



Reflexiones en torno a la ingeniería genética vegetal

Pilar Carbonero Xalduogui

La ingeniería genética vegetal, de reciente desarrollo, es una especialidad híbrida que integra dos tradiciones de innovación: la que desde Mendel entronca con el descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA 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. Desde joven, la autora aprendió cómo los conocimientos genéticos y microbiológicos podían ser relevantes en la cotidianidad de una planta de producción industrial. Ahora nos invita a compartir algunas reflexiones en torno a esta joven ingeniería y situar en su contexto algunas de sus contribuciones a la misma.

Nuestra civilización nació hace casi 10 milenios en las faldas de las montañas de Karacadag, en el sureste de Turquía, entre el Tigris y el Éufrates, cerca de la actual frontera con Siria, y lo hizo como resultado de la alteración dirigida del DNA del trigo diploide, *Triticum monococcum*. Otras grandes civilizaciones que respectivamente 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 la ladera exacta donde se produjo el hecho fundacional de la domesticación del trigo debido a las nuevas técnicas para analizar el DNA, 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 DNA 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 investigada.¹

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 DNA, que fueron extensas y empujaron sus oscuros códigos 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 10 milenios que lo que el ser humano consume dejó de ser natural, porque tanto los cambios iniciales como la mejora subsiguiente incapacitaron por

completo la especie cultivada para la vida libre en la naturaleza, que es el criterio determinante para considerar 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 una décima parte de la actual población mundial.

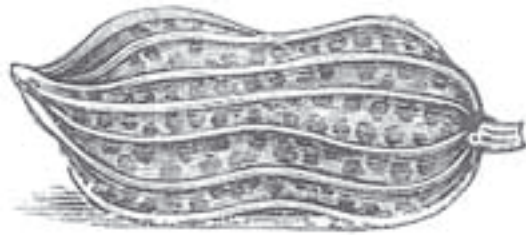
► Natural no es sinónimo de inocuo

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 de 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,

Este texto está basado en el discurso de ingreso de la autora como Académica electa de la Academia de Ingeniería de España.

riego—, al que propiamente podemos denominar ingeniería agrónoma. 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, 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 DNA 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 de un cambio.

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 140 años, el famoso monje empezó a sacarnos de nuestra ignorancia respecto a lo que veníamos haciendo. Mendel jugó sin saberlo con el DNA del guisante: liso/rugoso, alto/bajo, verde/amarillo... Mendel no llegó tampoco a saber que en realidad jugaba con alteraciones del DNA. Hoy, gracias a la ingeniería genética, conocemos las precisas alteraciones del DNA 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-

que tardaría aún dos décadas en empezar a producirse, y tres décadas en desembarcar 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 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 semienanos de Norman Borlaug —que fueron cruciales para derrotar la maldición malsusiana 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 DNA correspondientes y se comprobaron sus efectos *in planta*.

► Mapas genéticos y mecanismos de defensa

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 completamente 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 durante muchos años variantes genéticas de 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

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 DNA 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 DNA, 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 DNA correspondiente a esos genes saltarines.

El descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA, cuyo cincuentenario se celebró en 2004, dio cuerpo físico a ese ente de razón que había sido el gen hasta el momento. Y de propina sugirió de forma inmediata la naturaleza digital de la información genética y los posibles mecanismos de su transmisión y expresión. Puede decirse, tal vez exagerando un poco, que también sugería un camino hacia un desarrollo tecnológico

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 3Ag de la gramínea silvestre *Agropyron elongatum* al cromosoma 3B del trigo, conseguido por Sears, fue posible gracias a nuestros marcadores.²

El continuado apoyo del mencionado investigador 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

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 sobreexpresión transgénica de los genes que codifican para estos péptidos reducen los síntomas producidos por una cepa dada de patógeno,⁷ y lo mismo ocurre si se inutilizan los genes responsables de la defensa del patógeno frente a los péptidos.

«El endospermo de la semilla de cereales 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.»

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 DNA de trigo.

El segundo ejemplo es tal vez más relevante, aunque en su día no fuéramos plenamente conscientes de ello. Hace más de 30 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 trigo.⁴ De estas observaciones nos surgió la idea de que éstos podrían formar parte

► Las primeras plantas transgénicas

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 20 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 con los auspicios de EMBO, y después había pasado un año sabático 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 (VPPA). A continuación había pasado parte de un verano en un curioso curso experimental en el mítico laboratorio de Cold Spring Harbor. Con 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 de 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 McClintock,⁸ 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.

