



Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas
y Naturales de Granada

**MICROORGANISMOS PARA LA AGRICULTURA
DEL FUTURO**

DISCURSO PARA EL ACTO DE SU RECEPCIÓN

COMO ACADÉMICA NUMERARIA POR LA

ILMA. SRA. DÑA. CARMEN LLUCH PLÁ

GRANADA, NOVIEMBRE 2015



Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas
y Naturales de Granada

**MICROORGANISMOS PARA LA AGRICULTURA
DEL FUTURO**

DISCURSO PARA EL ACTO DE SU RECEPCIÓN

COMO ACADÉMICA NUMERARIA POR LA

ILMA. SRA. DÑA. CARMEN LLUCH PLÁ

GRANADA, NOVIEMBRE 2015

MICROORGANISMOS PARA LA AGRICULTURA DEL FUTURO

CARMEN LLUCH PLÁ

**Excelentísimo Señor Presidente,
Excelentísimas e Ilustrísimas Señoras y Señores Académicos,
Excelentísimas Autoridades,
Amigos,
Señoras y Señores**

Ocupar hoy esta Tribuna es un hecho que previamente no había soñado, pero se ha realizado, por una serie de circunstancias de las que habéis sido artífices y responsables algunas personas presentes hoy aquí, siendo el primer artífice el Prof. Dr. Eduardo García Peregrín quien me sugirió y animó a emprender esta andadura, y por supuesto los artífices fundamentales los Señores Académicos que me eligieron, haciendo manifestación de una confianza en mí, para cuya satisfacción pondré todo mi empeño en no defraudarles, por su generosa acogida y por el honor que me hacen con su elección.

Soy consciente de la responsabilidad que conlleva este acto y la posterior pertenencia a esta ilustre Academia, por lo que me siento comprometida, con interés y disponibilidad de contribuir a su enaltecimiento y cumplir con sus objetivos.

Quisiera ampliar y concretar mi gratitud haciendo mención explícita de las personas que más directamente han tenido que ver con que hoy, yo reciba tan inmerecido reconocimiento. Lo haré en orden cronológico citando en primer lugar a mis padres, que siempre desearon y lo lograron que sus hijas tuvieran algo más que el aprendizaje que ellos tuvieron, en un medio rural, limitado a la escritura, lectura y las cuatros reglas, algo así como una cultura general, todas lo conseguimos gracias a transmitirnos de forma persistente y constante, además de su amor, la responsabilidad en el trabajo, a ser eficientes, a compartir y algo especial que el aprendizaje es continuo, diario, no termina nunca.

Agradezco a mis maestros, esenciales e imprescindibles en mi formación, el primero, por orden de entrada en mi vida, al Prof. D. Vicente Callao Fabregat, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia, valenciano como yo, que me brindó la posibilidad de conocer la Estación Experimental del Zaidín perteneciente al CSIC, y algo para mi crucial e importante, me dio la oportunidad de conocer al Dr. D. José Olivares Pascual.

El Dr. Olivares Pascual, (D. José durante casi tres décadas) en ese momento era Investigador del CSIC y actualmente Profesor de Investigación “*Ad Honorem*”, y digno miembro de esta Academia. El Profesor Olivares fue Director de la Tesina que cumplimenté al final de mi Licenciatura en Farmacia. Asimismo, fue Director de mi Tesis Doctoral, que realicé como becaria FPI en la EEZ sobre Microbiología del Suelo y al finalizarla, emprendí mi etapa docente en el Departamento Interfacultativo de Fisiología Vegetal. No obstante, me he sentido y me sentiré siempre

vinculada e inmensamente agradecida, no solo a la EEZ, sino al Profesor Olivares, puesto que he compartido con su familia, personal y científica, una gran parte de mi vida. Lo considero un maestro, un excelente y magnífico maestro, que ha creado una escuela de prestigio reconocido, es un investigador altamente estimado y valorado en su campo de investigación, un auténtico forrofo de biblioteca que está al día de todo lo que se publica, desde que lo conozco, con una reputación internacional difícilmente superable, escritor empedernido, te sorprende su página web, sus frecuentes escritos en diferentes periódicos locales y nacionales algo incompatible con la humildad que siempre nos trasmite. Agradecer su participación y contribución clave, en mi devenir profesional y por el honor que me hace su contestación como padrino.

Quiero recordar al Dr. Luis Recalde Martínez que me acogió en el Departamento de Fisiología Vegetal como docente al finalizar mi tesis doctoral y me permitió iniciar, fomentar y desarrollar mi línea de investigación.

Ya casi al final de estos agradecimientos, quiero mencionar a todos aquellos alumnos, becarios pre y posdoctorales, visitantes españoles y extranjeros, que han formado y/o forman parte del Grupo de Fijación de Nitrógeno, (algunos de ellos, actualmente profesores de ésta u otras Universidades) mi agradecimiento siempre a todos y todas por su contribución, avances y actualización constante en la investigación que hemos realizado en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias.

Mi último reconocimiento es para un vasco licenciado por la Universidad de Valladolid, llegó a la Universidad de Granada siguiendo a su maestro, quería ser Químico Orgánico, que contribuyó a que continuara en la investigación y en la llamada carrera académica. He tenido la fortuna de compartir mi vida, Migue, mi agradecimiento.

Como fisióloga vegetal, asumo que la ciencia de las plantas es fundamental para abordar los principales desafíos que enfrenta la humanidad en el siglo XXI, las plantas captan y distribuyen la energía de la biosfera, proporcionan alimentos y materiales utilizados por los seres humanos, que dan forma al medio ambiente. **Aceptando que los tres grandes retos que enfrenta a la humanidad en nuestro tiempo son alimentos, energía y degradación ambiental, los tres están relacionados con las plantas.**

Mi disertación va a ser un laudo a las leguminosas como cultivos no sólo de interés agrícola como muchos otros, sino por su capacidad **de llevar incorporado el fertilizante nitrogenado** digno de mencionar, entre otros aspectos, que espero ir desgranándoles en esta reflexión.

1. Nutrición Mineral

Los años 50 con la llegada del Profesor Dr. Luis Recalde como primer Catedrático de Fisiología Vegetal en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y a la EEZ, de la que fue director durante algo más de una década, implantó en ambos Centros la línea de investigación relacionada con la Nutrición Mineral en Plantas Cultivadas, la cual emprendí.

La aproximación al conocimiento científico sobre la **Nutrición Mineral de las Plantas** comienza entre los siglos XVII y XVIII, cuando algunos naturistas europeos asumieron las primeras evidencias experimentales lo que había sido empíricamente conocido por cerca de dos milenios, por lo que, la adquisición de las competencias sobre la nutrición mineral en plantas ha sido lenta y difícil. De finales del siglo XVIII recordamos las obras de Stephen Hales (1677-1761) que estudió el transporte del agua y solutos además de comprobar que el aire (CO₂) contribuía a la nutrición del vegetal y la de Theodore de Saussure (1787-1845), que describió la absorción

selectiva de determinados nutrientes por la planta y dilucidó la controversia científica existente al definir la esencialidad de los elementos minerales²⁴.

Ya en el siglo XIX Julius von Sachs, botánico alemán, demostró que las plantas pueden crecer en soluciones acuosas carentes de suelo y abordó la absorción de nutrientes con diversas técnicas y métodos que lo convirtieron en pionero en el Análisis Elemental en Plantas. También se impuso el concepto de elemento esencial, que posteriormente fue fijado como criterios de esencialidad por Arnon y Stout⁵ en 1939. Este principio favoreció las investigaciones concernientes a deficiencias en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como las alteraciones fisiológicas y bioquímicas de las mismas.

Carl S. Sprengel (1803-1859), conocido como el iniciador de la química agrícola, personificó el conocimiento en este periodo imponiendo la denominada de “ley de mínimos” y profundizó en el empleo de fertilizantes minerales (para él las plantas estaban constituidas por carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno que procedía de la atmósfera, azufre, fósforo, hierro y otros elementos) sin reconocer la necesidad de provisiones externas de sales de nitrógeno para las cosechas en discusión abierta con la escuela inglesa de Lawes y Gilbert⁵⁹ defensores y convencidos de esta necesidad.

En esa misma época, Boussingault en 1854 intentó demostrar la fijación de nitrógeno de la atmósfera por las plantas sin lograr pruebas convincentes. Sin embargo, con la publicación de balances de nitrógeno en plantas en experimentos realizados en campo, evidenciaron el incremento de nitrógeno en suelos en barbecho cultivados con leguminosas⁵⁸.

A mediados del siglo XIX, Herman Hellriegel (1831-1895), hijo de un agricultor alemán, Licenciado y Doctor en Química (1854) por la Universidad de Leipzig, de la que fue Profesor. Posteriormente como Director de la Estación Experimental Agraria de Bernburg/Saale, junto con

su asistente Herman Wilfarth (1853-1904), consiguieron demostrar que los cultivos de gramíneas y cereales sólo utilizan el nitrógeno del medio de cultivo, mientras que las leguminosas contienen más nitrógeno que el procedente del sustrato, por lo que pueden utilizar el N_2 del aire, asociándolo a unos nódulos radicales producidos por la infección de microorganismos⁴³. En 1895 cuando Hellriegel murió, Wilfarth en su obituario comentó “no deseó nunca el honor de encontrar algo nuevo, ni inclinación a ver la bacteria por todas partes, pero algunas observaciones muy ocasionales y accidentales nos condujo a realizar un tipo de trabajo que no había sido nuestro objetivo al principio”.

Ellos observaron mediante microscopía unas estructuras filamentosas que ya habían sido descritas por Marcelo Malpighi en 1679, que las consideró agallas de insectos. Woronin¹²⁷ relacionó estas bacterias y filamentos que se detectan en los nódulos radicales, con la observación de ciertos filamentos/hifas y las asoció con los hongos micorrícicos. En la actualidad a esas estructuras filamentosas las denominamos cordón de infección.

Martinus W. Beijerinck (1851-1931) en 1888 aisló la bacteria procedente de nódulos desinfectados, la describió como una especie perteneciente al Género *Bacillus*, especie *Bacillus radicola* (posteriormente renombrada como *Rhizobium leguminosarum* por Frank en 1889) y aunque no tenían pruebas de que esas bacterias pudieran infectar a la raíz fueron reconocidas como los verdaderos agentes que podían fijar el nitrógeno atmosférico⁸.

La **fijación de nitrógeno**, así como la **fotosíntesis**, son procesos suministradores de energía en los que reside la base de la vida sobre la tierra y nos proporcionan elementos vitales para su desarrollo. La **fijación de nitrógeno** proporciona el nitrógeno en forma de amonio, componente básico de los ácidos nucleídos responsables de almacenar y transferir la información genética y de las proteínas, codificadas por el ADN, claves en el desarrollo de las células y la **fotosíntesis**, que etimológicamente significa

síntesis con ayuda de la luz, en realidad consiste en la rotura de la molécula de agua por los fotones de luz (fotólisis) en hidrógeno y oxígeno que lo liberan a la atmósfera. Ambos procesos están condicionados por dos enzimas singulares y únicas. La primera de ellas, la **Nitrogenasa**, es una enzima de aparición muy temprana (hace más de 3.5 Ga de años) se cree que gracias a la capacidad de actuar sobre diferentes sustratos con triples enlaces (acetileno, azidas, cianuro) estuvo implicada en los comienzos de la vida en la detoxificación en la llamada sopa primigenia, rica en este tipo de compuestos. Esta enzima reduce el N_2 atmosférico a amonio, es lábil al oxígeno, inactivación que evita el sistema biológico mediante diversas estrategias y con elevado costo energético. La segunda es la **Rubisco** (ribulosa bifosfato carboxilasa), que utiliza el agua, CO_2 atmosférico y fotones de luz solar para producir hidratos de carbono y regeneración del O_2 atmosférico. Ambas enzimas contribuyen al desarrollo de las plantas.

El nitrógeno es posiblemente el nutriente más importante requerido por las plantas, sin embargo la disponibilidad de este elemento es limitada en muchos suelos y aunque la atmósfera terrestre contiene un 78.1% en forma gaseosa (N_2) que al no ser reactivo, las plantas son incapaces de utilizarlo de esta forma. La utilización de nitrógeno atmosférico por el hombre en la agricultura fue al azar a través de la llamada fijación industrial.

2. Fijación de Nitrógeno Industrial

Durante la primera guerra mundial el químico alemán Fritz Haber (de origen judío) de la Universidad de Karlsruhe, estudiando la capacidad letal de determinados gases tóxicos como el dicloro o el zyclon B con fines bélicos, consiguió en 1909 romper el triple enlace del N_2 atmosférico, utilizando un catalizador de hierro y gran cantidad de combustible fósil para lograr obtener las altas presiones y temperaturas que se requiere para disociar el

N_2 , unirlo al H_2 procedente del metano y sintetizar el amoníaco. Ironías de la historia, tras el final de la conflagración de la Primera Guerra Mundial, Fritz Haber que tenía que haber sido juzgado como criminal de guerra, por su contribución a la producción de gases letales, como armas químicas, obtuvo en 1918 el Premio Nobel de Química por el desarrollo de la síntesis del amonio. Pero sin duda se alcanzó un hito unos años después cuando su colaborador Carl Boch desarrolló un sistema que utilizaba este ingrediente activo en la producción de fertilizantes a escala industrial por lo cual obtuvo en 1932 el Premio Nobel de Química.

En 1913 la empresa BASF (**B**adische **A**nilin **S**oda **F**abrik) inició la primera planta de producción de amoníaco, que se paralizó por la Primera Guerra Mundial, al requerirse el amoníaco (como nitrato) para producir explosivos. Después de la depresión económica americana de los años 30 y de finalizar la Segunda Guerra Mundial, se favorece el empleo masivo de fertilizantes nitrogenados que se maximiza en la década de los 50 del siglo pasado y durante los decenios siguientes, se activaron nuevas factorías transformaron incesantemente amonio en fertilizantes.

No obstante, hoy día el proceso Haber-Bosch merece unánime respeto como uno de los logros de la historia humana.

Sin embargo, hemos pagado un alto precio por tan notables beneficios. Antes de explotar el proceso Haber-Bosch, es decir, hace escasamente 80-90 años, la cantidad de nitrógeno reactivo producido en el planeta se compensaba con la actividad de un pequeño grupo de bacterias que devolvían el nitrógeno reactivo a su estado gaseoso primigenio mediante el proceso de desnitrificación y ha bastado una generación humana para transformar este delicado equilibrio, afectando a lo que hoy día se conoce como **cambio climático**.

3. Fijación de Nitrógeno y Cambio Climático

Naciones Unidas lo define como un cambio atribuido directa o indirectamente a la actividad humana, que altera la composición de la atmósfera y que suma a la variabilidad climática natural observada durante períodos de tiempos comparables. La primera conferencia mundial sobre el clima tuvo lugar en Génova en 1979¹²⁵ y en el 1990 se crea el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) y en el primer informe de expertos se identifican como gases de efecto invernadero (GEI) el dióxido de carbono, el metano, el óxido nitroso y los compuestos clorofluorcarbonado (CFC)⁴⁷. A excepción de estos últimos, el resto son naturales, es decir, existen en la atmósfera desde antes de la aparición de los seres humanos, sin embargo a partir de mediados del siglo XIX, coincidiendo con la revolución industrial, el uso de combustibles fósiles, derivados de actividades industriales, del transporte y del uso de fertilizantes, favoreció el aumento de todos ellos.

El incremento de monóxido (CO) y dióxido de carbono (CO₂) liberado durante la oxidación del combustible fósil, la actividad antropogénica, la ganadería y la producción de fertilizantes nitrogenados, contribuye al llamado efecto invernadero por el elevado aumento de la temperatura (GWP Global Warning Potential). Según el informe de IPCC 2007⁴⁸ el nivel de CO₂ que ha incrementado considerablemente desde el comienzo de la era industrial, llegará a 450 ppm dentro de los próximos 50 años con importantes consecuencias medioambientales. Este aumento de CO₂ está afectando ya directamente a la “**despensa de la casa**” puesto que en cultivos de trigo, en experimentos de campo se ha comprobado que el exceso de CO₂ atmosférico interfiere en el metabolismo del nitrato, inhibiendo la formación de proteínas, lo que indica que afecta a la calidad de los alimentos¹⁰, según describe recientemente Arnold Bloom (2014, Universidad de Davis, California).

Aún cuando se implica al dióxido de carbono la máxima responsabilidad del cambio climático, no es despreciable la contribución de algunas especies reactivas de nitrógeno, procedente prioritariamente de la descomposición del fertilizante nitrogenado, que libera óxido nitroso (N_2O) gas con un potencial de calentamiento 298 veces mayor que el CO_2 , (emitido prioritariamente por la agricultura y la ganadería)²², que pasa a la atmósfera y afecta a todos los eslabones del ciclo del nitrógeno (amonificación, nitrificación y desnitrificación).

La aplicación del fertilizante nitrogenado es un proceso en parte ineficaz, puesto que sólo la mitad (en el mejor de los casos) del nitrógeno aplicado alcanza la planta cosechable, el resto se pierde por lixiviación, causando problemas medioambientales como la contaminación de aguas subterráneas, vías fluviales y finalmente las aguas costeras, pudiéndose inducir el proceso de eutrofización que puede ser perjudicial para la vida marítima e incluso humana y por volatilización, favoreciendo la lluvia ácida y la destrucción de la capa de ozono. Por todo ello se requiere reducir nuestra confianza con estos fertilizantes y promover el uso eficiente y optimizado de entradas de nitrógeno alternativas²².

