procesos de interés tecnológico y de los factores de transcripción correspondientes. En definitiva, lo que centra nuestra atención son las señales y los factores que rigen a los genes involucrados en procesos tan diversos como el desarrollo de los distintos órganos y tejidos, las respuestas del organismo a la infección por un patógeno, al ataque de un insecto, las respuestas a los golpes de calor, a la helada, o a la sequía. Obtendremos valiosa información al respecto, realizando dos operaciones básicas de la Ingeniería Genética: sobre-expresar un gen fuera de su contexto habitual, en un tipo celular donde antes no se expresaba, para que la planta adquiriera una propiedad deseable, o impedir la expresión de un gen en su contexto habitual, eliminando así una propiedad

no deseable de la planta. Así por ejemplo, podremos hacer que las hojas de una planta resistan a una enfermedad a la que antes era sensible o eliminar un alérgeno de un tejido que vaya a servir como alimento.

7

Dentro del marco anteriormente esbozado, hemos dedicado buena parte de nuestro esfuerzo como investigadores al estudio de la regulación transcripcional de procesos de interés agronómico, así como al de los factores de transcripción involucrados, últimamente desde una perspectiva Genómica.

Empezaré por referirme a nuestro trabajo sobre la regulación de la síntesis de proteínas de reserva en el endospermo de la semilla de cereales. Este tejido es el principal producto agrícola, ya que representa el componente mayoritario de las principales cosechas mundiales: los granos del trigo, de arroz y de maíz. Dicho tejido es, de forma directa o indirecta, nuestra principal fuente de proteína alimentaria, de aquí la importancia de conocer sus procesos de control.

La calidad proteica de los granos de cereales viene determinada por la cantidad y composición de sus proteínas de reserva, las prolaminas (en cebada, hordeínas; en trigo, gliadinas; en maíz, zeínas; etc.). Éstas están codificadas por genes que se expresan específicamente durante el desarrollo del endospermo siguiendo un patrón espacio-temporal bien establecido. La clave de esta especificidad radica, como acabamos de mencionar, en una serie de motivos en *cis* en los promotores de estos genes que son reconocidos por factores transcripcionales que actúan en *trans*. Nuestras aportaciones al esclarecimiento de esta regulación tienen que ver tanto con los promotores como con los factores de transcripción implicados en la regulación del proceso¹⁴⁻¹⁹.

La mayoría de los promotores génicos de prolaminas contienen un motivo bipartito, situado 300 pares de bases delante del inicio de la región codificante. Dicho motivo es reconocido en una etapa temprana del desarrollo del endospermo (aproximadamente, diez días después de la polinización) por factores transcripcionales específicos para cada una de las mitades del motivo: i) 5'-TGTAAG-3' (semi-caja PB o *Prolamin Box*); ii) 5'-GTGAGTCAT-3' (semi-caja GLM o *GCN4-Like-Motif*),

El factor transcripcional BPBF de cebada es de los llamados 'dedos de zinc' de la clase DOF (*DNA-binding-One-Finger*) y reconoce la semi-caja PB, uniéndose a ella^{16,18,19}. Este 'dedo de zinc' es un tramo de proteína que se caracteriza por tener dos pares de cisteínas capaces de quelar un átomo de zinc, seguido de una serie de aminoácidos básicos. Los factores transcripcionales BLZ1 y BLZ2, que reconocen la semi-caja GLM, pertenecen a la clase bZIP (*basic-ZIPPER*), caracterizada por tener una región de aminoácidos básicos que interacciona con el ADN, seguido de una hélice rica en leucinas que interacciona con otras proteínas de la misma clase, formando homo o hetero-dímeros^{15,17,18}.

Además del motivo bipartito y las proteínas que interaccionan con él que acabamos de describir, hemos identificado más recientemente el factor transcripcional que interacciona con otro motivo que se encuentra presente en todos los promotores conocidos de genes específicos de endospermo. Se trata de la secuencia 5'-AACCA/TAAC-3' y del factor transcripcional correspondiente, que se denomina GAMYB, un miembro de la clase MYB. Es de señalar que si, por un lado, el factor GAMYB reconoce su caja específica en el promotor, por otro, reconoce y tiene afinidad por los factores BPBF y BLZ2. Dado que el motivo bipartito y la caja de GAMYB están relativamente separadas entre sí a lo largo del promotor, la interacción entre los respectivos factores transcripcionales implica una curvatura del promotor, forzada por dicha interacción¹⁹.

El conocimiento de los aspectos informáticos de la acumulación de proteínas en las semillas no sólo es clave para optimizar la producción de dicho macronutriente para la especie humana sino que abre la vía para utilizar ese tejido de reserva que es el endospermo como 'reactor' para la producción de proteínas de interés industrial o farmacológico.

8

El mecanismo que acabamos de considerar implica la combinación de al menos tres clases de factores transcripcionales en el reconocimiento del fragmento de ADN a transcribir por parte de la maquinaria competente para ello. En ese caso, la interacción de los factores entre sí y con el promotor resulta en una señal positiva, pero un mismo factor puede formar parte tanto de una señal positiva como de una negativa: el signo de su efecto depende del

contexto combinatorio con otros factores. Ilustraré esta idea refiriéndome a un proceso de gran interés agronómico, cual es el de la germinación de las semillas.