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 15 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 transformar.⁹ A partir de este momento aparecen numerosas patentes relativas a distin-

tas 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 sobreexpresión pudiera ser de interés práctico y se han obtenido las plantas transgénicas correspondientes.¹⁰⁻¹²

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 *Itr1* 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 anterioridad.¹²

Hemos caracterizado también otro gen de cebada (gen *Icy*), no perteneciente a la familia multigénica descrita anteriormente, que codifica un inhibidor de cisteín-proteasas.¹³ 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 dónde y cuándo 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.

► Comprender la regulación genética: las «piezas de información»

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.

La información genética, que reside en el ácido desoxirribonucleico o DNA, 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 RNA (RNA 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 analizaremos aquí. 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 RNA que se alarga vienen determinadas por la secuencia de bases (A, T, G, C) en la hebra de DNA 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. «Aguas arriba» 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 «cajas», cuya función consiste en actuar como 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 RNA mensajero a producir y el período concreto en que ha de ser producido. La clave está en el control de esta interacción, en el conocimiento de las cajas involucradas 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: sobreexpresar un gen fuera de su contexto habitual, en un tipo celular donde antes no se expresaba para que la planta adquiera 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.

«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.»

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 prin-

cipal 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 espaciotemporal bien establecido. La clave de esta especificidad radica 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 proceso.¹⁴⁻¹⁹

La mayoría de los promotores génicos de prolaminas contienen una «caja» bipartita, situada 300 pares de bases «aguas arriba» del inicio de la región codificante. Dicha caja es reconocida en una etapa temprana del desarrollo del endospermo (aproximadamente, 10 días después de la polinización) por factores transcripcio-

nales específicos para cada una de las mitades de la caja: *a*) 5'-TGTAAG-3' (semi-caja PB o Prolamin Box); *b*) 5'-GTGAGTCAT-3' (semi-caja GLM o GCN4-Like-Motif).

El factor transcripcional BPBF de cebada es de los llamados «dedos de cinc» de la clase DOF (DNA-binding-One-Finger) y reconoce la semicaja PB, uniéndose a ella.^{16,18,19} Este «dedo de cinc» es un tramo de proteína que se caracteriza por tener dos pares de cisteínas capaces de quelar un átomo de cinc, seguido de una serie de aminoácidos básicos. Los factores transcripcionales BLZ1 y BLZ2, que reconocen la semicaja GLM, pertenecen a la clase bZIP (basic-ZIPPER) caracterizada por

tener una región de aminoácidos básicos que interacciona con el DNA, seguido de una hélice rica en leucinas que interacciona con otras proteínas de la misma clase formando homo o heterodímeros.^{15,17,18}

Además de la caja bipartita y las proteínas que interaccionan con ella hemos identificado más recientemente el factor transcripcional que interacciona con una segunda caja que se encuentra presente en todos los promotores conocidos de genes específicos de endospermo. Se trata de la caja 5'-AACAA/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 la caja bipartita 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 interacción.¹⁹

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.

El mecanismo que acabamos de considerar implica la combinación de, al menos, tres clases de factores transcripcionales en el reconocimiento del tramo de DNA 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 con la germinación de las semillas.

► Germinación de 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 (GA, 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 otros 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: a) 5'-TAACAAA-3'; b) 5'-TATCCAC-3'; c) 5'-CCTTTT-3'.

A la última de estas tres cajas, denominada «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 hormona GA, 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 referidos de mi propia investigación, 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 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.

► Las nuevas reglas del juego

A la secuenciación del genoma humano han acompañado casi simultáneamente la de tres genomas vegetales: *Arabidopsis thaliana* —la planta modelo por excelencia— y los de las dos subespecies de arroz (*Oryza sativa*), como *indica* y *japonica*, respectivamente. La ingeniería genética vegetal está adquiriendo así unas bases más sólidas. Curiosamente, *Arabidopsis* tiene más del doble de genes que el ratón y se conoce la función de una mayor proporción de ellos en la planta que en el animal. 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 vista 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 10 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.

► Proyecto REGIA

El objetivo del Proyecto REGIA (Regulatory Gene Initiative in Arabidopsis) es la caracterización funcional de alrededor de 1200 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 posgenómica 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 agrónomo 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 50 genes reguladores. El trabajo supone inicialmente la obtención de tramos específicos de cada gen con los que se generan micromatrices de DNA (*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 sobreexpresión 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.

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 no se van a resolver 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.

► Los retos de la agricultura siguen siendo los mismos

Hace ya más de dos siglos, en 1798, el reverendo Thomas Robert Malthus publicó, primero como folleto anónimo y luego como libro con 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 pronunciamiento, 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

cirila. 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 40 años. Sin embargo, la producción de alimentos ha debido más que duplicarse en ese período para atender el crecimiento de la población, ahogando así los avances conseguidos y aumentando el impacto ambiental global de la actividad agrícola. Por

«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.»

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 vertiginosamente. 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 produ-

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 androesterilidad 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 ambos 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 provitamina 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. Este 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 biorreactores 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 biominería del oro.