La normativa actual⁴⁸ está encaminada a mitigar o reducir las emisiones (N_2O , NH_3 , NO_3^-) mediante diversas alternativas como, el manejo productivo y adecuado del suelo, el uso eficiente de los abonos nitrogenados (evitando la sobre aplicación de fertilizantes), o la adición de inhibidores de la desnitrificación, como el DCP (2,4 diclorofenol) o el DMPP (dimetil pirazol fosfato) que ralentizan la oxidación bacteriana del nitrito en el suelo, o con la adición de inhibidores de la ureasa que evitan que el NH_3 se volatilice y el nitrógeno queda útil para la planta¹²⁶

Otras consecuencias derivadas del cambio climático entrañan un mayor riesgo de fenómenos meteorológicos extremos, de gran intensidad, condiciones de sequía a largo plazo, aumento de la temperatura, incluso se

puede ver afectada la distribución enfermedades¹²⁴, así como procesos espectaculares, dramáticos y destructivos que la naturaleza recientemente y cada vez con más frecuencia, nos está brindando, por lo que sería de interés la implicación de la sociedad para mejorar esa situación. Wangari Maathai, Premio Nobel de la Paz en 2004 asume, junto a la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), que la forma más directa de frenar el cambio climático consiste en dejar que las tierras de cultivo se conviertan de nuevo en las praderas y bosques naturales que fueron en el pasado.

La adaptación al cambio climático requiere la adopción de prácticas agrícolas que reduzcan significativamente el uso del nitrógeno químicamente sintetizado, dando prioridad a la **Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)** si se desea mantener tanto la producción de alimentos como un medio ambiente saludable para la población humana, en continuo incremento⁸⁷.

4. Fijación Simbiótica de Nitrógeno

La disponibilidad de nitrógeno atmosférico, en favor de la productividad y los ecosistemas, mediante la reducción del N₂ inerte a amonio es un placer restringido exclusivamente a algunas procariotas que son capaces de romper el triple enlace de la molécula de N₂ con la participación de la nitrogenasa, y formar amonio que las bacterias ceden a las plantas en simbiosis que lo integran en proteínas.

La fijación simbiótica de nitrógeno por rizobios en nódulos de raíces de leguminosas inyecta aproximadamente 40 millones de toneladas de nitrógeno en sistemas agrícolas anuales⁴⁴. Se debe añadir la estimación en 460 Kg de nitrógeno fijado Ha⁻¹ año⁻¹ evidenciada por Urquiaga¹¹⁹ como balance global de nitrógeno procedente de la fijación biológica por

endófitos diazotróficos en diferentes cultivos determinado mediante la técnica del ^{15}N . Recientemente Figueiredo³⁰ ha estimado que la fijación biológica de nitrógeno global es de 122 Tg de nitrógeno por año en sistemas de cultivo. Este proceso ha sido objeto de investigación intensa durante décadas y nos hemos esforzado en entender el metabolismo a nivel fisiológico, bioquímico, molecular y genético encaminado a la mejora y lo más interesante su posible transferencia a otros cultivos que comentaremos después.

Los enfoques fisiológicos y bioquímicos de la fijación simbiótica de nitrógeno dominaron las primeras investigaciones y dieron lugar a conceptos fundamentales. En los 80-90, la revolución de la biología molecular influyó con los avances en la genética bacteriana, que agregó nuevos conocimientos, al conocer e identificar genes específicos de bacterias cruciales para este proceso, y favoreció el logro de la secuencia genómica completa de algunas especies de rizobios^{51, 37, 6, 31, 75, 128}. La disponibilidad de estas secuencias genómicas de las bacterias simbióticas consideradas modelo permite el desarrollo de numerosas herramientas moleculares que posibilitan cambios de la expresión génica y la identificación de genes implicados en este proceso. La diferenciación de la bacteria en vida libre en el establecimiento de la endosimbiosis con capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico, supone una expresión coordinada de genes específicos, por lo que la transcriptómica y la proteómica han sido básicas en la comparación de perfiles de ARNm y de proteínas expresadas por la bacteria en las diferentes etapas de la simbiosis. La genómica con todas sus tecnologías asociadas, ha permitido abordar experimentos con mutantes bacterianos en simbiosis, que facilitan los conocimientos fisiológicos, bioquímicos, moleculares y genéticos necesarios para desarrollar modelos holísticos, cuantitativos y predictivos del sistema fijador de nitrógeno en leguminosas.

4.1 Reconocimiento y Proceso de Infección

En la era de Internet donde la comunicación vía redes sociales constituye una actividad significativa, de modo similar los animales y plantas también las tienen establecidas por lo que interactúa recíprocamente con numerosos organismos, algunos de los cuales son patógenos e influyen negativamente en la planta, mientras que otros son simbioses beneficiosos. Las leguminosas establecieron y toleraron el desarrollo de redes sociales reclutando de forma selectiva a bacterias del suelo denominados rizobios utilizando como medio de comunicación la llamada vía SYM (simbiótica) de tal suerte que establecen interacciones muy sofisticadas y lucrativas con la bacteria que fija/reduce el nitrógeno atmosférico a amonio en la forma en la cual las plantas lo usan, como glutamina, asparragina o ureidos, a cambio las plantas le suministran a la bacteria la fuente de carbono en forma de sacarosa vía floema generada en el proceso fotosintético.

En el mantenimiento de estas redes sociales, las leguminosas desvían un porcentaje elevado (30-40%) de fotoasimilados para sintetizar diversos metabolitos, aminoácidos, azúcares, compuestos fenólicos como flavonoides, vitaminas, etc., que como exudados radicales serán liberados por las raíces para mantener el funcionamiento de los sistemas de comunicación mediante una rizosfera activa y selectiva.

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, comienza con el reconocimiento específico entre la bacteria y su planta hospedadora. La especificidad de la interacción simbiótica viene determinada por el intercambio inicial de señales químicas entre la planta que libera flavonoides que atraen a los rizobios, en los que se activan programas genéticos específicos de la nodulación (genes *nod*), iniciándose con los factores NOD ó **Factores de Nodulación** (NFs). Estos constan de una cadena de oligosacáridos con restos de N-acetilglucosamina con un grupo

acilo conectado a un azúcar no reductor. Los diferentes sustituyentes de esta molécula determinan la especificidad.

Los NFs los percibe un receptor quinasa rico en secuencias repetidas de leucina (LRR, RLK), identificado en *Medicago truncatula* MtDMI-2 y *Lotus japonicus* LjSYMRK1 (ambas consideradas leguminosas modelo), localizados en la epidermis del pelo radical que desencadena una secuencia de eventos que inician la infección bacteriana, deformación del pelo radical (“curling”), cambios en los microtúbulos, en la actina del citoesqueleto, formación del cordón de infección y activación del meristemo nodular en un lugar determinado del interior de la corteza radical. En esta cascada de señales se involucran **a)** un canal de K^+ , proteína localizada en la membrana nuclear, codificada por el gen MtDMI 1 (**D**ont **M**ake **I**nfected) en *Medicago truncatula* y por el gen LjPOLLUX y LjCASTOR en *Lotus japonicus*, **b)** dos nucleoporinas codificadas por los genes LjNUP 85 y LjNUP 133 en *Lotus japonicus*, no conocidas en *Medicago truncatula*, **c)** una proteína quinasa dependiente de calmodulina (CCaMK) codificada por MtDMI3 en *Medicago truncatula* y por LjSYM15/snf1 en *Lotus japonicus*. Esta CCaMK percibe los pulsos de influjo de iones calcio que se vinculan a la activación de canales iónicos y a las nucleoporinas y se detectan a los quince minutos de la interacción, seguido de la despolarización de la membrana por el eflujo de K^+ y Cl^- en el pelo radical. La sincronización del inicio del cordón de infección se visualiza entre 1-3 horas de la interacción de los NFs y la formación del primordio nodular, a las 18-24h, es perfecta y no ocurre sin la señalización descrita⁸⁶.

Concomitante el factor de nodulación también es percibido por otro segundo receptor en la epidermis de la raíz, un receptor quinasa con secuencias repetidas de lisina, que consta de un dominio quinasa intracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular LysM. Se han identificado dos de ellos en *Lotus japonicus* LjNF5 y LjNF1 y otros dos en

Medicago truncatula MtNFP (Nodule Factor Perception) y MtLYK3. La regulación de estos receptores y posiblemente su posición específica dentro de la membrana celular es importante durante el proceso de infección. En *Medicago truncatula* los receptores separa la cascada de señalización MtNFP, es responsable de los pulsos de calcio y MtLYK3 de la entrada de la bacteria. El receptor LYK3 muestra una exigencia rigurosa relacionada con el final no reductor de la estructura del factor de nodulación y su patrón de expresión se solapa con una E3-ubiquitin ligasa, la PUB-1 (Plant U-box protein 1) también inducida por los factores de nodulación. Los estudios de sobre expresión y de interacción entre PUB-1 y LYK3, muestran que PUB-1 es un regulador negativo de la vía de señalización de LYK3 que permite la infección y nodulación y actúa de forma selectiva en la discriminación de cepas de rizobios que inducen variantes en los factores de nodulación⁷⁷.

En la última década se han identificado formando parte de la vía SYM diversos **Factores de Transcripción** (TFs) específicos involucrados en el proceso de infección y nodulación. Estos genes están fuertemente conservados en eucariotas especialmente en plantas y codifican para proteínas que participan en la regulación de ADN que no forma parte de la ARN polimerasa, pero pueden aumentar secuencias concretas. Los factores de transcripción juegan un papel importante en el control del proceso y en las respuestas al medio ambiente, incluyendo funciones relacionadas con el rendimiento agronómico, por lo que no sorprende que las plantas tengan más factores de transcripción que los animales⁶².

a) El primer factor de transcripción conocido implicado en la nodulación, fue él codificado por el gen NIN (Nodule INcepción)¹⁰⁶ que interviene en el reconocimiento de la planta, en la deformación del pelo radical, formación del cordón de infección y la activación de la división celular de la corteza (CCD), la expresión del gen *MtNIN* está bajo el control de las citoquininas, hormona clave en la formación del nódulo.

b) El factor de transcripción nuclear Y (NF-Y) identificado en *Lotus japonicus*, actúa como molécula diana del factor de transcripción NIN. Es un complejo proteico trimérico (unido a una caja CCAAT) estudiado ampliamente en animales y en eucariotas (a diferencia FT-NIN) y está compuesto de tres subunidades A, B y C denominadas, LjNF-YA1, LjNF-YB1, LjNF-YC1⁵⁹. La expresión ectópica detecta que no está vinculado con la organogénesis del nódulo, pero sí con la inducción de la división celular en el primordio nodular y de raíces laterales. Estas funciones se pueden solapar con las del factor NIN en nódulos, aunque se establece que el factor NIN es el mediador entre la vía de señalización que conlleva la infección del rizobio y el mecanismo que regula la proliferación celular¹¹¹.

c) Los factores de transcripción NSP1 y NSP2 (Nodulation Signaling Pathway) pertenecen a las proteínas tipo GRAS (GAI, RGA, SCR), que codifican para proteínas esenciales en el inicio de la infección del pelo radical, y se activan después de los pulsos de calcio. Los factores de transcripción tipo GRAS están agrupados en ocho clases diferentes altamente conservados en plantas superiores, de hecho NSP1 y NSP2 se puede sustituir funcionalmente en leguminosas por genes ortólogos del arroz. Se han identificado en *Medicago truncatula*, NSP2 se localiza en el nódulo e interactúa con NSP1, interacción necesaria para la organogénesis y se asocia con la activación de los genes NIN y ERN⁴⁵. En *Lotus japonicus* estos factores de transcripción NSP1 y NSP2 son esenciales para la inducción de respuestas inducidas por rizobio, incluyendo las de los factores de nodulación y la organogénesis⁸¹.

d) En *Medicago truncatula* se ha identificado el factor de transcripción ERN1 (**RE**querido para la Nodulación) que codifica para el factor de transcripción de la familia AP2/ERF (**AP**etala2/**E**tileno **F**actor de **R**espuesta), que interviene en la diferenciación del nódulo. Este factor de

transcripción se localiza en el núcleo y es determinante en la infección bacteriana⁷⁹.

Asociado con la cascada de percepción de señales (SYM), emerge como un rasgo importante en el proceso de infección, la presencia de las **flotilinas** y la **remorina** proteínas que promueven el transporte, la agregación de proteínas y se requiere en la infección por rizobio, en la formación del cordón de infección y posiblemente actúan como proteínas andamios en este reclutamiento. Los genes que codifican para las flotilinas (*FLOTs*) en otros organismos se relacionan con: **a)** la patogénesis viral, **b)** el proceso de endocitosis, **c)** el crecimiento del tubo polínico y **d)** la formación de membrana. Las flotilinas a menudo se utilizan como marcadores de lípidos (balsas de lípidos) en microdominios de membranas ricas en colesterol y resistentes a detergentes. En el genoma de *Medicago truncatula* se han identificado siete genes y dos de ellos *FLOT 2* y *FLOT 4* están implicados en el inicio de los acontecimientos simbióticos, (elongación de pelos radicales y cordón de infección), después de percibir a los factores de nodulación y al factor de transcripción NIN. Se han aislado estas proteínas en la membrana de la bacteria dentro del nódulo (bacteroide) en *Medicago truncatula* y aunque las membranas de plantas tienen poco colesterol, en éstas es una mezcla de sitosterol, campesterol, estigmaesterol y gran parte de ergosterol, por lo que determinar cómo estos microdominios de membrana están definidos por las flotilinas, en distintas simbiosis, nos darán una información valiosa⁴¹.

También se usa como marcador de estas balsas de lípidos la remorina-1 (SYMREM1) importante durante la colonización del rizobio, su ausencia provoca aborto del cordón de infección y reducción del número de nódulos, interacciona con los receptores MtNFP y LjLYK3 lo que sugiere que puede reclutar a estos dos en las balsas de lípidos y su función puede ser crítica durante la infección radical⁴¹.

4. 2 Organogénesis Nodular

Cuando las bacterias avanzan por el cordón de infección (final del proceso de infección) y llegan al nicho celular que le proporciona la planta, son liberadas en el nódulo, (células infectadas), donde se inicia el proceso de diferenciación de la bacteria, asociado a un drástico cambio de estilo de vida, puesto que el metabolismo y la respiración se adaptan para suministrar la energía necesaria para la fijación de nitrógeno en condiciones de oxígeno reducido. Las células bacterianas diferenciadas en las células infectadas del nódulo se denominan bacteroides, quedan envueltas por una membrana de origen vegetal, constituyendo el simbiosoma, a través de la cual (membrana simbiosomal) se produce el intercambio de metabolitos entre ambos simbiosomas.

La diferenciación a que se someten las células del rizobio en el simbiosoma varía en las diferentes especies de leguminosas. La **diferenciación terminal** conlleva un aumento de tamaño de la bacteria, modificación de la membrana, endoreduplicación del genoma, aumento del contenido de ADN y la bacteria (poliploide) se transforma en bacteroide. La ampliación del genoma y el sacrificio altruista de la pérdida de la capacidad de dividirse, es específica de las leguminosas pertenecientes al clado carente de repetición-invertida (IRLC) como *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* (climas templados, nódulos indeterminados), mientras que los bacteroides de leguminosas no IRLC como *Lotus*, *Phaseolus* y *Vigna* (clima tropical, nódulos determinados) no muestran signos de diferenciación terminal, mantienen, su tamaño bacteriano normal, el contenido del genoma y la capacidad reproductiva, así como la posibilidad de retornar a su etapa de saprófito en vida libre. Incluso una misma cepa del rizobio que puede formar simbiosis tanto con leguminosas IRLC y no IRLC mantienen las diferencias en todo el proceso hasta el retorno a vida libre⁵².

Con esta diferenciación terminal e irreversible de las bacterias muestran lo que se denomina la **auxotrófia simbiótica** (dependencia del simbiote a la planta). Este proceso está controlado por la planta a través de péptidos específicos del Nódulo, **Ricos en Cisteína (NCR)**, y en glicina (**GRP**) que se activan durante el desarrollo de la simbiosis. Los genes que codifican para estos péptidos representan el 5% del transcriptoma de *Medicago truncatula* y se expresan exclusivamente en nódulo. La familia de genes (*NCR*) codifica para más de 300 péptidos, estos son pequeños, de peso molecular entre 3-5 KDa, compuestos por dos exones, el primero codifica para una péptida señal (con secuencia altamente conservada) y el segundo para el péptido maduro. Los genes *GRP* componen una familia más reducida de 24 miembros, también con una péptida señal altamente conservada y un péptido maduro compuesto por unos 100 aminoácidos. Los péptidos *NCR* y *GRP* están ausentes en el genoma de *Lotus japonicus* (leguminosa no IRLC).

Estos péptidos se consideran semejantes a los antimicrobianos que la planta los adoptan del sistema inmune innato en el proceso de simbiosis, para dirigir a la bacteria y evitar que tenga contacto directo con el citoplasma vegetal. Se asume que poseen actividad antimicrobiana, actúan como defensinas, inhiben la citocinesis y debilitan las membranas bacterianas. Los genes *NCR* activos en nódulos podrían ser parte de un mecanismo que evita el “conflicto de intereses” que se crea entre planta-bacteria, cuando la bacteria “tramposa” utiliza al carbono que le suministra la planta para acumular compuestos de reserva como polihidroxibutirato⁵⁵ en lugar de fijar nitrógeno, incluso podrían ser beneficiosos durante las senescencia nodular puesto que los bacteroides podrían ser fácilmente digeridos eficientemente por la planta⁵⁷.