Una de las alteraciones genéticas esenciales para el invento de la planta cultivada tuvo como fin eliminar la asincronía del proceso de germinación característica de la especie silvestre. El significado adaptativo de dicha asincronía es el de aumentar las probabilidades de supervivencia en vida libre de la estirpe. Por el contrario, el uso agronómico de la planta requiere que la germinación sea lo más sincrónica posible.

Al final del desarrollo de la semilla, ésta inicia un período de latencia (dormancia) durante el cual se prepara para soportar la pérdida de agua. En este estado de deshidratación la semilla puede sobrevivir durante años, antes de reiniciar su actividad metabólica y crecimiento, durante la etapa de germinación. En esta nueva etapa, una vez que la semilla absorbe agua, el embrión sintetiza giberelinas (un tipo de hormona vegetal) que se difunden hacia las células externas del endospermo (capa de aleurona) donde disparan una cadena de transducción de señales que acaba induciendo la expresión de genes que codifican enzimas encargados de hidrolizar las sustancias de reserva (proteínas y almidón) acumuladas en el endospermo durante el desarrollo de la semilla. Los productos de dicha hidrólisis constituyen el sustrato nutritivo del embrión. En las células de la capa de aleurona se induce la expresión específica de genes que codifican proteasas, α -amilasas y otras enzimas. De nuevo, esto implica la interacción de secuencias específicas en *cis* en los promotores de los genes correspondientes con factores transcripcionales en *trans*.

En los promotores de genes que responden a giberelinas en las células de aleurona se ha identificado un elemento tripartito, GARC (*GA-Responsive-Complex*), compuesto por tres cajas que son esenciales para la plena respuesta a dichas hormonas: i) 5'-TAACAAA-3'; ii) 5'-TATCCAC-3'; iii) 5'-CCTTTT-3'.

A la última de estas tres cajas, denominada la 'caja de pirimidinas', se unen los factores transcripcionales de la clase DOF: BPBF (ya mencionado) y SAD (*Scutellum-Aleurone-Dof*)^{20,21}. El primero de estos factores se induce por giberelinas y se reprime por la hormona denominada *ácido abscísico*,

mientras que la expresión del segundo es insensible a dichas hormonas. En experimentos con capas de aleurona aisladas, hemos demostrado que el factor SAD actúa como activador de la transcripción y que el factor BPBF revierte la activación de la transcripción mediada por la giberelina, un efecto de signo contrario al ejercido por este factor en la regulación de los genes de prolaminas durante el desarrollo del endospermo.

Hemos dicho que la Ingeniería Genética Vegetal se centra en expresar unos genes fuera de su contexto habitual y en evitar que otros se expresen en su contexto habitual, en activar y en inhibir genes involucrados en procesos de interés. Ahora podemos añadir que la clave de estas operaciones está en descifrar los arcanos secretos de la informática génica, de los promotores y de los factores de transcripción. Más allá de la investigación de mecanismos reguladores aislados, como en los ejemplos de mi propia investigación a que acabo de referirme, los recientes avances de la genómica vegetal han abierto la puerta a la investigación de todo el dédalo informático de una planta. A ello me referiré a continuación, resumiendo para ustedes algunos de nuestros proyectos más recientes. Como veremos, la forma de abordarlos implica un cambio radical de metodología y, sobre todo, de la forma de organizar el trabajo.

9

A la secuenciación del genoma humano han acompañado casi simultáneamente la de tres genomas vegetales: el de *Arabidopsis thaliana* –la planta modelo por excelencia– y los de las dos subespecies de arroz (*Oryza sativa*), subespecies *indica* y *japonica*, respectivamente. La Ingeniería Genética Vegetal está adquiriendo así unas bases más sólidas. Estos avances han supuesto un radical cambio de paradigma en el modo de conducir la investigación en esta especialidad y han dado paso a una nueva etapa en la que no sólo los modos sino los protagonistas han cambiado de forma sustancial. De equipos humanos que típicamente rondaban la decena de investigadores se ha pasado a consorcios de cientos de ellos, de una disciplina protagonizada en exclusiva por los biólogos moleculares a una que requiere el concurso de un buen número de informáticos especializados y del apoyo de la robótica, la nanotecnología o la electrónica, y de unos proyectos de investigación en la escala de los miles de euros a otros que se mueven en la de las decenas de millones de euros. Desde el punto de vis-

ta intelectual, se ha pasado de una investigación guiada por la formulación de hipótesis y su sometimiento al rigor de la prueba a una actividad centrada en grandes 'plataformas de investigación' que generan cantidades ingentes de datos. Luego éstos son ordenados y analizados para servir de base a las construcciones teóricas correspondientes: 'minería de datos' se ha llamado a este nuevo 'deporte'.

Nos gusten o no, no hemos podido dejar de acatar las nuevas reglas del juego y de integrarnos en la nueva cultura. Es en este contexto en el que hay que situar nuestra participación en el Proyecto REGIA (*Regulatory Gene Initiative in Arabidopsis*), financiado por la Unión Europea con una ayuda cercana a los diez millones de euros.