En la actualidad, se están cultivando unos 60 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 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.

► Agradecimientos

Querría 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 haya sido elegida miembro de la Academia de Ingeniería de España.

► Bibliografía

- Heun M., Schaefer-Pregl R., Klawan D., Castagna R., Accerbi M., Borghi B., Salamini F.: «Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA finger printing», *Science* 1997; 278: 1312-1314.
- Rodríguez-Loperena M.A., Aragoncillo C., Torres J.V., Carbonero P., García-Olmedo F.: «Biochemical evidence of chromosome homoeology among related plant genera», *Plant Sci Lett* 1975; 5: 387-393.
- Aragoncillo C., Rodríguez-Loperena M.A., Salcedo G., Carbonero P., García-Olmedo F.: «Influence of homoeologous chromosomes on gene-dosage effects in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum*, L.)», *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 1446-1450.
- Carbonero P., García-Olmedo F.: «Purothionins in *Aegilops-Triticum* spp.», *Experientia* 1969; 25: 1110.
- Fernández de Caleyá R., González-Pascual B., García-Olmedo F., Carbonero P.: «Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro», *Appl Microbiol* 1972; 23: 998-1000.
- Fernández de Caleyá R., Hernández-Lucas C., Carbonero P., García-Olmedo F.: «Gene expresión in allopolyploids: Genetic control of lipopurothionins in wheat», *Genetics* 1976; 83: 687-699.
- Carmona M.J., Molina A., Fernández J.A., López-Fando J.J., García-Olmedo F.: «Expresión of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens», *Plant J* 1993; 3: 457-462.
- Keller E.F.: *A feeling for the organism. The life and work of Barbara McClintock*. W.H. Freeman & Co., 1983.
- Vaeckx M., Reynaerts A., Hofte H., Jansen S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M., Leemans J.: «Transgenic plant protected from insect attack», *Nature* 1987; 328: 33-37.
- Altpeter F., Díaz I., McAuslane H., Gaddour K., Carbonero P., Vasil I.K.: «Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CME», *Mol Breed* 1999; 5: 53-63.
- Carbonero P., Díaz I., Vicente-Carbajosa J., Alfonso-Rubí J., Gaddour K., Lara P.: «Cereal alpha-amylase/trypsin inhibitors and transgenic insect resistance», en: G.T. Scarascia-Mugnozza, M.A. Pagnotta, eds.: *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance*, Kluwer Academic Publishers, 1999: 147-158.
- Alfonso-Rubí J., Ortego F., Castañera P., Carbonero P., Díaz I.: «Transgenic expression of trypsin inhibitor CME from barley in indica and japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*», *Transgenic Res* 2003; 12: 23-31.
- Gaddour K., Vicente-Carbajosa J., Lara P., Isabel-Lamonedá I., Díaz I., Carbonero P.: «A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli», *Plant Mol Biol* 2001; 45: 599-608.
- Royo J., Díaz I., Rodríguez-Palenzuela P., Carbonero P.: «Isolation and promoter characterization of barley gene *Itr1* encoding trypsin inhibitor BTI-CME: differential activity in wild-type and mutant *lys3a* endosperm», *Plant Mol Biol* 1996; 31: 1051-1059.
- Vicente-Carbajosa J., Oñate L., Lara P., Díaz I., Carbonero P.: «Barley BLZ1: a bZIP transcriptional activator that interacts with endosperm-specific gene promoters», *Plant J* 1998; 13: 629-640.
- Mena M., Vicente-Carbajosa J., Schmidt R.J., Carbonero P.: «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* 1998; 16: 53-62.
- Oñate L., Vicente-Carbajosa J., Lara P., Díaz I., Carbonero P.: «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* 1999; 274: 9175-9182.
- Carbonero P., Vicente-Carbajosa J., Mena M., Oñate L., Lara P., Díaz I.: «bZIP and DOF transcription factors in the regulation of gene expression in barley endosperm», en: M. Black, K.J. Bradford, J. Vazquez-Ramos, eds.: *Seed Biology: Advances and Applications*, CAB International, 2000: 27-41.
- Díaz I., Vicente-Carbajosa J., Abraham Z., Martínez M., Isabel-Lamonedá I., Carbonero P.: «The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development», *Plant J* 2002; 29: 401-412.
- Mena M., Cejudo F.-J., Isabel-Lamonedá I., Carbonero P.: «A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberelin-responsive genes in barley aleurone», *Plant Physiol* 2002; 130: 111-119.
- Isabel-Lamonedá I., Díaz I., Martínez M., Mena M., Carbonero P.: «SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like tili protease gene in the aleurone of germinating seeds», *Plant J* 2003; 33: 329-340.