Se puede asumir que la **auxotrófia simbiótica** se induce cuando los bacteroides entregan el control de la biosíntesis de compuestos esenciales a

la planta, tal como se originó la endosimbiosis plastídica y mitocondrial y se inicia con la pérdida de la síntesis de aminoácidos. El control del ciclo celular por los péptidos NCR y la producción del homocitrato por la planta sugieren que el bacteroide se comporta como la mitocondria y el cloroplasto, orgánulos que la evolución condicionó a depender de su anfitrión por lo que algunos autores consideran al **bacteroide como un amonioplasto**¹¹⁸.

La diferenciación bacteroidal, revela que el gen *BacA* protege al *Sinorhizobium meliloti* frente a la actividad antimicrobiana de los péptidos NCR. El gen *BacA*, codifica para una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de transportadores ABC, parece ser esencial en la interacción de bacterias y patógenos y se correlaciona con la producción de los péptidos NCR en la diferenciación bacteroidal. En este proceso la expresión del gen *BacA*, que muestra gran homología con los transportadores de ácidos grasos de cadena larga (VLCFA), se le relaciona con la formación o modificación de componentes de la membrana bacteroidal, alterando la sensibilidad a los péptidos antimicrobianos. Es indispensable en la formación del bacteroide en leguminosas IRLC (nódulos indeterminados) y consigue minimizar la acción bacteriana de los péptidos que favorecen la diferenciación bacteroidal⁴.

El análisis exhaustivo por medio de cDNA, oligoarrays y proteómica han revelado que mas de mil genes son inducidos en el proceso de formación de nódulos. Estos genes codifican para las llamadas **nodulinas** que se expresan de forma coordinada en las diferentes etapas de la interacción simbiótica. Las E-NOD (**E**arly **N**ODulin Protein) actúan en el proceso de infección, en la cascada de señalización (SYM) y al inicio del primordio nodular (Mt/LjNIN, Mt/LjNSP2, MtERN1, flotilinas) mientras que las nodulinas tardías se relacionan con **a**) la fijación de nitrógeno como la leghemoglobina, proteína nodular que controla el nivel de oxígeno para la

respiración bacteroidal, **b**) el metabolismo carbonado, como la sacarosa-sintasa, ó la fosfoenolpiruvato-carboxilasa **c**) el nitrogenado glutamato-sintasa, glutamina-sintetasa **d**) transportadores específicos: acuaporinas (nodulina 26), de dicarboxilatos, de sulfato, de aminoácidos, entre otros.

El rizobio en el interior del simbiosoma, al final de la diferenciación ya como bacteroide, induce los **genes *nif*** que codifican para la nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno atmosférico en condiciones de anaerobiosis. Para inducir el entorno microaerófilo se establece tres estrategias, una barrera para la difusión gaseosa, externa a la zona nodular que limita y controla el flujo de oxígeno al tejido infectado, una tasa de respiración bacteroidal y mitocondrial elevada que consumen velozmente el oxígeno y la síntesis de leg-hemoglobina considerada la proteína (nodulina) más abundante en nódulos.

La nitrogenasa, consta de una estructura compleja formada por dos componentes proteicos, la Fe proteína reductasa, un homodímero que se asocia al Mg-ATP y transfiere electrones desde un clúster metálico (4Fe-4S) al otro componente, que es una proteína heterotetramérica con el cofactor de Mo-Fe (FeMoco) donde se lleva a cabo la difícil rotura química del triple enlace de N₂ atmosférico.

El **cofactor de molibdeno** (FeMoCo) es único y estructuralmente diferente a otros cofactores de molibdeno ubicados en una amplia gama de enzimas vegetales que participan en procesos metabólicos esenciales. Su singularidad radica en la presencia de un componente orgánico que complementa al inorgánico (Mo-Fe₇-S₉-Y) identificado como el homocitrato, que se coordina por la unión de grupos carbonilos e hidroxilos al átomo de molibdeno. El homocitrato es un compuesto bastante inusual en el reino vegetal y de hecho solo se ha detectado de forma abundante en nódulos de leguminosas. Este homocitrato se sintetiza mediante la condensación de 2-oxoglutarato y acetil-CoA a través de una homocitrato-

sintasa (*nif V*), ausente en la mayoría de las especies de rizobio y que procede de la planta nodulada, condicionando lo que se ha denominado anteriormente auxotrófia simbiótica.

Las proteínas implicadas en la biosíntesis de este cofactor (FeMoco), proceso en diversas etapas, se dividen en: **a)** proteínas andamio donde el FeMoco se ensambla (genes *nif U*, *nif B* y *nif EN*) **b)** proteínas portadoras del metalo-clúster que llevan los precursores del FeMoco, al lugar del ensamblaje (genes *nif X* y *nif Y* y **c)** enzimas que suministran azufre, molibdeno y homocitrato (*nif S*, *nif Q* y *nif V*) como sustratos para la síntesis el cofactor. La proteína codificada por el *nif B* requiere S-adenosilmetionina (SAM) y obtiene el precursor del clúster Fe₆-S₉ considerado el núcleo al FeMoco que converge con el *nif EN*, que favorece la unión con el homocitrato en presencia del *nifH*, que codifica para una de las dos proteínas estructurales la Fe-proteína.

4.3 Control de la Nodulación y Autoregulación Nodular (AON)

El proceso de nodulación está estrictamente controlado por la planta a través de las hormonas vegetales, compuestos químicos de bajo peso molecular sintetizados por la planta, clave en la iniciación, diferenciación y funcionamiento del nódulo radical⁸². Aun cuando el rizobio es capaz de sintetizar determinadas hormonas vegetales (auxinas, citoquininas, giberelinas), se puede establecer que las hormonas de origen bacteriano no son esenciales en la organogénesis del nódulo⁹⁴, optando por asignarles a éstas una estrategia en la nodulación más refinada. En general, se establece que actúan como reguladores positivos de la nodulación auxinas (AIA), citoquininas (CQs), giberelinas (GAs), brasinoesteroides (BRs) y estrignolactonas (SL) mientras que el ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno se consideran reguladores negativos, inhibiendo la nodulación.

Los eventos iniciales inducidos por los NFs, en epidermis y pelos radicales por la infección bacteriana, coinciden con la activación de la división celular en determinadas células de la corteza radical. Ambos eventos, epidérmicos y corticales, pueden ser separados, aun cuando existe una sintonía perfecta entre infección y división celular cortical, asumiendo que las citoquininas coordinan ambos programas, formación del cordón de infección e inicio del primordio radical. El papel crítico de la citoquininas se ha revelado a través de la identificación de los receptores de citoquininas en *Medicago truncatula* CRE1 (**RE**ceptor **C**itoquininas), con un dominio histidin quinasa (HK4) y en *Lotus japonicus* LHK1 1 (**L**ike **H**istidin **K**inase), ambos localizados en el plasmalema de las células corticales y activados por factores de transcripción (ERN1, NSP2 y NIN).

Las citoquininas se consideran la señal móvil que se sintetizan en las células infectadas de la epidermis asociada a los pulsos de calcio y se transporta hasta el plasmalema de las células de la corteza donde se encuentra su receptor (CRE-1). A través de las histidín quinasa solubles en el citoplasma llegan al núcleo y mediante los Receptores de Respuesta (RR-tipo A, ARR4) activan los factores de transcripción mencionados (ERN1, NSP2, y NIN), favoreciendo la expresión de las proteínas (ENODs) específicas que inducen la división celular³². Tanto la sobre expresión de la citoquinina oxidasa como el silenciamiento del gen que codifica para la 3-hidroxi-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR1), enzima implicada en la biosíntesis del ácido mevalónico, precursor de la citoquinina (isopentenil adenina), en ambas situaciones se detecta la reducción del número de nódulos¹⁰².

Las auxinas y su transporte polar (PAT) es crucial en el inicio y desarrollo del nódulo, puesto que la inhibición de este transporte por inhibidores específicos como el 2,3 triyodo benzoico (TIBA) o el ácido N-1-naftilftalamico (NPA), ha dado lugar a la formación de pseudonódulos a partir de células del periciclo y a la activación de la expresión de proteínas

ENOD favoreciendo una acumulación local de la auxina en el primordio nodular, requisito previo para el inicio del primordio nodular.

La acumulación local de la auxina, mediante la inhibición del PAT, durante el inicio de la nodulación podría estar regulada por tres sistemas **a)** la síntesis de flavonoides y brasinoesteroides, evidenciado por el silenciamiento de dos enzimas claves en la biosíntesis de los factores de nodulación, la chalcona sintasa (MtCHS), o la isoflavonasintasa (GmIFS), **b)** por una respuesta sistémica que formaría parte del mecanismo de autorregulación, implicando al etileno, que favorecería la acumulación de AIA en la raíz, **c)** mediante la otra diana de señalización, las citoquininas que suprimen el transporte de auxina para que se acumule en las células de la corteza radical⁸⁶. Esta inhibición del PAT justo debajo del punto de infección, controlada por citoquininas, es transitoria y causa un desequilibrio en relación auxinas/citoquininas que favorece la activación de la división celular en el periciclo (donde se inician las raíces laterales) y en las células corticales (inicio del primordio nodular).

Hay dos familias de transportadores de auxinas en el plasmalema: PIN (MtPIN2) que favorece el eflujo de auxina e induce la nodulación y su silenciamiento determina la reducción de nódulos y AUX1/LAX, (MtLAX), permeasas que aumentan su expresión durante la formación del primordio nodular, favorecen el eflujo de auxina del primordio nodular, restableciendo el transporte polar en la raíz y por tanto el aporte de hormona al nódulo en desarrollo³⁸.

Conocer la relevancia de los cambios en la relación auxina/citoquinina en este proceso es uno de los temas a dirimir en el futuro, integrando **a)** la implicación de ambas hormonas en el ápice radical, pudiendo la auxina favorecer la división celular en el mismo ápice, mientras la citoquinina actúa en el meristemo proximal cercano a la zona de elongación del ápice radical **b)** asumiendo que la auxina actuaría como factor principal en el periciclo,

inicio de raíces laterales, puesto que estos primordios radicales son sensibles a las citoquininas **c**) y las citoquininas serían las activadoras del primordio nodular, al suprimir (a través de PIN) el transporte de la auxina, favoreciendo su acumulación. La compleja regulación auxina/citoquinina en la organogénesis del nódulo, está vinculado con el espacio/tiempo debido a las múltiples funciones asociadas al tejido nodular¹⁰².

Las leguminosas en simbiosis actúan como anfitrionas perfectas para asegurar los niveles apropiados de fijación de nitrógeno, controlando la rentabilidad del consumo energético de carbohidratos fotosintéticos al mínimo. Este riguroso y severo control se desarrolla mediante el proceso de **Autorregulación nodular** sistémico dirigido al mantenimiento y formación del número de nódulos. Nutman⁸⁴ en 1952 ya propuso la autorregulación sistémica de la nodulación, al observar el aumento transitorio en el número de nódulos nuevos en raíz de trébol rojo después de la escisión de nódulos. Este proceso se adopta dependiendo de las condiciones ambientales, de la disponibilidad de nitrato o amonio, de la acidez del suelo, del suministro de carbono, condiciones todas ellas que determinan la eficacia de la nodulación.

Este sistema AON es un **proceso bidireccional** gobernado por una señalización a larga distancia entre tallo y raíz (raíz/tallo/raíz), en la cual se involucra una **señal radical (Q)** procedente de la infección que se produce al inicio de la división celular en el primordio nodular, esta señal se transporta por el tallo, presumiblemente por el xilema, que genera una segunda señal identificada como **factor inhibidor** procedente **del tallo SDI (Shoot Derived Inhibidor)** que activa un programa de defensa, para restringir la nodulación y suprimir los eventos nodulares en raíz. Este proceso se ha completado al conocer que la señal transmitida por el tallo a la raíz es percibida por una proteína radical en *Lotus japonicus* **F-BOX TML (Too Much Love)** que funciona en la etapa final del proceso de

autorregulación. Esta proteína es codificada por un gen específico que se expresa en el primordio nodular, es constitutiva y candidata a disminuir drásticamente el número de nódulos ¹¹⁵.

Se ha establecido que el factor inhibidor procedente del tallo, es una molécula pequeña de menos de 1 Kda, estable al calor, requiere factores NOD y probablemente sea una proteína o un ARN. En el actual modelo de AON la señal derivada de la raíz Q transportada por el tallo, en la parte aérea es reconocida por un receptor quinasa rico en secuencias repetidas de leucina LRR y se identifican con los péptidos CLE²⁹ (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION RELATED)

Los péptidos CLE son polipéptidos pequeños aproximadamente 12-13 aminoácidos, ampliamente utilizados como moléculas de señalización en la comunicación célula a célula en animales y plantas, evolutivamente altamente conservada en plantas, y excepcionalmente en nematodos parásitos de plantas. La familia CLE regula el tamaño y los brotes del meristemo floral en *Arabidopsis thaliana*. En *Arabidopsis thaliana* se han detectado siete péptidos CLE (CLE1-CLE7), con secuencias similares a la de los péptidos CLE de leguminosas inducidos por rizobio o nitrato⁹⁷ y sus receptores de LRR (receptores con secuencias repetidas de leucina). Se han detectado tres péptidos CLE en *Glycine max*, Gm RIC1, Gm RIC2 (Rhizobio Induce CLE) y Gm NIC 2 (Nitrate Induce CLE), dos en *Medicago truncatula* Mt CLE12 y Mt CLE 13 y dos en *Lotus japonicus* Lj CLE-RS1 y Lj CLER2, todos ellos se inducen por nitrato y suprimen la nodulación por lo que están involucrados en el mecanismo AON⁸⁰.

En 2003 Searle et al¹⁰⁸ identificó en soja (*Glycine max*) un receptor quinasa GmNARK (Kinasa Receptor Autorregulación Nodulación) que ejercía el control de AON similar a CLAVATA1 (CLV1) de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, mientras CLV1 controla la señalización a corta distancia, GmNARK expresado en la parte aérea de la planta, comunica a larga

distancia (tallos-raíces) a través del floema con los primordios nodulares y las raíces laterales. GmNARK es considerado como un gen relacionado con la defensa frente a patógenos, aunque de forma distinta en la nodulación²⁹.

Las leguminosas que carecen del mecanismo de autoregulación (mutantes AON) presentan una proliferación desmesurada del primordio nodular y de raíces laterales, se consideran supernodulantes y disminuyen la sensibilidad a la inhibición por nitratos. En experimentos de injertos en mutantes supernodulantes HAR1 (**H**ipernodulation **A** aberrant **R**oot formation) se ha demostrado que el receptor quinasa GmNARK (LRR-RLK) controla el número de nódulos en la raíz (a través del tallo) y funciona cuando la concentración de nitrato en el suelo es alta⁹⁷. La inhibición de la nodulación por nitrato se establece mediante la interacción de las proteínas NIC-1 y NARK en la raíz que permite la producción del SDI inhibidor de la nodulación. En ambos genes HAR1 y NARK es esencial el proceso de fosforilación en la señalización y son idénticos a CLAVATA1 con una función similar en el meristemo apical de la raíz o del nódulo²⁷. Los mutantes TML y HAR1 tienen semejantes vías de actuación¹¹⁵.

La hormona clave que media en el proceso AON es el **etileno**, una molécula pequeña gaseosa que controla la sensibilidad de las leguminosas a los factores de nodulación, pulsos de calcio, deformación de los pelos radicales, inicio del cordón de infección, la inhibición de la nodulación, transporte polar de la auxina y es capaz de bloquear la división celular en la corteza radical. A mediados de los 80 en la primera Tesis Doctoral que dirijo se evidenció la influencia del etileno en el proceso de nodulación^{63, 64} así como la correlación existente entre la inhibición de la nodulación inducida por el nitrato del suelo y la producción del etileno⁶⁵. Posteriormente el grupo de investigación de los Drs. Ligeró y Caba continuaron estos estudios con inhibidores del precursor del etileno, como el 1 ciclopropano-carboxílico (ACC), y el amino-vinil-glicina (AVG) y antagonistas, los iones Ag⁺,

comprobando que se superaba el efecto inhibitor del etileno y del nitrato en la nodulación y con la utilización de mutantes supernodulantes, tolerantes al nitrato y carentes del mecanismo de autorregulación interno, demostraron la vinculación de la sensibilidad de la nodulación al etileno^{12,13,14}. Estas pruebas metabólicas fueron apoyadas posteriormente, por pruebas genéticas utilizando mutantes hipernodulantes SIK (Stickle) de *Medicago truncatula*, defectuosas en el receptor del etileno EIN2 (EthylenE INsensible 2) que codifica para una proteína transmembrana, observando en los mutantes, nódulos generados de forma incontrolada, con numerosos cordones de infección así como la hipersensibilidad de los pelos radicales a los factores de nodulación⁹¹. Recientemente se asume que la inhibición de la infección por etileno puede estar mediada por el gen *lot1* detectado en una mutante de *Lotus japonicus* con baja nodulación y distorsión de los pelos radicales de la raíz⁸⁸.