Una treintena de grupos de nueve países forman parte del consorcio, en el que España está representada por tres equipos y cuya coordinación científica corresponde al Doctor Ingeniero Agrónomo español Javier Paz-Ares.

El objetivo del Proyecto REGIA es la caracterización funcional de alrededor de 1.200 genes que codifican factores transcripcionales en la planta *Arabidopsis thaliana*, en torno al 80% de los genes de este tipo en dicha especie, en la que un 5% de los 30.000 genes que integran su genoma está representado por los genes que codifican los factores involucrados en la regulación de la transcripción. Se trata del mayor proyecto europeo de la etapa postgenómica de la Ingeniería Genética Vegetal, ya que su objetivo va más allá de la mera lectura del texto genético, al tratar de analizar funciones, y debe abrir la vía hacia una explotación biotecnológica sistemática. Los mencionados factores transcripcionales se agrupan en una decena de familias en las que los grupos de investigación implicados han conseguido avances estratégicos. El establecimiento de las jerarquías reguladoras y el esclarecimiento de las redundancias génicas, la evolución y las interdependencias funcionales de los mencionados factores deben desvelar la lógica organizativa y funcional de la especie y facilitar la manipulación genética de las especies de interés agronómico con fines prácticos. El interés de un ataque integrado como el que se ha adoptado en este proyecto estriba en la posibilidad de abordar con éxito la compleja combinatoria que preside la acción de este tipo de genes.

Nuestra contribución al Proyecto Regia se ha centrado en el ámbito de tres de las mencionadas familias de factores de transcripción, las respectivamente denominadas DOF, bZIP y RF (*Ring Fingers*). En definitiva, unos cincuenta genes reguladores. El trabajo supone inicialmente la obtención de tramos específicos de cada gen con los que se generan micromatrices de ADN (*DNA microchips*). Éstas permiten el análisis de los patrones de expresión de los genes representados en distintas situaciones: distintos tejidos, estados de desarrollo, respuestas a infecciones, a plagas, a temperaturas extremas, a sequía, a suelos salinos o ácidos, y a cualquier otra interacción de la planta con su medio. Otro aspecto crucial de la investigación está representado por el análisis genético en reverso de mutantes dirigidos de genes que codifican factores transcripcionales, con el fin de intentar colegir sus respectivos papeles en el engranaje regulador de la planta. También con el mismo fin, se ha abordado la sobre-expresión sistemática de todos estos genes. Como ya hemos señalado, las interacciones proteína-proteína entre distintos factores de transcripción desempeñan un papel esencial en su interacción funcional con los promotores de los genes que regulan. De aquí que un aspecto importante de nuestro trabajo haya consistido en investigar sistemáticamente dichas interacciones mediante un método de prospección iterativa de combinaciones binarias de factores. Entre los procesos que hemos analizado con mayor atención figuran naturalmente el desarrollo y germinación de las semillas y la respuesta a microorganismos patógenos de la especie objeto de estudio. Este proyecto está ahora en la fase final de análisis de sus resultados.

10

La Ingeniería Genética Vegetal no está abocada a reemplazar el rico repertorio tecnológico representado por la mejora vegetal tradicional sino a sumarse a ella, facilitando la consecución de objetivos que son de difícil o imposible abordaje por los métodos convencionales. Además permite plantear aplicaciones que nunca se habían considerado como posibles para las plantas. Por otra parte, los retos actuales de la producción de alimentos son de tal magnitud que van a requerir no sólo de los avances a los que vengo haciendo referencia, sino también de los de todas las disciplinas que inciden sobre la práctica agronómica. Y hay que señalar que, en contra de creencias por desgracia bastante generalizadas, no se van a re-

solver los problemas del futuro volviendo a tecnologías del pasado sino que se habrá de apelar a todo el saber acumulado y de acopiar nuevas sabidurías. Dentro de un moderado optimismo, estoy entre los que piensan que disponiendo de más conocimientos vamos a cometer menos errores y a resolver un mayor número de problemas, y no al contrario. Permítanme, para terminar, que precise algo más estas ideas.

Hace ya más de dos siglos, en 1798, el reverendo Thomas Robert Malthus publicó, primero como folleto anónimo y luego como libro bajo su nombre, su famoso ensayo sobre la *Ley de la población y sus efectos sobre el perfeccionamiento futuro de la sociedad*, texto en el que por primera vez se aborda el conflicto entre el crecimiento de la población y el de la producción de alimentos. En un alegato contra las utopías de Godwin y Condorcet, Malthus postula en esencia que frente a un condicionamiento sexual que mueve a la población a crecer según una progresión geométrica se contraponen el freno del más reducido crecimiento de los alimentos disponibles, que ocurre según una progresión aritmética. Es notorio que, en los dos siglos siguientes a su expresión, los vaticinios de Malthus no se han cumplido ni en lo que se refiere a la población, que ha crecido más deprisa de lo previsto, ni en lo que atañe a las subsistencias, que han crecido con una tasa mayor que la población. Estas circunstancias no restan al reverendo el mérito singular de haber sido el primero en plantear el crucial problema en términos modernos.

En lo que se refiere a la producción de alimentos, la derrota de la predicción maltusiana ha dependido de dos factores fundamentales: el aumento de la superficie cultivada y el aumento de los rendimientos por unidad de superficie. El primero de estos factores, el aumento de la superficie de suelo laborable, ha sido el principal responsable del éxito en el incremento de la producción de alimentos hasta mediados del siglo xx, momento en que ha tenido que perder protagonismo porque para entonces ya se había cooptado la mayor parte de los suelos óptimos y se habían roturado grandes extensiones de terreno que nunca debieron tener un uso agrícola. En la actualidad la creación de nuevo suelo laborable logra difícilmente compensar el que se pierde por la erosión, la desertización o la invasión por los usos urbanos y las infraestructuras de transporte. Como por otra parte la población no ha dejado de crecer, las disponibilidades de suelo laborable por persona disminuyen vertigi-

nosamente. De aquí que el primer gran reto de la agricultura –desde mediados del siglo xx y para las décadas venideras– es el de aumentar los rendimientos por hectárea.

Con el mismo grado de relevancia que el reto anterior está el de hacer la práctica agrícola más compatible con el medio ambiente. Dicha actividad ha sido agresiva con el medio natural desde que se inventó hace diez milenios. De hecho, ha sido tanto más contraria al medio ambiente cuanto más primitiva, dado que el impacto ambiental debe contabilizarse en referencia a la tonelada de alimento producida y no a la hectárea, siendo el mayor efecto adverso al ambiente el de la extensión de este bien limitado que resulta en cada caso necesaria para producirla. Las variedades modernas de las principales cosechas requieren con frecuencia menos superficie, menos energía y menos productos químicos por tonelada producida que las de hace cuarenta años. Sin embargo, la producción de alimentos ha debido más que duplicarse en ese período para atender al crecimiento de la población, ahogando así los avances conseguidos y aumentando el impacto ambiental global de la actividad agrícola. Por esta razón, producir más limpio constituye el segundo gran reto actual del sistema de producción de alimentos.

La Ingeniería Genética Vegetal es una poderosa herramienta de la que disponemos para ayudar a dar respuesta a estos retos, una respuesta que naturalmente requiere también el concurso de prácticamente todo el abanico de las restantes tecnologías, que en ningún momento deben o pueden ser excluidas. Si nos ceñimos a la contribución presente y futura de esta ingeniería a la solución de los problemas planteados, podemos fácilmente establecer cuáles son las prioridades en función de los retos que acabamos de considerar. Entre las innovaciones que ya han alcanzado el mercado destacan aquellas que tienen relación con la posibilidad de producir más y producir más limpio. Las aplicaciones que tienen que ver con la obtención comercial de híbridos (producción de andro-esterilidad por Ingeniería Genética y su restauración), que permiten explotar el vigor híbrido o heterosis, y las plantas transgénicas tolerantes a herbicidas o resistentes a enfermedades y a plagas, representan respuestas eficaces a los dos grandes retos mencionados. Así por ejemplo, el maíz resistente al ‘taladro europeo’, un insecto que invade el interior de los tallos hasta la completa destrucción de la cosecha, responde a am-

bos retos: en cuanto que evita pérdidas, aumenta el rendimiento medio, y en la medida en que es resistente a una plaga, reduce la cantidad de productos agroquímicos vertidos al medio ambiente.

Una segunda categoría de objetivos es la de aquellos que responden a demandas específicas, menos generales que las anteriores. Éstos deben ser evaluados según los méritos individuales de cada caso. Así por ejemplo, el llamado 'arroz dorado', rico en pro-vitamina A, surge para intentar solucionar el problema de que unos tres millones de niños se queden ciegos cada año en el mundo por falta de ese micronutriente vitamínico. No cabe duda de que se trata de un objetivo prioritario y habrá que considerar en todo caso la eficacia de la solución propuesta. Éste es el caso, en general, con toda una serie de objetivos que la Ingeniería Genética Vegetal comparte con la mejora clásica, y que tienen que ver con la calidad nutritiva y tecnológica de los productos agrícolas, con su comportamiento durante el transporte y la conservación, y con muchas otras aplicaciones.

Una tercera categoría de aplicaciones abordables gracias a la Ingeniería Genética Vegetal tiene que ver con la expresión en plantas de genes procedentes de otros tipos de organismos en contextos distintos de los tradicionales. Se trata de hacer que las plantas fabriquen productos ajenos al mundo vegetal, ya sea con fines industriales o medioambientales. En el ámbito industrial, las plantas pueden convertirse en bio-reactores para la producción de sustancias de interés farmacológico (por ejemplo, hormonas, vacunas o anticuerpos) y de materiales de gran consumo potencial (por ejemplo, plásticos biodegradables, seda de araña o aceites industriales). En el ámbito medioambiental, puede señalarse la obtención de plantas transgénicas con capacidad de extraer y degradar contaminantes tóxicos, sean orgánicos o inorgánicos, y plantas transgénicas especialmente diseñadas para actuar como monitores específicos de contaminación. Conceptualmente, algunas de las innovaciones que tienen que ver con la descontaminación de metales serían adaptables a su extracción. Así por ejemplo, se han hecho experimentos muy preliminares para la bio-minería del oro.