En una visión más amplia del proceso de nodulación y su autorregulación interviene el balance con otras fitohormonas, que contribuyen a coordinar ambos procesos como:

Los **brasiñoesteroides (BR)** implicados en el mecanismo de AON actúan como reguladores negativos en el control del número de nódulos. La aplicación de brasinólida, inhibidor de la biosíntesis de los BRs, aumenta el número de nódulos, y su aplicación exógena aumenta la biosíntesis de espermina, poliamina que causa una disminución en el número de nódulos, mientras que la aplicación foliar de la brasinólida aumenta la concentración de esta poliamina en hojas y reduce el número de nódulos, incluso en cepas hipernodulantes. Estos estudios avalan que la autorregulación de la nodulación por los BRs está mediada por la síntesis de poliaminas¹¹⁷, aun cuando los experimentos realizados con mutantes BR-insensibles, sugieren que la regulación de la nodulación por los BRs pueden ser local y/o

sistémica, esperamos ahondar en este tema objeto del proyecto de dirección compartida con el Dr. Herrera Cervera.

El **ácido jasmónico (AJ)** actúa como un regulador negativo en la nodulación y es sinérgica al etileno, suprime el cordón de infección, la frecuencia de los oscilaciones del calcio y su implicación en la formación del número de nódulos está vinculada a la proteína Gm NARK asociada al metabolismo del ácido octodecanoico precursor del ácido jasmónico⁵⁶.

Las **giberelinas (GAs)**, inicialmente se las consideró inhibitoras de la nodulación y deformación de los pelos radicales, retardan la frecuencia de los picos de calcio y la expresión de NSP2 y NIN, factores de transcripción vinculados a fases iniciales de la nodulación⁷². Mediante estudios genéticos con mutantes GA-deficientes y constitutivas se demostró que se requiere un delicado equilibrio de GAs en el desarrollo del nódulo, ya que concentraciones elevadas, inhiben la formación de nódulos y la deficiencia en GAs induce la formación de nódulos aberrantes. Ferguson et al²⁹ deducen que, las GAs pueden promover el inicio de la nodulación, no regulan el sistema AON, suprimen la producción de etileno, y las considera favorables a la nodulación.

Las **estrígolactonas (SL)** identificadas como moléculas señal de reconocimiento de hongos micorrícicos en interacciones simbióticas con plantas, se las ha implicado en el proceso de nodulación, sin afectar al crecimiento de la bacteria⁶⁹. Se ha comprobado que los factores de transcripción NSP1 y NSP2 son indispensables para la biosíntesis de estrígolactonas, ambas proteínas se conservan funcionalmente en *Medicago sativa* (alfalfa) y en *Oriza sativa* (arroz). Asumiendo que estas especies representan linajes filogenéticos distintos y se diferencian en 150 millones de años, se sugiere que la regulación de la biosíntesis de las estrígolactonas por NSP1 y NSP2 es una función ancestral conservada en plantas y que

ambas proteínas intervienen en la señalización de la vía SYM y en la biosíntesis de la estrigolactonas en condiciones no simbióticas⁶⁶.

El **ácido salicílico (AS)** conocido como la aspirina sin acetilar se considera una hormona vegetal asociada a procesos de defensa frente a patógenos. Interviene en la infección por rizobio provocando una acumulación endógena de ácido salicílico y una reducción de la nodulación con rizobios no compatibles. Cuando se limita el ácido salicílico endógeno mediante la expresión ectópica del gen *nah G* de *Escherichia coli*, que codifica para una ácido salicílico-hidrolasa, enzima que degrada el ácido salicílico a catecol, se produce un aumento en el número de nódulos y de los puntos de infección, tal como demostraron la Dra. Soto y el Dr. Olivares con raíces transformadas de *Lotus japonicus*¹¹³. La implicación del ácido salicílico como sistema de defensa frente al estrés abiótico se detectó en estudios realizados en nuestro grupo de investigación, por los Drs. Tejera y Palma relacionados con estrés osmótico inducido por la salinidad en el medio detectándose que mitigan la inhibición de la fijación de nitrógeno⁸⁹, evitando la toxicidad iónica en células nodulares y activando sistemas defensivos antioxidantes ante la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) producidas por el estrés⁹⁰.

El **ácido abscísico (ABA)**, hormona clave en los procesos de abscisión de hojas y frutos asociada con la respuesta a estrés osmótico. Se le asigna un papel de regulador negativo en el control del número de nódulos, interfiere en el inicio del proceso, la deformación del pelo radical, la vía de señalización por factores de nodulación, en los pulsos de calcio y reprime la expresión de genes relacionados con la nodulación, incluyendo la respuesta de las citoquininas y al factor de transcripción NIN¹¹⁴. El ABA está involucrado en las respuestas de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en salinidad comprobándose que el contenido endógeno de ABA incrementa en planta y en nódulos y mitiga los daños inducidos por el estrés osmótico. Se

vincula con: el metabolismo en la prolina (osmoprotector) y la limitación del transporte de Na^+ al mantener una relación K^+/Na^+ elevada⁵⁴, con la adaptación de la asimilación del amonio procedente de la FBN en ureidos y el catabolismo de purinas⁵³, con la biosíntesis de poliaminas específicas del nódulo cuya acumulación celular favorece el ajuste osmótico⁶⁸.

4.4 Simbiosis *versus* Patogénesis

El proceso de autoregulación nodular ha sorprendido por algunas semejanzas que coexisten con los mecanismos de respuesta de defensa inducida en la planta hospedadora ante una invasión microbiana que se denomina colectivamente inmunidad innata (MTI, Microbial Associated Molecular Plant Triggered Immunity) por lo que el éxito de la interacción planta-bacteria requiere la evasión de la inmunidad innata, ya sea evitándola o por la supresión de las defensas de la planta⁹. Algunas hormonas (ácido salicílico, ácido jasmónico y estrigolactonas) están involucradas en la respuesta a patógenos a través de esta vía de señalización probablemente coordinada con los factores de nodulación (vía SYM) en la optimización de la misma.

En la naturaleza, las raíces de plantas están continuamente expuestas a una amplia comunidad de microorganismos (microbioma rizosférico), que pueden ser simbióticos y no simbióticos (patógenos), que inicialmente son reconocidos como organismos extraños. Para diferenciarlos la planta ha desarrollado específicos receptores de respuestas puesto que ambos mecanismos coexisten. La activación del sistema inmune, fundamental en el establecimiento de relaciones rizosféricas, se inicia con el reconocimiento de moléculas denominadas MAMPs (**P**atrones **M**oleculares **A**sociados a **M**icrobios) por los receptores de plantas PRRs (**P**atrones **R**ecognition **R**eceptor) que por lo general contiene dominios extracelulares de LRRs e intracelulares (trasmembrana) con dominio quinasa (LRR-RLK). Entre las moléculas que reconocen los MAMPs se encuentran: quitina y ergosterol

(componentes de las hifas fúngicas), lipopolisacáridos (LPS), glicoproteínas y los peptoglicanos (PGNs) (polímeros de N-acetilglucosamina y de N-acetilmurámico alternando en uniones $\beta(1-4)$ y unidos a péptidos de cadena corta) constituyentes estructurales de la pared celular de bacterias, proteínas de choque al frío (CPS) y la **flagelina** que es una proteína bacteriana estructural de los flagelos que induce la movilidad bacteriana.

La flagelina se ha identificado como un péptido de 22 aminoácidos (flg22) que actúa como un elicitor potente de respuestas asociadas con la inmunidad provocada en plantas. La flagelina 22 es reconocida por un receptor FLS2 quinasa LRR localizado a la membrana plasmática. La interacción con su receptor induce a un aumento intracelular de iones calcio, la activación de la producción de ROS, la producción de óxido nítrico, la transcripción de genes relacionados con la defensa como el factor de transcripción WRKY y la biosíntesis de etileno.

El Dr. López Gómez de nuestro grupo de investigación, en el Instituto de Botánica de la Universidad de Basilea, bajo la dirección del Prof. Thomas Boller, evidenciaron que las respuestas de defensa inducidas por flg22 en las raíces de *Lotus japonicus* causaron una inhibición en la infección del rizobio (*Mesorhizobium loti*) y el retardo en la organogénesis. Comprobaron que en presencia de flg22 se inhiben los factores de transcripción (NSP1 y NSP2 y la ENOD-40), lo que confirma el antagonismo entre genes de defensa y el inicio de la organogénesis nodular. Sin embargo la purificación de flagelina de *Mesorhizobium loti* no indujo ninguna respuesta en *Lotus japonicus*, lo que sugiere la producción de otros elicitores por parte de la bacteria simbiótica. No obstante, flg22 no afecta a la formación de nuevos nódulos cuando la simbiosis está establecida, por lo que se asume que, en el establecimiento de la simbiosis predomina la señalización simbiótica frente a la respuesta de defensa⁶⁷.

La ubiquitinación directa de PRR-FLS2 atenúa la inmunidad innata en plantas. En *Arabidopsis thaliana* el receptor de respuesta FLS2 detecta la flagelina bacteriana e inicia las señales de inmunidad asociado a BAK1, un receptor quinasa rico en leucina similar a BRI1 (receptor quinasa de la brasinólina) que está involucrado en la señalización por FLS2, actuando como regulador positivo. FLS2 y BAK1 forman un complejo en los primeros minutos de la estimulación con flagelina que induce el reclutamiento de las U-Box E3, ubiquitin ligasa (estrechamente relacionados) PUB12 y PUB13 formando un complejo. La ubiquitinación se ha implicado en la inmunidad innata, en el proceso de muerte celular y en defensa. PUB12 y PUB13 se identifican como reguladores negativos de la señalización de la flagelina a través de la ubiquitinación directa de FLS2 que contribuye a comprender la señalización de la Inmunidad Innata y también interesante para la manipulación genética⁷⁰.

La vía SYM en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ha evolucionado para favorecer la reducción de la respuesta inmune (MTI) y suprimirla. Los rizobios desarrollan sistemas de secreción tipo III (T3SS) y tipo IV (T4SS) que liberan proteínas directamente a la planta y suprimen la inmunidad innata. Las NOPs (Nodulins Outer Proteins), son proteínas quinasas externas de la nodulación, se conocen 3 de ellas que afectan a la vía SYM de forma específica, NopL (activa proteínas de defensa) NopP (cisteína proteasa) y NopT (elicitador de la respuesta de hipersensibilidad)¹¹⁰. La percepción de los factores de nodulación (infección bacteriana y formación del nódulo) por la leguminosa implica la supresión del sistema inmune (respuesta de defensa) por parte del rizobio mediante la vía SYM. Este proceso está mediado por dos reprogramaciones transcripcionales en *Medicago truncatula*, la primera implica la represión de genes relacionados con la defensa, y la segunda, la activación del transcriptoma específico del nódulo que depende de la comunicación entre los socios.

4.5 Transferencia del Sistema Fijador de Nitrógeno

Hace casi un siglo, en 1917 **Burrill y Hansen**¹¹, especulaban que la transferencia de la simbiosis específica de las leguminosas con rizobios fijadores de nitrógeno sería rentable en otros cultivos de interés agrícola. Las leguminosas ocupan el 25-30%, mientras que los cereales representan algo más del 50 % de las tierras de cultivo, por lo que la posibilidad de implantar la fijación de nitrógeno en cultivos de cereales, por procesos de ingeniería genética, aun cuando se considera un proceso extremadamente difícil, es esencial para el desarrollo sostenible y para producir alimentos que satisfagan a la población mundial, que se presume llegara a unos 10 millones de personas en el 2050¹²⁶.

El Dr. **Norman E. Borlaug**, Ingeniero Agrícola por la Universidad de Minnesota (USA) (1914-2009), Premio Nobel de la Paz en 1970 y Doctor Honoris Causa por la Universidad de Granada en abril de 2005, comenta en el discurso que realizó en 1970 en Oslo en la entrega del Nobel aparece el siguiente párrafo “en mis sueños veo campos verdes vigorosos que crecen trigo, maíz, arroz, sorgo, mijo que obtienen sin costo 100 Kg de nitrógeno por hectárea de la formación de nódulos con la bacteria que fija nitrógeno. Es una cepa denominada *Rhizobium cerealis* desarrollada en los años 90 en un programa masivo de mejora por interacciones de especies de rizobios obtenidos de raíces noduladas. Este descubrimiento científico ha revolucionado la producción agrícola para unos cientos de millones de agricultores humildes de todo el mundo, ya que ahora reciben la mayor parte el fertilizante necesario para sus cosechas directamente de los pequeños microbios maravillosos que toman el nitrógeno del aire y lo fijan gratis en las raíces de los cereales, lo cual es transformado en grano”.

También **Arnon** en 1971 predijo que en 10 años se habría desarrollado un método que capacite la fijación de nitrógeno atmosférico, explorando diversas aproximaciones siendo una de ellas la fijación de nitrógeno en

cloroplasto, compartiendo en el tiempo la energía que genera este orgánulo eminentemente aeróbico durante el día con la fijación de CO₂.

Con los avances en la genómica y la metabolómica se disponen de nuevas herramientas, sin precedentes para hacer frente a esta cuestión, por lo que ambicionar la transferencia de la fijación de nitrógeno a otros cultivos es un reto considerado en la actualidad por muchos investigadores, desde diversas posibilidades³⁴.

Los conocimientos que actualmente se tienen en las redes de señalización intracelular que conducen al alojamiento de rizobio en el nicho óptimo para la fijación de nitrógeno, viene condicionada por dos programas sincronizados, la entrada de la bacteria y el desarrollo del órgano especializado en la raíz. Ambos procesos son genéticamente separables el primero de ellos, la entrada de la bacteria vía epidermis dependiente del pelo radical es la asumida por el 75% de las leguminosas, mientras que la vía independiente, más primitiva, a través de una grieta, es un objetivo más realista para la transferencia de este proceso en cereales. Respecto al conocimiento de la infección por rizobio y la organogénesis nodular en leguminosas está avanzado y se asume que ambos procesos están vinculados a la vía SYM¹⁶. Al menos ocho genes (quizás alguno más) de esta vía son comunes con la vía de interacción simbiótica entre hongos del phylum *Glomeromycota* (micorrizas), asociación simbiótica omnipresente en la mayoría de las plantas terrestres, y cinco genes de la vía SYM se encuentran en el arroz (cereal), en *Arabidopsis thaliana* y en otras especies no leguminosas⁴⁰. Además, existen evidencias que los factores de nodulación pueden activar el gen *MtENOD40* que codifica para una nodulina temprana (ENOD40) de *Medicago truncatula* en plantas transgénicas de arroz. La vía SYM presente en arroz y en otras Angiospermas tienen modificados los receptores SYMRK que difieren en el dominio extracelular, lo que sugiere

que las modificaciones en algún componente de la vía de señalización SYM serían necesarias⁷⁴.

La transferencia de la fijación de nitrógeno simbiótica en cultivos de interés agrícola como arroz, maíz y trigo requiere procesos de ingeniería que reflejen los procesos de evolución que sufrieron las leguminosas, puesto que contamos con etapas de la vía SYM presentes en no leguminosas (Actinorrizas y Parasponia), aunque no está totalmente desarrollada en cereales. Además, se encuentran semejanzas entre el proceso de floración y el de nodulación, en el crecimiento del tubo polínico para llegar al óvulo y el desarrollo del cordón de infección hacia el primordio nodular y liberar la bacteria¹¹⁶. Se han encontrado en arroz estructuras denominadas paranódulos invadidas por *Azospirillum* y otras bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre que entran a través de las grietas en la rizodermis radical y se establecen intercelularmente. Existen imprecisiones en el proceso de reconocimiento entre cereales y rizobio, pero existen conocimientos suficientes de este proceso en leguminosas, es decir dianas útiles para comenzar este trabajo¹⁶ y se puede asumir que hay no-leguminosas (cereales) que contestan por redes de comunicación a la llamada de los rizobios.

En este sentido, el grupo del Prof. Gary Stacey, ha comprobado que *Arabidopsis thaliana* y otras no-leguminosas reconoce factores de nodulación a través del mecanismo de suprimir las respuestas de inmunidad innata desencadenada por los llamados MAMPs⁶¹. El mejor estudiado, como se ha comentado, es la flagelina²² bacteriana que junto a la quitina se consideran potentes desencadenadores de la Inmunidad Innata. La quitina es un polímero formado por más de 6 residuos de N-acetilglucosamina. Al estudiar la interacción entre simbiosis y patogenia se detectan que los factores de nodulación (3-5 restos de N-acetilglucosamina) pueden alterar las respuestas de inmunidad, generadas por la flagelina 22 en *Arabidopsis*

thaliana (que reconoce a los factores NOD) suprimiendo la respuesta de inmunidad y permite la colonización de la planta por patógenos como *Pseudomonas syringae*. Similar respuesta se desencadena en soja y en otras especies como tomate (dicotiledónea) y maíz (monocotiledónea), todas ellas con capacidad de reconocer y responder a los factores NOD. Curiosamente *Arabidopsis thaliana* requiere el receptor quinasa LYK3 para el reconocimiento de estos factores que suprimen las respuestas mediadas por flg22 (activación MAPK y producción de ROSs). Los autores postulan que este potencial simbiótico ayudaría a reducir la dependencia de fertilizantes nitrogenados⁶⁰, puesto que el mecanismo de reconocimiento se conserva efectivo en no-leguminosas.