En la actualidad, se están cultivando unos sesenta millones de hectáreas de plantas transgénicas de primera generación. La superficie sembrada se distribuye por más de una docena de países, entre los que no sólo se encuentran países desarrollados, tales como Estados Unidos o Canadá, sino de modo

creciente, países como Argentina, Brasil, China o India, que tradicionalmente han desarrollado una importante actividad agrícola y que representan una parte sustancial de la población mundial. La mayor parte de esa enorme superficie sembrada corresponde a la soja resistente a herbicidas, al maíz resistente al taladro y al algodón resistente a insectos. Hay además docenas de aplicaciones ya aprobadas para su distribución y muchas más en fase de ensayo. Por otra parte, se han activado unos mecanismos de seguridad para el control y seguimiento de las plantas transgénicas que no tienen precedentes en la historia de la innovación científica y técnica.

Para dar fin a estas reflexiones, permítanme concluir expresando mi convencimiento de que la joven Ingeniería Genética Vegetal ha alcanzado ya una precoz madurez y está aquí para quedarse. Querría también agradecer a mis colaboradores de todos estos años, en especial a los profesores titulares Isabel Díaz y Jesús Vicente-Carbajosa, sin olvidar a los doctores y estudiantes de doctorado de mi grupo quienes han aportado inspiración, nuevos métodos y duro trabajo, y han contribuido decisivamente a que yo haya sido elegida miembro de esta Academia de Ingeniería.

He dicho.

REFERENCIAS

1. Heun, M., Schaefer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F. (1997) "Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA finger printing". *Science* 278, 1312-1314.
2. Rodríguez-Loperena, M.A., Aragoncillo, C., Torres, J.V., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1975) "Biochemical evidence of chromosome homoeology among related plant genera". *Plant Sci. Lett* 5, 387-393.
3. Aragoncillo, C., Rodríguez-Loperena, M.A., Salcedo, G., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1978) "Influence of homoeologous chromosomes on gene-dosage effects in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum*, L.)". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1446-1450.
4. Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1969) "Purothionins in *Aegilops-Triticum* spp". *Experientia* 25, 1110.
5. Fernández de Caleyá, R., González-Pascual, B., García-Olmedo, F., Carbonero, P. (1972) "Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro". *Appl. Microbiol.* 23, 998-1000.
6. Fernández de Caleyá, R., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1976) "Gene expression in allopolyploids: Genetic control of lipopurothionins in wheat". *Genetics* 83, 687-699.
7. Carmona, M.J., Molina, A., Fernández, J.A., López-Fando, J.J., García-Olmedo, F. (1993) "Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens". *Plant J.* 3, 457-462.
8. Keller, E.F. (1983) *A feeling for the organism. The life and work of Barbara McClintock*. W.H. Freeman & Co.
9. Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansen, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., Leemans, J. (1987) "Transgenic plants protected from insect attack". *Nature* 328, 33-37.
10. Altpeter, F., Díaz, I., McAuslane, H., Gaddour, K., Carbonero, P., Vasil, I.K. (1999) "Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe". *Mol. Breed.* 5, 53-63.
11. Carbonero, P., Díaz, I., Vicente-Carbajosa, J., Alfonso-Rubí, J., Gaddour, K., Lara, P. (1999) "Cereal α -amylase/trypsin inhibitors and transgenic insect resistance". En: *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance* (G.T. Scarascia-Mugnozza & M.A. Pagnotta, eds.) pp 147-158. Kluwer Academic Publishers.

12. Alfonso-Rubí, J., Ortego, F., Castañera, P., Carbonero, P., Díaz, I. (2003) "Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in *indica* and *japonica* rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*". *Transgenic Res.* 12, 23-31.
13. Gaddour, K., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Isabel-Lamonedá, I., Díaz, I., Carbonero, P. (2001) "A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli". *Plant Mol. Biol.* 45, 599-608.
14. Royo, J., Díaz, I., Rodríguez-Palenzuela, P., Carbonero P. (1996) "Isolation and promoter characterization of barley gene *ltr1* encoding trypsin inhibitor BTI-CMe: differential activity in wild-type and mutant *lys3a* endosperm". *Plant Mol. Biol.* 31, 1051-1059.
15. Vicente-Carbajosa, J., Oñate, L., Lara, P., Díaz, I., Carbonero P. (1998) "Barley BLZ1: a bZIP transcriptional activator that interacts with endosperm-specific gene promoters". *Plant J.* 13, 629-640.
16. Mena, M., Vicente-Carbajosa, J., Schmidt, R.J., Carbonero P. (1998) "An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm". *Plant J.* 16, 53-62.
17. Oñate, L., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Díaz, I., Carbonero P. (1999) "Barley BLZ2: a seed specific bZIP protein that interacts with BLZ1 *in vivo* and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm". *J. Biol. Chem.* 274, 9175-9182.
18. Carbonero, P., Vicente-Carbajosa, J., Mena, M., Oñate, L., Lara, P., Díaz, I. (2000) "bZIP and DOF transcription factors in the regulation of gene expression in barley endosperm". En: *Seed Biology: Advances and Applications* (M. Black, K.J. Bradford & J. Vazquez-Ramos, eds.) pp 27-41. CAB International.
19. Díaz, I., Vicente-Carbajosa, J., Abraham, Z., Martínez, M., Isabel-Lamonedá, I., Carbonero P. (2002) "The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development". *Plant J.* 29, 401-412.
20. Mena, M., Cejudo, F.-J., Isabel-La-Monedá, I., Carbonero P. (2002) "A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone". *Plant Physiol.* 130, 111-119.
21. Isabel-LaMoneda, I., Díaz, I., Martínez, M., Mena, M., Carbonero, P. (2003) "SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like thiol protease gene in the aleurone of germinating seeds". *Plant J.* 33, 329-340.

CONTESTACIÓN

EXCMO. SR. D. ENRIQUE CERDÁ OLMEDO

Excmo. Sr. Presidente,
Excelentísimos Señoras y Señores,
Señoras y Señores, queridos amigos:

Ante todo quiero agradecer a la nueva académica que me haya elegido para contestar a su discurso. También quiero dar la enhorabuena a la Academia por el ingreso de la profesora Pilar Carbonero Zalduegui. Ella sigue siendo hoy, como era ayer, una personalidad excepcional, resultado de la calidad de su genoma y de los cuidados recibidos, pero sobre todo de su propio esfuerzo. La Academia se enriquece al poder contar con sus servicios y a través de ellos quedará modificada ventajosa e irreversiblemente, como fueron modificadas las otras instituciones por las que pasó.

No es momento de presentar a Pilar a los académicos, que ya han tenido que ponderar sus méritos para votarla, ni a sus amigos y colegas, que vinieron a escucharla porque la conocen. Ella misma ha integrado en su discurso un resumen de algunos aspectos notables de su actividad científica con una claridad y una precisión que yo no sabría darles. Prescindiré de una enumeración exhaustiva de sus experiencias y de sus obras, pero no quiero dejar de registrar una visión personal, posiblemente sesgada.

Coincidió con Pilar en la Escuela de Agrónomos de Madrid, pero no éramos compañeros de curso. Causaba una impresión excelente, incluso en el trato casual, y pronto me llegó la fama de su brillantez intelectual y de sus resultados académicos. Teníamos en común el interés por la investigación y ambos consultamos al profesor Santa María, con el que Pilar hizo su tesis doctoral en Microbiología. A mí me recomendó que entrara a trabajar en una empresa, ya que sólo así investigaría problemas válidos, tomados directamente de la realidad. Yo no le hice caso, pero debería arrepentirme, porque otro compañero, Jaime Conde, que siguió su consejo, ha combinado éxitos notables en la investigación, incluso muy básica, con una carrera empresarial hasta Director General de La Cruz del Campo cuando era independiente y el mayor grupo cervecero de España.

Después de trabajar en la Universidad de Minnesota sobre toxinas producidas por estafilococos en la leche, con una beca de la Fundación March, Pilar volvió a España y entró en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, en unos edificios tan maravillosos que despertaron la con-

cupiscencia de los políticos y ahora alojan a la Presidencia del Gobierno. Yo también había solicitado entrar allí, pero tuve la suerte de que no me contestaran. Pronto pasó a la vecina Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, donde ha seguido una carrera muy brillante que la llevó a la cátedra de Bioquímica y Biología Molecular que sigue ocupando.

La labor de Pilar se ha concentrado en la docencia en su Escuela, en la dirección de tesis doctorales, catorce por ahora, y en la investigación, aunque no ha rehusado labores de dirección, como la del heterogéneo Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Madrid, y de organización, como la fundación de la División que se ocupa de las plantas en el Centro Nacional de Biotecnología. Es una de las pocas personas a las que se debe atribuir el excelente nivel de la Ingeniería Genética Vegetal en España.

Sus resultados científicos, descritos en detalle en ochenta monografías primarias, en patentes y en una veintena de capítulos de libros y revisiones, han influido mucho en investigadores de otros países y han sido reconocidos con el ingreso, por elección competitiva, en la Organización Europea de Biología Molecular, la Vicepresidencia de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, la participación en varias comisiones internacionales muy influyentes y varios premios.

La ciencia actual es obra de grupos de investigación bien compenetrados y Pilar ha tenido docenas de colaboradores muy brillantes, pero personificaré los trabajos en ella, como se hace con muchos grandes maestros de la pintura, como Rembrandt o Rubens. Los temas de trabajo y la forma de abordarlos han ido cambiando con el tiempo, aunque siempre hayan versado sobre los granos de los cereales. La formación microbiológica de Pilar reverbera en sus investigaciones sobre la acción antimicrobiana de componentes del grano, que abrieron el camino al descubrimiento de su acción frente a insectos. Se entendió así una de las funciones biológica de algunas proteínas de los cereales, que naturalmente no es la de alimentar a la humanidad hambrienta, aunque para eso sirvan. Algunos de sus mejores trabajos se pueden encuadrar en la Enzimología, que entonces era un campo científico muy activo, y en muchos se nota una clara influencia de la Genética que practicaba mi maestro y nuestro compañero, el profesor Enrique Sánchez-Monge. En paralelo con la evolución global de la Biología y ayudada por el profesor Eladio Viñuela, fundador principal del Centro de Biología Molecular, Pilar adop-

tó las técnicas necesarias para el manejo del ADN y la transformación de plantas. Estas técnicas le han permitido abordar, con un grado de resolución antes impensable, el estudio de las proteínas inhibidoras de las que ya se venía ocupando y abrir nuevas perspectivas para hacer a las plantas y a sus productos más resistentes a los insectos. También las ha aplicado a problemas nuevos, como la regulación del funcionamiento de los genes durante la formación del grano y su germinación.