El equipo del Dr. Pakrasi director del I-CARE (Institute Center for Advances Renewable Energy and Sustainability) en Washington, Universidad de San Luis, ha obtenido un proyecto financiado por la National Science Foundation conjuntamente con el Consejo Investigador en Biotecnología y Ciencia Biológicas de UK (proyecto de 387 millones de dólares) encaminado a integrar y/o transferir 30 genes de una cianobacteria (*Cyanothece* 51142) implicados en la fijación de nitrógeno, en el cloroplasto vegetal. De esta cianobacteria se conoce su genoma, tiene un reloj circadiano que permite fijar el nitrógeno por la noche y la fotosíntesis es diurna y se espera transferir este sistema a *Synechocystis* 6803 al genoma vegetal, puesto que esta transferencia por parte de la planta y es posible (Washington University New Release, 22 Agosto 2013). Esta estrategia es muy atractiva para expresar la nitrogenasa sensible al oxígeno y con requerimientos energéticos mediante una compartimentación espacial ó temporal.

Otro avance reciente en este reto, está liderado por un grupo español dirigido por el Dr. Luis Rubio del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) de la Universidad Politécnica de Madrid que en 2012 recibió una

subvención de 3,5 millones de euros de la Fundación Bill y Melinda Gates para desarrollar la fijación de nitrógeno en cereales, encaminada a mejorar la salud de las personas y darles oportunidad de salir por sí mismos del hambre y la pobreza extrema, para aumentar la productividad de agricultores del África subsahariana y Asia meridional y preservar al mismo tiempo el medio ambiente. Este estudio se basa en la transferencia directa de los genes *nif* bacterianos en cereales, se pretende favorecer la transferencia de los genes implicados en el funcionamiento del cofactor de molibdeno responsable de la rotura del triple enlace de N₂ atmosférico. La purificación de todas las proteínas implicadas han permitido reconstruir *in vitro* la biosíntesis del FeMoco, demostrándose que las reacciones catalizadas por los *nif* B, *nif* EN y *nif* H son suficientes para sintetizar el sitio activo de la nitrogenasa, responsable de la rotura del triple enlace¹⁰⁰ lo cual es favorable para la consecución de nuevas plantas fijadoras de nitrógeno mediante la transferencia de este cofactor. Plastidios y mitocondrias son posibles localizadores subcelulares de esta enzima, ambos orgánulos proporcionarían ATP y electrones necesarios para el funcionamiento de la nitrogenasa y podrían incorporar el amonio en aminoácidos, pero difiere en sus niveles de O₂.

También existe transferencia de nitrógeno atmosférico con la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre en cultivos de cereales y hortalizas, práctica de uso común en los años 50. Aunque Okon y Labandera⁸⁵ siempre condicionaron el aumento significativo en el rendimiento del cultivo del 5-30% que se podría lograr mediante la inoculación con *Azospirillum* o *Azotobacter*, vinculado a la producción de fitohormonas. Sin embargo, mediante el método de dilución isotópica de N¹⁵ se demostró que la promoción del crecimiento en arrozales y en cultivos tropicales se debe la fijación biológica de nitrógeno⁹⁹ en vida libre, así como la transferencia de nitrógeno fijado por endófitos a cultivos de caña de

azúcar, arroz y trigo, que pueden crecer con poca adición de fertilizantes nitrogenados y adquirir niveles importantes de $\text{N Ha}^{-1}\text{año}^{-1}$, procedente de esta fijación biológica.

La utilización de inoculantes de cepas de *Bradyrhizobium* autóctonas que suelen ser más competitivas y adaptadas al ambiente, en cultivos de trigo y maíz han conducido a incrementos de cosecha superiores a los obtenidos con la fertilización inorgánica⁷. Todo ello refuerza la idea de que la investigación asociada a la rizosfera podría ser de gran valor para la agricultura sostenible como alternativa.

5.- Importancia de las leguminosas

En el 68º periodo de sesiones, la Asamblea General de la ONU proclamó el año **2016 Año Internacional de las Legumbres**, asignándose a la FAO que facilite la celebración de este evento en colaboración con gobiernos, organizaciones públicas y/o privadas y demás instancias pertinentes. Con esta celebración se propone sensibilizar a la opinión pública sobre las ventajas nutricionales como parte de una producción de alimentos sostenibles y de una dieta saludable.

Durante las tres últimas décadas el grupo de investigación que dirijo se ha centrado en este cultivo que muy especial y singular. Las leguminosas constituyen una de las familias botánicas más grandes de plantas con flores con más de 18.000 especies y 650 géneros. Los cultivos de leguminosas se consideran el tercer grupo más grande de las angiospermas y el segundo grupo en la producción de alimentos a escala mundial. Se cultivan en regiones tan dispares como el Sur de Asia, África Central y el Magreb, América Central y del Sur y el toda el área Mediterránea¹¹².

Se evidencia que las leguminosas han sido componentes integrados en la dieta humana de todos los continentes durante los diez mil años pasados, por

lo que han representado una fuente importante de alimento para la población humana y la ganadería, en una gran parte de regiones y civilizaciones. Se han encontrado semillas de leguminosas en depósitos arqueológicos (en ocasiones contrastadas por ADN¹¹²), en escrituras mitológicas de la antigüedad, en jeroglíficos egipcios, en textos sumerios y en diversas escrituras religiosas.

En el siglo XIV el juglar castellano-árabe Juan Ruiz, el arcipreste por antonomasia, en la “Pelea de Don Carnal con Dña. Cuaresma” tras haber vencido en singular combate a Don Carnal, envía un fraile para convertirlo y con la penitencia le dispone como parte del alimento al penitente Don Carnal la obligación de comer cuatro días a la semana garbanzos, arvejas, lentejas y habas: “el día del domingo por tu codicia mortal, comerás garbanzos, irás a la iglesia, que no veas el mundo ni codicies el mal. En el día de lunes, por tu soberbia mucha comerás de las arvejas más no salmón y trucha. Espinacas los miércoles y gachas (en lo cual entraba en altramuz/almortas) Los jueves comerás, por tu mortal ira y porque perjuraste diciendo mentiras lentejas con la sal, en rezar te redima. Come el día del sábado las habas y no más, por tu envidia mucha, pescado no comerás tu alma pecadora así la salvarás”, si bien también prescribe el ayuno riguroso el viernes. Cabe pensar que la dieta del penitente correspondía, a los no privilegiados de la época que hacían penitencia obligada los más de sus días, a una dieta de garbanzos, lentejas, guisantes, habas que se consideraría la carne del pobre.

Algunas de las cosechas más valiosas en alimentación como guisante, judía, cacahuete, frijol, haba, garbanzo, soja, altramuz, y como pastos y forraje trébol, lotus, y alfalfa, todos ellos son cultivos con alto contenido proteico, almidón y lípidos.

Las leguminosas han demostrado su eficacia en el proceso de **fitorremediación**, *Medicago sativa* (alfalfa) se está utilizando tanto en

monocultivo o con gramíneas el raygrass (*Lolium perenne*) ó festuca (*Festuca armidinacea*) en la fitoextracción⁷¹ y fitodegradación¹⁰⁴ de compuestos orgánicos contaminantes de origen industrial. También se las considera futura fuente de **biocarburantes** sostenibles debido al alto contenido de aceites en algunas semillas y de resinas⁵⁰. Son productoras de taninos **libres y condensados (TC)** que se encuentran en numerosas forrajeras cuyo **interés** radica en sus propiedades como antihelmínticos potenciales, formando parte de las defensas químicas del pastoreo por herbívoros. Se incluyen las leguminosas en sistemas en los cuales el nitrógeno es limitante como en **acuicultura**, aunque la base de la dieta de peces son lípidos, se requiere proteína energética y en la actual acuicultura intensiva se utilizan extractos proteicos ricos en aminoácidos azufrados de soja y/o altramuz. Incluso en la producción de **piensos de animales**, que habitualmente han utilizado residuos (harina de huesos) para proporcionar proteína a los piensos, esta práctica ha debido de ser abandonada debido a la encefalopatía esponjiforme bovina⁴⁶.

Señalar que las leguminosas son ricas en la producción de colorantes, perfumes, insecticidas, entre otras moléculas. De hecho sintetizan numerosos metabolitos muy diversos frecuentemente poco comunes a lo largo de su ciclo de vida. **Michael Pollan**⁹⁵ en su “Botany of Desiré” refiriéndose a las plantas (terrestres y marinas) comenta: “Mientras nosotros los animales, estábamos ocupados inventando cosas como la locomoción y la conciencia, las plantas adquirieron toda una serie de poderes extraordinarios y a veces diabólicos” al describir como las plantas logran sintetizar moléculas tremendamente complejas y en ocasiones difíciles de igualar por procesos químicos o biotecnológicos y a esas moléculas los fisiólogos vegetales las hemos denominado **metabolitos secundarios**.

La identificación de estos compuestos ha estado limitada durante mucho tiempo por las técnicas o sistemas de detección existentes debido en parte

por la complejidad y diversidad de la estructura química de estos metabolitos secundarios. En la actualidad, con los avances de la biotecnología vegetal mediante técnicas analíticas, químicas y físicas, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la espectroscopia de masas (MALDI-TOF) y la resonancia magnética nuclear (NMR) entre otras, y las genéticas, se han identificado compuestos que aumentan el valor de las leguminosas en la dieta humana.

En Europa y Estados Unidos hay una tendencia generalizada en consumir productos naturales, los llamados **alimentos nutraceuticos**, que pueden proceder de las plantas con flores, incluso muchos productos farmacéuticos prescritos proceden de vegetales, algunos de ellos leguminosas, y actualmente representan algo más del 25% de estos productos y se espera que aumente en los próximos años, debido a la referencia de muchos consumidores que desean medicamentos naturales frente a los sintéticos.

Así, los brotes de alfalfa (*Medicago sativa*) y soja (*Glycine max*) son fuentes de fitoestrógenos que reducen la osteoporosis. Dentro de los fitoestrógenos están los isoflavonoides, en los que se incluyen genisteína, clidzeína y equol, abundante en especies de la subfamilia *Fabaceae* como el trébol rojo (*Trifolium pratense*). También, el consumo de alimentos a base de soja condiciona un aumento de la concentración de fitoestrógenos que son sustitutivos en la **Terapia de Reemplazo Hormonal (HRT)** para desordenes de la menopausia, mantener la salud de los huesos y evita el cáncer de mama evidenciándose una incidencia menor de cáncer de próstata comparando hombres asiáticos con europeos y/o americanos⁴⁶. *Arachis hipogea* (cacahuete) contienen un polifenol, el resveratrol (trans 3,5, 4-trihidroxiestilbeno), con un futuro prometedor en enfermedades vasculares y pulmonares y con el logro de una vejez saludable⁴². En la medicina china se usan especies como *Glycyrrhina glabra* (regalíz) es una leguminosa cuyas raíces tienen agentes antiinflamatorios y antiúlceras, *Clitoria ternatea* y

Lablab purpureans son portadoras de proteínas antifúngicas la primera y con propiedades antihipertensivas la segunda. El rizoma de *Eriosema kraussianum* (Fabaceas) contiene determinados pirano-isoflavonas que favorece el flujo sanguíneo⁴⁶. El **Dr. Akerele**², perteneciente a la OMS aboga por “Salva las Plantas que Salvan Vidas”.

5.1 Genética y biotecnología de leguminosas

Los enfoques fisiológicos y bioquímicos que dominaron las primeras investigaciones de la fijación de nitrógeno, se complementaron con la revolución de la biología molecular y la genética bacteriana en los años 80 y 90, y culmina con la revolución genómica de plantas que comenzó alrededor del cambio de siglo. En la actualidad se conoce la secuencia completa del genoma de diversas especies de rizobios (ya comentado) y de diversas leguminosas. Entre ellas, las consideradas leguminosas modelo *Medicago truncatula*¹²⁹ y *Lotus japonicus*¹⁰³ básicas en la investigación de genes y moléculas involucrados en el proceso de nodulación. Estas leguminosas se caracterizan por tener un genoma diploide de pequeño tamaño (*Lotus japonicus* 472 MPB y *Medicago truncatula* 500-550 MPB) con facilidad de transformación por *Agrobacterium*, tiempo de generación corto, contiene la información acerca de la historia evolutiva a lo largo de aproximadamente 54 millones de años (MYA) desde ancestros comunes¹⁵ y facilidad en la obtención de mutantes que ayudan en la identificación génica, mediante secuencias de inserción de ADN específico con el uso de otras técnicas.

La evolución del genoma de *Medicago truncatula* experimenta un nivel alto de reagrupamiento como en otras secuencias de leguminosas, *Glycine max* y *Lotus japonicus*, lo que ha podido contribuir a elaborar una capacidad preexistente para la nodulación. En todos ellos se ha podido evidenciar en su evolución la duplicación de todo el genoma (WGD). Se ha establecido sintenia entre muchas leguminosas, en particular entre las especies de climas cálidos (frijol, judía, soja) y de climas templados (garbanzo, guisante, haba,

lenteja, trébol alfalfa). La conservación de la colinealidad de los genes y la sintenia, indican que la información del genoma de *Lotus japonicus* podría servir en la transferencia para la mejora de cultivos¹³⁰.

Más allá de las dos leguminosas de referencia, el análisis del genoma de otras leguminosas de interés agrícola se están realizando con rapidez, debido a que los costes de secuenciación se han reducido. Se dispone de la secuencia del genoma de *Glycine max*, de interés en la alimentación animal y humana, que también se sometió al evento de la duplicación (WGD) de todo el genoma en los últimos 13 millones de años y es aproximadamente dos veces el tamaño del de *Medicago truncatula*, aun cuando el número de genes de ambos genomas son similares¹⁰⁷. Se conoce el genoma de *Cicer arietium* (garbanzo), el segundo cultivo de mayor implantación después de la soja, que representa una parte sustancial en la ingesta de nitrógeno proteico en la dieta humana¹²². El genoma de *Arachis hipogea* (cacahuete)⁹⁶, y el de *Cajanus cajan* (frijol)¹²¹, estando avanzado el genoma de *Phaseolus vulgaris* (judía), *Lupinus angustifolium* (altramuz), *Medicago sativa* (alfalfa) y *Pisum sativa* (guisante). Esta secuenciación de genomas de leguminosas mediante tecnologías de tercera generación, es válida en estudios comparativos de secuencias de genomas entre ecotipos y/o cultivares que ayudan a identificar las estrategias duraderas que necesitan ser desarrolladas y que intervienen en la ingeniería intrínseca de las leguminosas en la elección de sus compañeros²⁵.

5.2 Leguminosas en el sistema agrícola

Las leguminosas herbáceas y leñosas han sido utilizadas: a) en pastos y forrajes, b) en la protección del suelo frente a la erosión y la desertificación y c) en la reposición y conservación de la materia orgánica como pienso conservado, ó como **Abono Verde**, término, que había sido registrado por el escritor chino **Tsi (1.100 aC)** puesto que nos dejó constancia de la conveniencia de utilizar “*abono verde distribuido en el quinto o sexto mes y*

arado en el séptimo y octavo mes, tan bueno como el excremento del gusano de seda o el estiércol bien podrido". Por lo que el abono verde es considerado materia orgánica que se mantiene incorporada en la llamada agricultura ecológica del suelo, al ser enterrado superficialmente en un cultivo. Con ello se consigue mejorar la estructura y agregación del suelo, estimular la microbiota y el bioma del suelo (set de microorganismos, incluyendo nematodos y protistas) así como la calidad (fertilidad) del mismo.

El uso en agricultura de las leguminosas en la **Rotación de Cultivos**, casi siempre con cereales, también pertenece a la agricultura prehistórica, este hecho se evidenció mucho antes que la ciencia entendiera el papel de los microorganismos; ya **Plinio el Viejo**, naturista y caballero romano, recogía la recomendación de cultivar lupinus (altramuz) que revigorizaban la producción de cereales. La eficacia reside en el beneficio (mayor rendimiento) de otro cultivo (cereal) en relación al monocultivo, producido por la transferencia del nitrógeno fijado por la leguminosas en un proceso dinámico que se hizo extensiva allá donde hubo hombres que cultivaran la tierra. Cereales y leguminosas fueron siempre de la mano, o incluso estrechamente abrazados como la judía de tallo rastrero con el maíz, recordado por las leyendas de antiguos americanos, en los llamados intercultivos de leguminosa/cereal³⁸.

La rotación ejerce efecto sobre **a)** la reserva de nitrógeno en el suelo procedente el residuo del cultivo y del fijado biológicamente, **b)** mayor eficiencia en el uso del agua, **c)** restringe potencialmente la lixiviación del nitrato a las aguas subterráneas, **d)** puede ser beneficioso para evitar parásitos y enfermedades **e)** reduce la relación C/N del suelo que favorece la disponibilidad de nutrientes (se reconoce una mayor disponibilidad del fósforo, calcio y micronutrientes), **f)** promueven la estabilidad del suelo, debido a una mayor actividad de las hifas de hongos y bacterias que

permiten que el crecimiento de raíces sean más profundo y mejor aireación
g) enriquecimiento de la calidad del forrajes y pastizales⁹³.

Ya en el siglo XX el uso de la rotación de cultivos disminuye con el advenimiento de la agricultura química en la dependencia de los inputs adquiridos, donde la producción animal implicada es escasa, la mecanización, el procesamiento y transporte de los productos agrícolas, la autosuficiencia y diversificación de cultivos fue reemplazada en muchas regiones y se potenciaron los monocultivos; en consecuencia la utilización de leguminosas en rotación decreció considerablemente.