Los méritos de Pilar deberían ser ampliados por un coeficiente corrector, no como víctima de discriminación por su sexo, sino porque ha dedicado a su familia mucho más tiempo y esfuerzo que la mayoría de las personas y que la gran mayoría de los varones. Pero no necesita esa corrección para destacar en el mundo de la Ciencia y de la Tecnología.

Pilar es la primera mujer que ingresa en la Academia. No nos apresuremos a celebrar el fin de una discriminación, porque no la ha habido. Entre los técnicos de nivel superior con edades representadas en la Academia la frecuencia de mujeres no llega al dos por ciento. La composición de la Academia no representa, ni ayer ni hoy, una desviación estadística significativa a este respecto y no permite hablar de discriminación. Estoy seguro de que la Academia admitirá pronto a bastantes más mujeres, como consecuencia del cambio rapidísimo que se está dando en todos los ambientes de nuestra sociedad.

Espero que el ingreso de Pilar no trastorne a la Academia, convirtiéndola en corral de comedias especializado en mojigangas. Eso me parecería si leyera, por ejemplo, "se recuerda a todos y a Pilar", o "académicos y académica", o "académicos/a", u otras expresiones por el estilo, propias de quienes confunden el género gramatical y el sexo aparente. Y digo aparente porque a mí, por fortuna, no me consta el sexo real de mis compañeros. Imagino los problemas que pueden tener los que deseen introducir las nuevas modas políticamente correctas en África Central. El kivunju, un idioma de Tanzania, tiene dieciséis géneros distintos, y he oído que otros idiomas bantúes pasan de cincuenta. Algunos dirán que ni siquiera los bantúes tienen diversidad genérica suficiente para reflejar, si quisieran, todas las actitudes sexuales que se encuentran en cualquier grupo humano no demasiado pequeño. Como en usos gramaticales y sociales no hay unanimidad, no me extrañaría que algunos de mis colegas disientan de mi opinión, pero encuentren risible liberalizar la vestimenta para los actos so-

lemnes, dejando elegir a todos los académicos entre el chaqué y un atuendo al estilo de Pilar.

Espero que la Academia siga siendo un solo conjunto de seres humanos y no la suma, o incluso la oposición, de dos conjuntos. Estoy seguro de que en una sociedad algo más avanzada que la nuestra ningún formulario preguntará el sexo, de la misma manera que ya no se pregunta por el color de la piel, la hidalguía o la limpieza de sangre, ni está bien visto fijarse en ellos. Mientras tanto, siglos de literatura incendiaria pesan sobre nosotros, acumulando negros presagios sobre un acto como el de hoy. Para desacreditar a muchos libros famosos, incluso los presuntamente revelados por los dioses, bastaría exponer sus opiniones sobre las mujeres. Claro que hay formas más directas de dejar en mal lugar a los autores de divinas palabras. Por ejemplo, hacer ver que los israelíes tratan muy compasivamente a los palestinos y los USamericanos a los árabes, en comparación con el trato que dio Moisés a los madianitas cuyas tierras quería usurpar. De eso vendrá el nombre de Conservadurismo Compasivo.

La historia no carece, desde luego, de contraejemplos honrosos. Me limitaré a citar a Ludovico Ariosto (*Orlando Furioso*, canto 20, octava 2):

*Le donne son venute in eccellenza
di ciascun'arte ove hanno posto cura;
e qualunque all'istorie abbia avvertenza,
ne sente ancor la fama non oscura.
Se'l mondo n'è gran tempo stato senza,
non però sempre il mal influo dura;
e forse ascosi han lor debiti onori
l'invidia o il non saper degli scrittori.*

y a pretender traducirlo así:

Las mujeres mostraron excelencia
en las artes, el saber y la cordura
y quien sabe del pasado bien la ciencia
admite que su fama no es oscura.
Si el mundo no lo tiene en su consciencia,
no siempre durará tal desventura,
que les negaron férvidos honores
por envidia o ignorancia los autores.

Los conocimientos científicos no pueden competir en volumen ni en emoción con la masa de la literatura más o menos fantástica sobre las diferencias entre los sexos. El varón se diferencia de la mujer en que posee un cromosoma pequeño llamado Y. El elemento crítico de este cromosoma es un solo gen, llamado *SRY*, un texto de 612 nucleótidos que determina la estructura de una proteína de 204 aminoácidos. Se trata de una proteína reguladora que penetra en el núcleo de las células, se une al ADN y lo dobla, en forma parecida a la que ha descrito Pilar en su discurso. Podría decirse que la mujer es el ser humano que se desarrolla por omisión, cuando falla *SRY*, y, en efecto, cuando este gen ha cambiado de manera que la proteína no entra en el núcleo, o no se une al ADN, o no lo dobla, se desarrolla una hembra. Basta para ello cambiar un solo nucleótido de los tres mil millones que componen nuestro genoma. Refuerza el papel de *SRY* el que otros cambios de un solo nucleótido de ese gen dan lugar a hermafroditas verdaderos y que se encuentren varones carentes de cromosoma Y, pero portadores del gen *SRY* desplazado a otro cromosoma. El cromosoma Y tiene otros genes, cuya pérdida da lugar a varones más o menos problemáticos.

El descubrimiento de *SRY* tiende a confirmar en sus prejuicios a quienes, como yo, consideran esencial la humanidad y accesorias la masculinidad y la feminidad. Si varones y hembras compartimos casi todos los genes, debemos compartir los resultados de su acción. Nos parece improbable la afirmación de que las mujeres disfrutan más que los hombres cuando hacen el amor, expresada en *Las metamorfosis* de Ovidio por Tiresias, que debía saberlo porque había sido sucesivamente hombre, mujer y de nuevo hombre, además de ciego y adivino. Tiresias apoyaba así la opinión de Júpiter contra la de su esposa Juno y posiblemente la de la mayoría de los hombres contra la de la mayoría de las mujeres. Lo mismo nos parecen muchas otras afirmaciones sobre diferencias innatas entre los sexos. Atribuimos las diferencias, cuando se demuestran, a la educación, a los papeles sociales o a los prejuicios, pero no a los genes.

Esta actitud biológica igualitaria es demasiado simple. Las diferencias morfológicas entre hombres y mujeres exceden con mucho las exigencias de la reproducción. Si las marcas olímpicas de las mujeres en muchos deportes no alcanzan a las de los hombres es por diferencias obvias en tamaño corporal y en fuerza. Muchas mujeres son más altas que yo, pero la estatura media de los hombres supera en unos diez centímetros a la de las mu-

jeros. Somos una especie dimórfica, aunque no tanto como muchos animales. El dimorfismo sexual de los animales suele correlacionar con una conducta polígama, que parece frecuente en nuestra especie, aunque intenten dificultarla trabas sociales y legales. En todo caso no resulta fácil entender que las presiones selectivas que crearon en el pasado nuestro dimorfismo sexual hayan afectado a actividades entonces inexistentes, como jugar al ajedrez, dirigir orquestas o hacer ganchillo. Los igualitaristas adoptaremos, al menos en principio, la hipótesis de que ambos sexos tenemos la misma capacidad innata para esas actividades.

El estado actual de las investigaciones científicas, una mera docena de años después del descubrimiento del gen *SRY*, nos sume en la duda y la confusión. La proteína de *SRY* está presente en las células mucho tiempo, desde el primer mes de vida intrauterina hasta la edad adulta, tiene una afinidad notable por el ADN, cualquiera que sea su secuencia de nucleótidos, y una afinidad muy alta por la secuencia AACAAATG, que se encuentra un centenar de miles de veces en nuestro genoma. Podría influir en la expresión de cualquier gen y sería muy difícil demostrar que no lo haga en algún momento y lugar. Al doblar el ADN, modifica su accesibilidad a otras proteínas que podrían regular la expresión de los genes. También podría unirse a otras proteínas reguladoras y modificar su acción. El material de estudio más fiable para abordar estos procesos está constituido por los casos naturales de cambio de sexo, hombres que carecen del gen *SRY* o mujeres que lo poseen. Las investigaciones experimentales con otros animales son más productivas, pero las conclusiones no siempre son extrapolables a nuestra especie: incluso de unos ratones a otros hay diferencias notables en el mecanismo de determinación del sexo.

Se han identificado varios genes responsables de proteínas que interactúan con la de *SRY* para decidir la formación de los testículos embrionarios, cuya testosterona y otros productos establecen los demás rasgos del sexo masculino e inhiben los del femenino que se desarrollaría en su ausencia. Las proteínas implicadas no son siempre específicas para estos procesos, sino pluriempleadas en otros. Establecen unas con otras y con el ADN relaciones complejas y cuantitativas de colaboración y antagonismo. No sorprende que los resultados disponibles no se dejen integrar en una teoría sencilla, ni siquiera limitándonos a las interacciones principales de unos pocos actores del proceso. La descripción exhaustiva parece imposible.

Llegamos así a una conclusión anticipada por muchos poetas: con el ingreso de Pilar, la Academia acoge en su seno el misterio de la feminidad.

La determinación del sexo humano ocurre en el ambiente muy protegido del útero; otros procesos biológicos, como los que han atraído la curiosidad investigadora de Pilar, están sometidos a cambios ambientales que modifican la acción de los genes. La vida aparece como el resultado de numerosas carambolas sucesivas de muchos productos génicos en condiciones cambiantes. Predecir un resultado biológico parece tan difícil como predecir el tiempo; es seguro apostar que no nevará en Sevilla este verano, pero imposible acertar cuál será el día más caluroso. En realidad, predecir el resultado de los procesos biológicos a largo plazo, incluso de años, no es tan difícil, porque los seres vivos han desarrollado durante su evolución mecanismos de ajuste que llamamos *homeostasis*, que compensan las desviaciones que vayan surgiendo. Se pueden predecir con aplomo muchos caracteres de la forma, la fisiología y la conducta de un ser vivo con el solo conocimiento de su especie. Los detalles finos no son ni comprensibles ni predecibles. Con cada miembro nuevo entra en la Academia el misterio de la diversidad biológica.