6. Evolución de la agricultura y su futuro

La agricultura experimentó un avance espectacular a mediados del siglo XX gracias a la introducción de los fertilizantes químicos y pesticidas, que ayudó a aumentar las cosechas y la producción de variedades de trigo enano considerados de alto rendimiento (HYVs) desarrollados en los años 60 por Dr. Norman Borlaug. El trabajo del Dr. Borlaug en el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y del Trigo (CIMMYT) en Méjico y Filipinas, **se fundamentó en demostrar a los agricultores los beneficios que obtiene la agricultura, basados en lo que la ciencia puede producir.**

La llegada de estas variedades de alto rendimiento fue conjunta al concepto denominado **“Revolución Verde”** (la segunda revolución verde si se considera como primera la del neolítico), término que fue acuñado en 1968 por el Dr. William Gaud, Director de la Agencia para el Desarrollo Internacional, en Estados Unidos, para referirse a ese incremento sorprendente y repentino de la producción de trigo y arroz que ocurrió en países en vía de desarrollo (Asia y Sud-América) a mediados del decenio de 1980 promovidos por el Dr. Borlaug. La productividad de las cosechas llegó a quintuplicarse y este incremento espectacular tuvo mucho que ver con que

no se cumplieran las aterradoras predicciones de desnutrición y extensas hambrunas en muchas naciones del tercer mundo, resultados que fueron cruciales para derrotar en principio la maldición malthusiana. Recordemos las palabras del **Presidente del Senegal Léopold Sédar Senghor** entre 1960-1980 “Los derechos del hombre empiezan con el desayuno”.

Esta **agricultura intensiva** dependiente de la adición masiva de fertilizante (nitrogenado y fosforado) y del uso de pesticidas considerados los pilares de la revolución verde, incrementó de forma espectacular entre 1960-1980 y permitió a los agricultores transformar tierras estériles en campos de labor y repetir e incrementar cosechas en el mismo suelo, de hecho, nunca antes de la historia humana tuvo la población global un suministro tan sustancial de alimento. No en vano el Dr. Borlaug ya sentencio, que el fertilizante químico es el combustible que ha impulsado hacia adelante la Revolución Verde.

Los cultivos agrícolas proporcionaron en su inicio biomasa, fibra, madera y alimentos que favorecieron la capacidad de subsistencia, pero cuando se aumentó la presión sobre el sistema agrario, debido a la necesidad de alimentar una población creciente a la prosperidad de la civilización, se produjo una alarmante reducción de la fertilidad del suelo. La deforestación para obtener superficie arable, el uso de monocultivos frente a la diversificación de cosechas y el agotamiento por la pérdida de materia orgánica puesto no permitió que se produjeran la regeneración natural de nutrientes. Recientemente oí unas palabras del Papa Francisco que decía: **“Dios perdona siempre, el hombre a veces, la naturaleza nunca”**.

Esta Revolución Verde fue demasiado optimista, puesto que otros cereales como el sorgo, cebada y mijo y leguminosas, todos ellos esenciales en la dieta de la población mundial, no tuvieron aumentos apreciables en la producción. Incluso las variedades de alto rendimiento requieren más fertilizantes y eran más propensas a parásitos y enfermedades. De hecho,

algunos críticos comentaron que esta revolución verde había condicionado renuncias como la eliminación del enterramiento de las leguminosas forrajeras (abono verde), devolver abonos de origen animal para la recuperación de la fertilidad del suelo, la estimulación del monocultivo evitaba la rotación, aspectos todos ellos encaminados a abandonar el funcionamiento de reciclaje autónomo para la nutrición de nuevas cosechas, favoreciendo la pérdida continuada de materia orgánica y la capacidad de mantener poblaciones microbianas³⁶.

Una perspectiva importante que ha dado forma a nuestro pensamiento actual acerca de sostenibilidad fue sugerido en un informe sobre nuestro futuro común de la Comisión Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo¹²³, al definir el **concepto de sostenibilidad** como un modo de agricultura que debería imitar a ecosistemas naturales, y que a largo plazo, realce la calidad ambiental, aproveche al máximo el empleo eficiente de recursos no renovables, integre los procesos biológicos naturales, que gestione el agua y la conservación del suelo, evitando la erosión mediante un cultivo con laboreo mínimo y sostenga la viabilidad económica para asegurar las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones de encontrar sus propias necesidades. En términos simples la humanidad tiene la capacidad y el deber de dejar este mundo en mejores condiciones de la forma en la que nos lo encontramos.

Los principios claves de la sostenibilidad se centran en: **a)** la interacción de procesos biológicos y ecológicos como, el ciclado de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la regeneración de suelos, la alelopatía, la competitividad, la depredación y el parasitismo, con los procesos conducentes a la producción de alimentos, **b)** reducir al mínimo el empleo de energías no renovables que causan daño al entorno o a la salud de agricultores y consumidores, **c)** hacer productivo el uso del conocimiento y habilidades del agricultor mejorando su independencia, sustituir el capital humano por costes externos, **d)**

constituir colectivos que trabajen juntos en solucionar y gestionar los recursos naturales.

La agricultura sostenible constituyó un cambio multifuncional del medio agrícola, que no sólo proporcionó comodidad sino también perseveró la salud de los ecosistemas y de las comunidades rurales, así como la sostenibilidad del empleo de la energía, fabricación, transporte y otros sectores económicos que también tienen impactos ambientales significativos⁸³

En las últimas décadas del siglo XIX diferentes enfoques filosóficos a la gestión de la agricultura y las nuevas técnicas agronómicas se han propuesto y aplicado con el fin de satisfacer la demanda de una agricultura más sostenible. En esa variedad de enfoques encaminados a discernir entre **Agricultura intensiva**, ya comentada, que busca la productividad en poco espacio, propia de países industrializados y con gran repercusión en calentamiento global por los elevados insumos *versus* **Agricultura extensiva**, que depende de mayor superficie, son menos productivas, resuelve problemas que la agricultura intensiva provocan y los ecosistemas la agradecen³⁰.

Aparece el concepto de **Agroecología** que es el estudio holístico e integral de los ecosistemas agrícolas, es decir, comunidades de plantas y animales interaccionando con su entorno físico y químico, que ha sido modificado por el agricultor para producir fibras, alimentos, combustibles y otros productos para el consumo humano y más recientemente, en este concepto se integra también el sistema alimentario³.

Otro enfoque es la denominada **Agricultura integrada** en la que se combina el manejo de la agricultura convencional y ecológica, como usar el estiércol animal en lugar de fertilizantes cuando sea posible, el manejo integrado de la gestión de plagas combinando varios métodos: rotación de

cultivos, liberación de parasitoides, cultivando variedades resistentes a plagas o el uso de diversas técnicas físicas, dejando a los pesticidas como último recurso. La agricultura integrada no se rige por una normativa específica, pero su objetivo sigue siendo reducir en la medida de lo posible los costes de gestión agraria y su impacto ambiental con miras a la sostenibilidad a largo plazo de las prácticas agrícolas³⁶.

Una propuesta diferente para mantener la sostenibilidad agrícola es la llamada **Agricultura orgánica**, regulada por leyes y con una normativa muy estricta, en la cual específicamente se prohíbe el uso de agroquímicos y el de organismos modificados. Este movimiento surgió en los años 20 en Europa y posteriormente fue aceptado por EEUU, en representación de los agricultores y ciudadanos que rechazan el uso de agroquímicos y desean perseverar las prácticas agrícolas tradicionales²¹. Este movimiento tiene representación internacional en la llamada Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM) reconocida por la Unión Europea (EU) en 1991 actualmente tiene su sede en Bonn (Alemania). Se define la Agricultura Orgánica como *“un sistema de producción que mantiene la salud de los suelos, los ecosistemas y las personas. Se basa en los procesos ecológicos, la biodiversidad y los ciclos adaptados a las condiciones locales, más que el uso de insumos con efectos adversos. La agricultura orgánica combina tradición, innovación y ciencia para beneficiar al ambiente compartido y promover relaciones justas y una buena calidad de vida para todos los involucrados”*.

En el *Codex Alimentarius*¹⁹ desarrollado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobó en el punto 5 de dicho Codex que la agricultura orgánica es una entre el amplio espectro de metodologías que apoyan el medio ambiente. Los sistemas de producción orgánica están basados en normas específicas y precisas de producción cuyo objetivo es

lograr agrosistemas óptimos que sean social, ecológica y económicamente sostenibles.

El National Research Council⁸³ sostiene que: para perseguir cambio sistémicos en los sistemas agrícolas, la investigación y el desarrollo tienen que hacer frente a múltiples dimensiones de la sostenibilidad, explorar propiedades del agrosistema y aumentar la confianza/seguridad en los procesos ecológicos que puedan conducir a que los sistemas sean más resilientes en el tiempo.

Durante las próximas décadas, se espera que la población mundial aumente 8.3 mil millones de personas para el 2030 y 10 mil millones para el 2050 necesitando para ese año un 70-100% de alimento más del que ahora se produce, teniendo en cuenta que se estima que en 2010 ya existían en el mundo un total de 925 millones de personas desnutridas²⁸. En el discurso de Dr. Norman Borlaug en Oslo (1970), ya aviso que “la Revolución Verde había ganado temporalmente la guerra contra el hambre y su funcionamiento proporcionaría alimentos suficiente para el sustento durante las tres próximas décadas, pero que el poder espantoso de la reproducción humana debe ser contenido, de otra manera éxito de la Revolución Verde sería efímero”.

Actualmente todavía existen eruditos escépticos, los neomalthusianos, que siguen considerando el crecimiento de la población desproporcionado con la producción de alimentos, principio que el Reverendo Thomas Robert **Malthus**, describió hace casi dos siglos en 1846⁷³, en su libro “Ensayo sobre el Principio de la Población y sus Efectos”, en él argumentaba que el aumento de la población humana debe de variar en función de la disponibilidad de alimentos. Esta doctrina liderada por los neomalthusianos ha llegado hasta nuestros días como el informe sobre los límites crecimiento encargado por el Club de Roma, o la llamada “capacidad de carga” referida al límite de la sostenibilidad de la producción creada por el Prof. Joel E.

Cohen²⁰, de la Universidad de Rockefeller (USA). No obstante, las críticas a la teoría de Malthus están refutadas por economistas y sociólogos, asumiendo que la productividad y la capacidad agrícola y alimentaria ha aumentado. **Giovanni Sartori** (Premio Príncipe de Asturias de las Ciencias Sociales, en 2005) en su libro “La tierra explota”¹⁰⁵ señala: “Todos saben que el planeta es finito; y por eso no puede sostener a una población en crecimiento infinito, y la no sostenibilidad de nuestro llamado desarrollo ya es un hecho más que cierto”. Sin duda, el futuro el mundo depende de la productividad agrícola adecuada para lograr las necesidades humanas, por lo que en la actualidad Malthus aún no ha sido totalmente derrotado en relación a las necesidades humanas frente a los techos de los agrosistemas⁹⁸. Un mérito singular de Malthus (1766-1834) en las circunstancias actuales reside en que fue el primero en plantear el conflicto entre crecimiento de población y producción de alimentos que actualmente se considera un problema crucial.

Este nuevo desafío nos lleva a explorar las grandes ventajas de la genética, la biología molecular y la biotecnología, para ayudar a encontrar las necesidades de alimento y fibra. La historia indica que las modificaciones genéticas en vegetales comenzaron mucho antes que el hombre comenzara a cambiar las cosechas por selección, como la naturaleza lo hizo y lo hizo a lo grande. Ya en el neolítico, se domesticó prácticamente los cultivos encaminados a la producción de alimentos así como las especies ganaderas, y las generaciones posteriores han sido responsables de las enormes modificaciones genéticas y agronómicas asumidas en las cosechas más productivas. Parafraseando a **Moliere**, hace diez milenios que la humanidad ha hecho genética, sin saber que ha hecho tecnología, antes que ciencia.

Vere Gordon Childe³⁹, arqueólogo australiano especialista en prehistoria, miembro de la British Academy acuñó el término “**revolución del neolítico**” con el paso del régimen humano de vida de cazador a recolector

agrícola, en la cual se siembran granos de una planta silvestre por lo que se la considera planta cultivada, que se recolecta cuando se completa el ciclo siembra-maduración. En el paso de silvestre a cultivada sufrió un fuerte proceso de selección que se denominó **domesticación** (sinónimo de lo que hoy denominamos seleccionada/mejorada por bloqueo de genes).

El trabajo preliminar en la mejora genética sofisticada fue iniciada por Charles **Darwin**, en su obra fundamental “El origen de las especies por medio de la selección natural”²³ publicada en 1859, estableció que la diversidad que se observa en la naturaleza se debe a las modificaciones acumuladas por la evolución a lo largo de sucesivas generaciones mediante un proceso denominado selección natural. **Gregor Mendel**, monje agustino naturista y descubridor de la herencia genética, publicó en 1865 “Experimentos sobre la Hibridación de Plantas”⁷⁷ tipificando las características fenotípicas (apariencia externa) que los denominó caracteres y que actualmente después de haber recibido infinidad de nombres se conocen como genes y los genes responsables de un fenotipo particular, alelos. Mendel jugó sin saberlo con ADN de guisante liso/rugoso, verde/amarillo, alto/bajo...

En el siglo XIX, la mejora de las cosechas estaba en manos de los agricultores y la producción de alimentos creció en parte a la ampliación de la tierra cultivable. Ya en el siglo XX se inicia la mejora convencional con la aparición de **mutantes espontáneos**, llamada variabilidad natural, así como un gran número de variedades e híbridos con mayor productividad, ahorrando extensiones de suelo, facilitando estabilidad en las cosechas, controlando el riego, los parásitos y la fertilización y así fue como surgieron cultivos que no existían hace cien años como la coliflor, el pomelo rosa y los trigos panaderos.

En la segunda mitad del siglo pasado (años 60), los científicos modificaron los genomas de algunas plantas y produjeron nuevos cultivos mediante

diversas técnicas como la **mutagénesis del ADN** con radiación o productos químicos, la **hibridación interespecífica** que permite la combinación de caracteres favorables de diferentes especies la cual favoreció la aparición, en los últimos años, de más de 2.700 nuevas variedades de trigo, cacahuets, peras, arroz entre otros cultivos o mediante la **selección asistida por marcadores moleculares**, técnicas todas ellas costosas y sofisticadas³³. Estas se consideran sistemas de transformación de plantas que nunca fueron objetados por el público incluidos ecologistas y que no causaron daños, ni problemas de salud. También se utilizaron biotecnologías de nivel bajo como el uso de biofertilizantes, cultivo de tejidos en arboles forestales, transferencia de embriones en ganadería, inversión de sexo en peces, biorreactores en la elaboración de alimentos.

En la actualidad, gracias al desarrollo de la ciencia, podemos mediante la genética y la mejora de plantas, planificar y lograr objetivos concretos, que la Madre Naturaleza hizo en el pasado, pensamos que por casualidad. Los cambios que se producen tendrán efectos comparables a la revolución industrial y con la revolución basada en computadoras y redes sociales. La mayoría de los científicos agrícolas y los propios agricultores están en la línea de estimular las grandes ventajas de la biotecnología, mediante la adopción comercial de cosechas modificadas genéticamente (transgénicas), que ha sido considerada como la tecnología de difusión y aceptación más rápida en la historia de la agricultura.

El **Dr. Sanjaya Rajaram** Premio Mundial de los Alimentos 2014 (Premio creado en 1986 por el Dr. Norman Borlaug), firme defensor de la biotecnología agraria, al recoger el premio afirmó que “los problemas del futuro no se pueden resolver si no aplicamos la ciencia, la tecnología y el conocimiento” y consideró el premio como un reconocimiento a la capacidad de resistencia y espíritu renovador de los agricultores del mundo para el desarrollo de los sistemas agrícolas (Fundación Antama 27/10/2014).

La ingeniería genética no es un reemplazo de la mejora convencional, sino más bien, es un instrumento de investigación complementaria para identificar genes deseables de grupos remotamente relacionados taxonómicamente y transferir estos genes de forma rápida y con precisión, a variedades de cosechas de alta productividad y calidad, el **Prof. Dr. Francisco García Olmedo**, miembro de la Real Academia de Ingeniería destaca la posibilidad que ofrecen los alimentos procedentes de transgénicos en países desfavorecidos, teniendo en cuenta la necesidad de aumentar la producción de alimentos en un 70-100% para el 2050³³.

Los cultivos modificados genéticamente fueron sembrados por primera vez en 1994 (tomates) y se comercializaron en 1996. Entre 1996 y 1999 aumentó el área de cosechas transgénicas comerciales de 1.7 a 148 millones de Ha. Su implantación logró un notable éxito en términos económicos y ambientales, y en la actualidad las hectáreas de estos cultivos siguen creciendo, de hecho, 18 millones de agricultores de 28 países sembraron más de 181 millones de hectáreas (Mha) en 2014, así lo expuso el Presidente del Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA) Clive James⁴⁹. El primer productor de cultivos transgénicos es EEUU con 73 Mha, seguido de Brasil (42 Mha) y Argentina (24 Mha), encontrando a España (0,1 Mha) en el puesto 17⁴⁹.

Aún cuando la revolución de las transgénicas se inició en Estados Unidos, fue el genetista belga el **Prof. Dr. Marc van Montagu** (Universidad de Gantes) responsable de la creación de la primera transgénica y uno de los que lograron el Premio Mundial de la Alimentación en 2013. El Profesor Montagu y sus colaboradores fueron los que contribuyeron de forma espectacular a la investigación que subyace en la transformación y la adopción de transgénicos que en la actualidad, en soja es del 95 % y en maíz del 75 %¹²⁰. El Profesor Montagu afirma sobre los posibles riesgos, “que usar este tipo de argumento es erróneo, ya que los genes que se introducen

son los mismos que existen en la naturaleza y hacemos los mismos tipos de cruzamientos que existen en la naturaleza”, además la considera una tecnología “inofensiva” y es la solución del futuro para los retos a los que se enfrenta la producción de alimento para una población creciente.

En los últimos 20-25 años, la biotecnología ha desarrollado mediante nuevas metodologías las variedades transgénicas e híbridas de diversos cultivos como algodón, tabaco, maíz, patata, soja, *Brassica napus* (canola, semilla oleaginosa), remolacha azucarera, berenjena, papaya, arroz, trigo, girasol, fresa, tomate, melón y eucalipto, que con eficacia, controlan enfermedades virales y fúngicas, reducen la necesidad de insecticidas y herbicidas e incluso, se han desarrollado variedades tolerantes a la toxicidad por hierro, al aluminio libre soluble, a la alcalinidad y muchas de ellas resistentes a la sequía⁴⁹.

Los primeros cultivos transgénicos establecidos solo beneficiaban a los agricultores, que le otorgaban grandes ventajas económicas al reducir costos en estos cultivos modificados (GM), resistentes a insectos (IR) y tolerantes a herbicidas (HT), siendo cultivos de gran implantación mundial, por lo que la segunda generación de estos cultivos están encaminados a beneficiar a los consumidores, por ello los rasgos principales de destino son rasgos más deseables por los consumidores que les proporcionen mejoras adicionales para la salud¹¹⁶.

Los cultivos transgénicos de segunda generación actuales incluyen una mayor proporción de micronutrientes, vitamina A, β -caroteno, hierro, ácido fólico y ascórbico, composición de ácidos grasos (oleico y omega-3) y ácido araquidónico (omega-6) abundante en semillas de canola y antioxidantes (antocianina). Uno de estos cultivos transgénicos, el llamado arroz dorado (modificado genéticamente por el Peter Beyer e Ingo Potrykus en 2000, Science 287:303), de gran implantación y consumo en el Sureste asiático, fue lanzado en el año 2005 con alto contenido en β -caroteno que previene la

ceguera. Hay dos variedades transgénicas de soja y canola, con un nivel alto de ácido oléico y con ácidos grasos omega-3, que son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (VLC-PUFAs), como EPA (ácido eicosapentaenoico) y el DHA (ácido docosahédrico) de interés en la alimentación humana^{101,92}. Las variedades de soja modificada con ácidos grasos omega-3 por Monsanto (<http://www.soymega.com>) serán próximamente comercializadas e incluidas para la exportación. En los cultivos de la próxima (tercera) generación de transgénicos, se pretenden prevenir y reducir riesgos en enfermedades crónicas como la obesidad, artritis, enfermedades del corazón, diabetes y cáncer.

Es importante tener en cuenta que todos los cultivos transgénicos han pasado en todos los países, el escrutinio de certificación, aportando numerosas tablas y datos procedentes de ensayos de campo ó datos que analizan sus efectos sobre la salud (como las pruebas alérgicas) y otros aspectos regulados por normativas estrictas, complejas, rigurosas y con numerosas y costosas pruebas para la validación, todo ello encaminado a su aprobación y comercialización, garantizando la seguridad en los alimentos y preservando el medio ambiente. Incluso en muchos países tienen la obligación del etiquetado (no contienen “Organismos Modificados Genéticamente”, OMGs o “libre de transgénicos”) al igual que en algunos alimentos están etiquetados como “Kosher”, “libre de gluten”, “libre de lactosa”¹⁷. La normativa obliga a las empresas a etiquetar y señalar aquellos consumibles que tengan en su composición de más de un 0.9% de productos procedentes de organismos modificados genéticamente (OMGs). Se consideran por tanto los alimentos más evaluados y controlados en la historia de la humanidad.

No obstante, hay alimentos empaquetados como refrescos, chocolates, aceites, margarina, galletas, pasteles, pan, pastas, productos infantiles, salsas congeladas, alimentos preparados, en los cuales el almidón de maíz, la

proteína de soja y el aceite de canola, entre otros componentes, se utilizan por lo que un porcentaje elevado más de un 70% de estos artículos contienen ingredientes procedentes de cultivos modificados¹⁷.

Europa necesita cultivar transgénicos, sin embargo la normativa de la regulación y utilización de OMGs en alimentos y piensos en la Unión Europea es conocida y notoria por ser la más estricta y restrictiva del mundo. El proceso de aprobación de la seguridad de los OMGs es lento, sujeto a intensas interferencias políticas, duran años y cuestan millones de euros, por lo que los agricultores de la UE se les discrimina activamente a aquellos que deseen cultivar transgénicos, aun cuando ocurre que exactamente los mismos cultivos son aprobados para su importación, de hecho Europa depende de la importación de soja para alimentación animal procedente de Argentina y Estados Unidos y esta soja que importamos es transgénica⁷⁶. No obstante es interesante señalar que 130 proyectos de investigación financiados por la Comunidad Europea en la última década, están relacionados con cultivos modificados genéticamente, en los que han participado 500 equipos diferentes, en ninguno de estos proyectos en los ensayos de campo realizados se han encontrado riesgos mayores que en el crecimiento de un cultivo convencional, ni impacto ambiental negativo¹²⁴

Dentro de la Unión Europea, los distintos países han sido reacios a aprobar los cultivos transgénicos, actualmente se cultivan en cinco países (recientemente prohibidos en Francia y Polonia), siendo la tasa de maíz transgénico en España la más alta de toda Europa puesto que somos importadores de grano para alimento de ganado⁴⁹. La siembra continuada de maíz modificado genéticamente (desde hace 18 años) alcanzando el record de siembra 132.000 Ha, siendo Aragón la comunidad autónoma con mayor superficie sembrada, seguida de Cataluña y Extremadura según datos del Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) (<http://goo.gl/UCFcnp>).

En Europa están autorizando el cultivo de maíz y de patata Amflora, ambos destinados no al consumo humano sino a usos industriales (patata) y a piensos (maíz). Los científicos auguran que de seguir la trayectoria actual, la UE se enfrenta a quedarse por detrás del mundo en tecnología, economía y políticas humanitarias. Gómez-Galera et al³⁵ proponen estrategias que la UE podría adoptar en la normativa, la implicación de las autoridades competentes a nivel nacional y regional para aumentar la eficacia de la regulación sin cargar a los agricultores con más burocracia innecesaria. Marc van Montagu critica las reticencias europeas a la apuesta firme por los cultivos transgénicos y afirma que el rechazo europeo es “puramente emocional” ya que no hay un solo argumento válido contra esta tecnología. “Quince años después de que se cultivara la primera planta biotecnológica en Europa nadie puede aportar un peligro de las OMGs para la salud o el medio ambiente” resalta el Prof. García Olmedo³³ y además comenta que es totalmente imposible encontrar un solo ejemplo de perjuicio para la salud provocado por los alimentos transgénicos, porque si esto ocurriera los prohibirían en 24 horas. La **Dra. Pilar Carbonero**, Académica de Ingeniería y experta en genómica de plantas, considera que “la agricultura orgánica no es mejor que la transgénica” y añade que “la agricultura orgánica es un capricho de ricos”.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la Organización Mundial para la Salud y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OCDE) han establecido grupos de trabajo para evaluar la salud del consumidor de alimentos transgénicos, encaminados a “erradicar la pobreza extrema y el hambre” uno de los objetivos del milenio. El futuro de la agroalimentación mundial va a venir mediado por el desarrollo de biotecnologías, transgénicas y no transgénicas. Frente a ello, sería aconsejable que se oyera a todos los que se oponen, grupos ecologistas y partidos verdes (Greenpeace), como a los que las

defienden, quizás porque a diferencia de la Revolución Verde del siglo XX que se desarrolló en centros públicos de investigación y divulgaron sus hallazgos por todo el mundo, la Revolución Genética actualmente está dirigida por compañías privadas multinacionales (Monsanto, Syngenta, Pioneer Hi-Bred, Calgene, Bayer, DuPont, Novartis) que están gastando miles de millones de dólares actualmente en ingeniería genética y en la adquisición de participaciones en empresas del genoma de lucro. **Phillips Abelson**¹ (1998) llamó a todo esto la **Tercera Revolución Tecnológica**

Este discurso llega a su fin y quisiera terminarlo con dos opiniones, la primera procede de la Iglesia, curiosamente el **Cardenal Ángel Sodano**, actualmente Decano del Colegio de Cardenalicio dijo que “la biotecnología no debe ser satanizada, sino utilizada para el bien común de la humanidad”¹⁰⁹, y finalizo con las palabras de una mujer científica pionera en investigación como lo fue **Marie Curie** que decía “a lo desconocido no hay que tenerle miedo, simplemente hay que entenderlo”.

Muchas gracias.

Bibliografía

1. Abelson PH. **1998**. A third technological revolution. *Science*, 279: 2015-2109
2. Akerele O. **1998**. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. *Fitoterapia*, 59:355-363
3. Altieri MA. **2002**. The science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture Ecosystems and Environments*, 93: 1-24
4. Ardisson S, Kobayashi H, Kambara K, Rummel C, Noel KD, Walker GC, Broughton WJ, Deakin WJ. **2011** Role of BacA in lipopolysaccharide synthesis, peptide transport, and nodulation by *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, 193: 2218-28
5. Arnon DI, Stout PR. **1939**. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants. *Plant Physiology*, 14: 371-375
6. Barnett MJ et al. **2001**. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 9883-9888
7. Bécquer Granados CJ, Nápoles Gómez JA, Álvarez O, Ramos Y, Quintana M, Galdo Y. **2012**. Respuesta de diferentes variedades de cereales a la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3: 187-200
8. Beijerinck MW. **1888**. Cultur des *Bacillus radicola* aus den Knöllchen. *Botanische Zeitung*, 46, 740-750
9. Bittel P, Robatzek S. **2007**. Microbe associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 335-41
10. Bloom AJ, Burger M, Kimball BA, Pinter PJ. **2014**. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. *Nature Climate Change*, doi:10.1038/nclimate2183
11. Burrill R, Hansen TJ. **1917**. Is symbiosis possible between legume bacteria and non-legume plants? *University of Illinois, Agricultural Experiment Station*, 202: 161-181

12. Caba JM, Recalde L, Ligeró F. **1998**. Nitrate-induced ethylene biosynthesis and the control of nodulation in alfalfa. *Plant, Cell and Environment*, 21: 87-93
13. Caba JM, Poveda JL, Gresshoff PM, Ligeró F. **1999**. Differential sensitivity of nodulation to ethylene in soybean cv. Bragg and a supernodulating mutant. *New Phytologist*, 142: 233-242
14. Caba JM, Centeno ML, Fernández B, Gresshoff PM, Ligeró F. **2000**. Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta*, 211: 98-104
15. Cannon SB. **2013**. The model legume genomes. In: *Legume Genomics: methods and protocols. Methods in molecular biology*. Ray J. Rose (ed) Springer New York USA , pp: 1-14
16. Charpentier M, Oldroyd G. **2010**. How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 556-64
17. Chrispeels MJ. **2014**. Yes indeed, most Americans do eat GMOs every day. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56 4-6
18. Christiansen-Weniger C. **1998**. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17: 55-76
19. Codex Alimentarius. **2004**. Guidelines for the production, processing, marketing and labelling of organically produced food. <http://www.codexalimentarius.org/>
20. Cohen JE. **1995**. How many people can the earth support? *The Sciences* 35: 18-23
21. Conford P, Dimbleby J. **2001**. The origins of the organic movements. Floris Books, Glasgow UK, pp280 ISBN 10:0863153364
22. Crutzen PJ, Mosier AR, Smith KA, Winiwarter W. **2008**. N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 8:389-395
23. Darwin C. **1859**. El origen de las especies. Murray J, Street A (ed), London UK
24. De Saussure T. **1804**. Rècherches chimiques sur la végétation. Lyon, Paris

25. Den Herder G, Parniske M. **2009**. The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:491-9
26. Dong X. **2004**. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 547-52
27. Dowling JA, Parniske M. **2002**. Fixation with regulation. *Nature* 420: 369-370
28. FAO y PMA. **2010**. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/013/i1683s/i1683s.pdf>
29. Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. **2010**. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 61-76
30. Figueiredo MVB, Mergulhão ACES, Sobral JK, Andrade MLJ, Araújo ASF. **2013**. Biological nitrogen fixation: importance, associated diversity, and estimates. En: *Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances*. Arora NK (ed). Springer India, pp 267-289
31. Finan TM, et al. **2001**. The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 9889-9894
32. Frugier F, Kosuta S, Murray JD, Crespi M, Szczyglowski K. **2008**. Cytokinin: Secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science*, 12: 115-120
33. García Olmedo F. **2009**. El ingenio y el hambre: de la revolución agrícola a la transgénica. Ed. Critica Barcelona, 263 pp. ISBN 978-84 7423 884-6
34. Geurts R, Lillo A, Bisseling T. **2012**. Exploiting an ancient signalling machinery to enjoy a nitrogen fixing symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:438-43
35. Gómez-Galera S, Twyman RM, Sparrow PA, Van Droogenbroeck B, Custers R, Capell T, Christou P. **2012**. Field trials and tribulations--making sense of the regulations for experimental field trials of transgenic crops in Europe. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 511-23
36. Gomiero T, Pimentel D, Paoletti MG. **2011**. Is there a need for a more sustainable agriculture? *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30: 1-2

37. González V, et al. **2006**. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 3834-9
38. Gonzalez-Rizzo S, Laporte P, Crespi M, Frugier F. **2009**. Legume root architecture: a peculiar root system. *Annual Plant Reviews* 37: 239-287
39. Gordon Childe V. **1935**. Los orígenes de la civilización. Brevarios, Fondo de cultura económica. Mexico-Buenos Aires
40. Gutjahra C, Banbaba M, Crosetta V, Anc K, Miyaoda A, Anc G, Hirochikada H, Imaizumi-Anraku H, Paszkowska U. **2008**. Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *The Plant Cell*, 20: 2989-3005
41. Haney CH, Long SR. **2010**. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 478-83
42. Harikumar KB, Aggarwal BB. **2009**. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7/8: 1020-1035
43. Hellriegel H, Wilfarth H. **1888**. Untersuchungen über die stickstoffnahrung der gramineen und leguminosen. En: Beilageheft zu der zeitschrift des vereins der rübenzucker-industrie des deutschen reichs Bd. 38, 1-234
44. Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM. **2008**. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311: 1-18
45. Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie AJ, Oldroyd GED, **2009**. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 21: 545-557
46. Howieson J, Yates R, Foster K, Real D, Besier R. **2008**. Prospects for the future use of legumes. En: *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds), Springer Dordrecht The Netherlands pp: 363-394
47. IPCC. **1990**. Climate change: The IPCC scientific assessment. Cambridge: Cambridge University Press UK

48. IPCC. **2007**. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE (eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
49. James, Clive. **2014**. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
50. Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, Gresshoff PM, Hauggaard-Nielsen H, Alves BJR, Morrison MJ. **2012**. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries: a review. *Agronomy Sustainable Developmental* 32: 329-364
51. Kaneko T, et al. **2002**. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, 9: 189-97
52. Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi E. **2011**. Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims? *Molecular Plant Microbe Interaction*, 24: 1300-9
53. Khadri M, Tejera NA, Lluch C. **2006**. Alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by exogenous abscisic acid supply. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25: 110-119
54. Khadri M, Tejera NA, Lluch C. **2007**. Sodium chloride-ABA interactions in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 211-218
55. Kiers ET, Ratcliff WC, Denison RF. **2013**. Single-strain inoculation may create spurious correlations between legume fitness and rhizobial fitness. *New Phytology*, 98: 4-6
56. Kinkema M, Gresshoff PM. **2008**. Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 21: 1337-48
57. Kondorosi E, Mergaert P, Kereszt A. **2013**. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology*, 67: 611-628
58. Lawes JB, Gilbert JH, Pugh E. **1861**. On the sources of the nitrogen in vegetation; with special reference to the question whether plants assimilate free or uncombined nitrogen. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 151, 431-577

59. Laloum T, De Mita S, Gamas P, Baudin M, Niebel A. **2013**. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? Trends in Plant Science, 18: 157-66
60. Lawes JB, Gilbert JH. **1855**. Reply to baron Liebig's principles of agricultural chemistry. Journal of the Royal Agronomy Society England, 16: 411-498
61. Liang Y, Cao Y, Tanaka K, Thibivilliers S, Wan J, Choi J, Kang Ch, Qiu J, Stacey G. **2013**. Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. Science, 341: 1384-7
62. Libault M, Joshi T, Benedito VA, Xu D, Udvardi MK, Stacey G. **2009**. Legume transcription factor genes: what makes legumes so special? Plant Physiology, 151: 991-1001
63. Ligeró F, Lluch C, Olivares J. **1986**. Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. Journal of Plant Physiology, 125:3 61-365
64. Ligeró F, Lluch C, Olivares J. **1987**. Evolution of ethylene from roots and nodulation rate of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants inoculated with *Rhizobium meliloti* as affected by the presence of nitrate. Journal of Plant Physiology, 129: 461-467
65. Ligeró F, Caba JM, Lluch C, Olivares J. **1991**. Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethosylglycine. Plant Physiology, 97: 1221-1225
66. Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, Yang WC, Guido JEJ Hooiveld, Charnikhova T, Bouwmeester HJ, Bisseling T, Geurts R. **2011**. Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. The Plant Cell, 23: 3853-65
67. López-Gómez M, Sandal N, Stougaard J, Boller T. **2012**. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. Journal Experimental Botany, 63: 393-401
68. López-Gómez M, Hidalgo J, Iribarne C, Lluch C. **2014**. Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* under salt stress. Plant and Soil, 374: 149-159

69. López-Ráez JA, Pozo MJ, García-Garrido JM. **2011**. Strigolactones: a cry for help in the rhizosphere. *Botany* 89: 513-522
70. Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L. **2011**. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science*, 332: 1439-42
71. Ma TT, Teng Y, Luo YM, Christie P. **2013**. Legume-grass intercropping phytoremediation of phthalic acid esters in soil near an electronic waste recycling site: a field study. *International Journal of Phytoremediation*, 15: 154-67
72. Maekawa T, Maekawa-Yoshikawa M, Takeda N, Imaizumi-Anraku H, Murooka Y, Hayashi M. **2009**. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant Journal*, 58:183-194
73. Malthus TR. **1846**. Ensayo sobre el principio de la población. (traducción de Patricio de Azcárate Diz), Alianza Editorial, 2000, Madrid, ISBN 84-206-3984-2.
74. Markmann K, Giczey G, Parniske M. **2008**. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biology*, 6:e68
75. Martínez-Abarca F, et al. **2013**. Complete genome sequence of the alfalfa symbiont *Sinorhizobium/Ensifer meliloti* strain GR4. *Genome Announcements*, 1: e00174-12
76. Masip G, Sabalza M, Pérez-Massot E, Banakar R, Cebrian D, Twyman RM, Capell T, Albajes R, Christou P. **2013**. Paradoxical EU agricultural policies on genetically engineered crops. *Trends in Plant Science*, 18: 312-324
77. Mbengue M, Camut S, de Carvalho-Niebel F, Deslandes L, Froidure S, Klaus-Heisen D, Moreau S, Rivas S, Timmers T, Hervé C, Cullimore J, Lefebvre B. **2010**. The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase PUB1 interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation. *The Plant Cell*, 22: 3474-88
78. Mendel, G. **1866**. Versuche über pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr 1865, Abhandlungen, 3
79. Middleton PH, Jakab J, Penmetsa RV, Starker CG, Doll J, Kalo P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, Dudas B, VandenBosch K,

Long SR, Cook DR, Kiss GB, Oldroyd GED. **2007**. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction. *The Plant Cell*; 19: 1221-34

80. Miyawaki K, Tabata R, Sawa S. **2013**. Evolutionarily conserved CLE peptide signaling in plant development, symbiosis, and parasitism. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 598-606

81. Murakami Y, Miwa H, Imaizumi-Anraku H, Kouchi H, Downie JA, Kawaguchi M, Kawasaki S. **2006**. Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the GRAS family, required for *NIN* and *ENOD40* gene expression in nodule initiation. *DNA Research*, 13: 255-65

82. Nagata M, Suzuki A. **2014**. Effects of phytohormones on nodulation and nitrogen fixation in leguminous plant. En: *Advances in biology and ecology of nitrogen Fixation*. INTECH Open Science. T. Ohyama (ed) ISBN 978-953-51-1216-7

83. NCR (National Research Council). **2010**. *Toward sustainable agricultural systems in the 21 st century*. National Academies Press. <http://www.nap.edu/catalog/12832.html>

84. Nutman PS. **1952**. Host-factors influencing infection and nodule development in leguminous plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*; 139: 176-185

85. Okon Y, Labandera-González CA. **1994**. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1591-1601

86. Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. **2011**. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis *Annual Review of Genetics*, 45: 119-144

87. Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuan J. **2013**. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 26:486-494

88. Ooki Y, Banba M, Yano K, Maruya J, Sato S, Tabata S, Saeki K, Hayashi M, Kawaguchi M, Izui K, Hata S. **2005**. Characterization of the *Lotus japonicus* symbiotic mutant *lot1* that shows a reduced nodule number and distorted trichomes. *Plant Physiology*, 137: 1261-1271

89. Palma F, Lluch C, Iribarne C, García-Garrido JM, Tejera N. **2009**. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regulation*, 58: 307-316
90. Palma F, López-Gómez M, Tejera NA, Lluch C. **2014**. Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Science*, 223: 16-24
91. Penmetsa RV, Uribe P, Anderson J, Lichtenzweig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, Baek JM, Lopez-Meyer M, Long SR, Harrison MJ, Singh KB, Kiss GB, Cook DR. **2008**. The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant Journal*, 55: 580-595
92. Petrie JR, Shrestha P, Belide S, Mansour MP, Liu Q, Horne J, Nichols PD, Singh SP. **2012**. Transgenic production of arachidonic acid in oilseeds. *Transgenic Research*, 21:139-47
93. Pirhofer-Walzl K, Rasmussen J, Høgh-Jensen H, Eriksen J, Sørengaard K, Rasmussen J. **2012**. Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. *Plant and Soil*, 350: 71-84
94. Podlešáková K, Fardoux J, Patrel D, Bonaldi K, Novák O, Strnad M, Giraud E, Spíchal L, Nouwen N. **2013**. Rhizobial synthesized cytokinins contribute to but are not essential for the symbiotic interaction between photosynthetic *Bradyrhizobia* and *Aeschynomene* legumes. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 26: 1232-8
95. Pollan M. **2001**. The botany of desire: a plant's-eye view of the world. Editorial Random House, New York USA pp: 271 ISBN 0-375-76039-3
96. Ratnaparkhe MB, Wang X, Li J, Compton RO, Rainville LK, Lemke C, Kim C, Tang H, Paterson AH. **2011**. Comparative analysis of peanut *NBS-LRR* gene clusters suggests evolutionary innovation among duplicated domains and erosion of gene microsynteny. *New Phytology*, 192: 164-78
97. Reid DE, Ferguson BJ, Hayashi S, Lin YH, Gresshoff PM. **2011**. Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Annual Botany*, 108: 789-795
98. Ribou BR S, Douam F, Hamant O, Frohlich MW, Negruțiu I. **2013**. Plant science and agricultural productivity: why are we hitting the yield ceiling? *Plant Science*, 210: 159-76

99. Rodrigues EP, Rodrigues LS, Martinez de Oliveira AL, Divan Baldani VL, dos Santos Teixeira KR, Urquiaga S, Reis VM. **2008**. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 302: 249-261
100. Rubio LM, Ludden PW. **2008**. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology*, 62: 93-111
101. Ruiz-López N, Sayanova O, Napier J, Haslam RP. **2012**. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 63: 2397-2410
102. Ryu H, Cho H, Choi D, Hwang I. **2012**. Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis. *Molecules and Cells*, 34: 117-26
103. Sato S et al. **2008**. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, 15: 227-39
104. Sánchez-Prado B, Zornoza P. **2014**. Mitigation of Cu -stress by legume - *Rhizobium* symbiosis in white lupin and soybean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102 1-52014
105. Sartori G, Mazzoleni G. **2005**. La tierra explota: superpoblación y desarrollo. Ediciones Madrid: Suma de Letras, ISBN 84-663-1497-0
106. Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J. **1999**. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 402: 191-95
107. Schmutz J et al. **2010**. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463: 178-83
108. Searle IP, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gressoff PM. **2003** Long-distance signalling in nodulation directed by CLAVATA 1 like receptor kinase. *Science* 299 109-112
109. Sodano A. **2009**. El Vaticano apuesta por los alimentos transgénicos. <http://www.gastronomiaycia.com/2009/03/22/el-vaticano-apuesta-por-los-alimentos-transgenicos/>
110. Soto MJ, Domínguez-Ferreras A, Pérez-Mendoza D, Sanjuán J, Olivares J. **2009**. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiology*, 11: 381-8

111. Soyano T, Kouchi H, Hirota A, Hayashi M. **2013** Nodule inception directly targets *NF-Y* subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. PLoS Genetic, 9:e1003352. doi: 10.1371/journal.pgen.1003352
112. Sprent JI. **2001**. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens Kew. Cromwell Press LTD, London, UK
113. Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, Olivares J Soto MJ. **2006**. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. Plant Physiology, 141: 1473-1481
114. Suzuki A, Akune M, Kogiso M, Imagama Y, Osuki K, Uchiumi T, Higashi S, Han SY, Yoshida S, Asami T, Abe M. **2004**. Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. Plant Cell Physiology, 45: 914-22
115. Takahara M, Magori S, Soyano T, Okamoto S, Yoshida C, Yano K, Sato S, Tabata S, Yamaguchi K, Shigenobu S, Takeda N, Suzaki T, Kawaguchi M. **2013**. Too much love, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-*Rhizobium* symbiosis. Plant Cell Physiology, 54: 433-47
116. Tansengco ML, Imaizumi-Anraku H, Yoshikawa M, Takagi S, Kawaguchi M, Hayashi M, Murooka Y. **2004**. Pollen development and tube growth are affected in the symbiotic mutant of *Lotus japonicus*, crinkle. Plant Cell Physiology, 45: 511-20
117. Terakado J, Yoneyama T, Fujihara S. **2006**. Shoot-applied polyamines suppress nodule formation in soybean (*Glycine max*). Journal of Plant Physiology, 163: 497-505
118. Udvardi M, Poole PS. **2013**. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. Annual Review of Plant Biology, 64: 781-805
119. Urquiaga S et al. **2012**. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to brazilian sugarcane varieties. Plant and Soil, 356: 5-21
120. USDA. United States Department of Agriculture. **2013**. World agricultural supply and demand estimates. Office of the Chief Economist, Agricultural Marketing Service, and Economic Research Service

121. Varshney RK et al. **2012**. Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nature Biotechnology*, 30: 83-89
122. Varshney RK et al. **2013**. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology*, 31: 240-246
123. WCED. **1987**. Our common future. World commission of environment and development. Oxford University Press. Geneva, Switzerland
124. WHO. **2004**. The world health report 2004: changing history. Geneva, Switzerland
125. WMO. **1979**. Declaration of the world climate: a conference of experts on climate and mankind. Proceedings of the world climate conference. Geneva No. 537. ISBN: 92-63-10537-5
126. World Bank. **2007**. World development report: Agriculture for development. Washington DC.
127. Woronin M. **1866**. Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und bei der gewöhnlichen gartenlupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden wurzelanschwellungen. *Mémoires de l'academie impériale des sciences de St. Pétersbourg* , Ser. 7 (6): 1-13
128. Young JP et al. **2006**. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology*, 7: R34
129. Young ND et al. **2011**. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480: 520-24
130. Young ND, Bharti AK. **2012**. Genome-enabled insights into legume biology. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 283-305
131. Zamioudis C, Pieterse CM. **2012**. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 25: 139-50

CONTESTACIÓN DEL
ILMO. SR. D. JOSE OLIVARES PASCUAL

Excmo. Sr. Presidente

Sres. Académicos,

Señoras y Señores,

Me temo que no soy la persona más indicada que ha elegido esta docta corporación para contestar la brillante exposición que acabamos de escuchar a la Profesora Carmen Lluch, paso preceptivo para formar parte de la Academia. Es una elección que tengo que agradecer por la confianza que se ha puesto en mí, pero el aprecio y estima que siento por la aspirante, que creo que son mutuos, después de tantos años de relación científica y amistad, pueden hacer que mi juicio sobre sus méritos no sea imparcial y pudiera parecer en algunos aspectos exagerado. Sin embargo, me tranquiliza pensar que el sesgo que yo pueda dar sobre sus cualidades personales y las

diferentes actividades desarrolladas serán corroboradas por los Srs. Académicos. La candidata es suficientemente conocida en el medio universitario, como docente, investigadora y gestora en los distintos puestos de responsabilidad por los que ha pasado en su dilatada vida profesional. Como académico integrante de la sección de Naturales y, por tanto, elector en su día del candidato entre los presentados para optar a la correspondiente vacante, quiero aclarar que la Profesora Lluch fue elegida por unanimidad por sus méritos propios sin tener en cuenta la discriminación positiva en la que alguien podría haber pensado al repasar la nómina de académicos.

La tradición de este tipo de actos, como el que estamos celebrando, establece que mi laudatio debe subrayar la relevancia de la aportación científica de la nueva académica a esta corporación y situar su calidad en el contexto de la ciencia en nuestro tiempo.

Corría el año 1971 cuando la alumna Carmen Lluch de quinto curso de Farmacia llegó a la Sección de Microbiología del Suelo de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC, de la mano de mi nunca olvidado maestro, el Profesor Vicente Callao Fabregat, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de esta Universidad, jefe de la Sección, cofundador del Centro y valenciano de origen como ella. En aquel tiempo sólo había cuatro facultades de Farmacia en España, Madrid, Barcelona, Santiago y la nuestra, pero aunque Barcelona tuviera sus ventajas por proximidad y mejores comunicaciones, la gran mayoría de estudiantes de levante que querían cursar esta licenciatura optaban por Granada. Esto hacía que la colonia valenciana en la Facultad fuera importante y al encontrarse en una región distinta se diera una estrecha relación entre los alumnos y entre ellos y los profesores de aquel origen. En ese contexto, el esoraCallao tratando de ayudar, digamos a sus “paisanos”, había acogido en la Cátedra de Microbiología varios doctorandos y alumnos internos de Valencia, Alicante y Castellón, su tierra natal, y amplió el círculo con la

Estación Experimental del Zaidín. Con la alumna Lluch, llegaron al Centro, dos compañeras más de por aquellos lares con el objeto, como ella, de realizar la tesina, alternativa al examen de licenciatura que se introdujo aquel año en la Universidad para obtener el correspondiente grado. Desconozco, o no recuerdo, la razón si la había, o fue simple azar, pero en el reparto que el Prof. Callao hizo entre los posibles directores del trabajo de las futuras licenciadas a mí me correspondió, hoy puedo decir tuve la suerte y el honor, de ser elegido para dirigir a la hoy propuesta académica.

De entre los distintos temas que se desarrollaban por ese tiempo en el hoy Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, se decidió que se ocupara del estudio de las condiciones de producción del pigmento fluorescina por una especie de *Pseudomonas* aislada de un material que estaba siendo estudiado por otro grupo de la Sección. La investigación realizada dio lugar a un par de publicaciones y a la correspondiente tesina que leyó en noviembre de 1971, no sin problemas burocráticos, que ella recordará. Culminado este trabajo, la ya Licenciada Lluch, decidió continuar con la realización de la tesis doctoral en el mismo lugar y con igual director para lo que solicitó y obtuvo sin problemas la correspondiente beca.

El suelo se puede considerar como un ser vivo gracias a la actividad de los microorganismos que en ingente cantidad lo habitan. Todos los elementos minerales son sustratos susceptibles de modificación por la acción de bacterias y hongos allí presentes. Unos elementos simplemente pasan de estar libres a formar parte de la materia orgánica o viceversa, pero otros, aquellos que con distintas valencias forman compuestos estables, presentan más complicación. Cada elemento tiene lo que se conoce como ciclo biogeoquímico, cuyo nivel de funcionamiento y la transformación de unos compuestos en otros es dependiente de la naturaleza y condiciones ambientales del suelo que favorecen la presencia, multiplicación y actividad

de un determinado grupo de microorganismos y que es de trascendental importancia en la puesta a disposición de las plantas de cada nutriente mineral. A la Lda. Lluch le tocó estudiar el ciclo correspondiente al azufre que como sulfuro, azufre elemental o sulfato se puede encontrar en el suelo aparte del que entra en la constitución de distintas moléculas orgánicas. Leyó y defendió con éxito su tesis doctoral en septiembre de 1974. Por su esfuerzo y dedicación a esta investigación pudo publicar cuatro trabajos y aplicar sus conocimientos a otras áreas de estudio. Así de las bacterias del ciclo del azufre pasó a utilizar este elemento solo, o en conjunción con el nitrógeno, en experimentos con plantas obteniendo resultados bastante prometedores. Algunas de estas plantas eran leguminosas lo que le hizo entrar en contacto con la fijación de nitrógeno, de la que nos acaba de hablar clara y exhaustivamente, que considerada bajo diferentes aspectos era desde hacía tiempo, prácticamente desde la fundación de la Estación Experimental, que precisamente este año celebra su sesenta aniversario, tema de investigación desarrollado por otros componentes de la Sección.

Aquel que haya tenido algún contacto con la aspirante a Académica y, por tanto, sea buen conocedor de su carácter, no puede poner en duda su perfecta integración en el colectivo investigador y su disponibilidad a la ayuda y colaboración con todos sus compañeros, que pronto traspasó los límites de su laboratorio al resto del Centro. Conocida su valía personal, formación y dedicación científica, el Profesor Recalde Martínez, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia, miembro que fue de esta Academia, y a la sazón director del Centro, le propuso formar parte del equipo investigador y docente en su Departamento universitario. No en vano la Dra. Lluch había tenido ya contacto con las plantas y con la fijación de nitrógeno simbiótica, de la que también nos ha hablado, de la que quedaba mucho por conocer, de tal modo que los aspectos microbiológicos de esta asociación seguirían considerándose preferentemente en la Estación

Experimental del Zaidín y los referentes a la planta en la Cátedra de Fisiología Vegetal. Desde entonces siempre ha mantenido una estrecha relación con sus ancestros científicos, puesta en ocasiones en evidencia por la firma conjunta de proyectos de investigación presentados a diferentes Instituciones o por la constitución de una Unidad Asociada Universidad de Granada-CSIC.

Desde aquella incorporación a la Universidad, la hoy Profesora Lluch forma parte del citado Departamento, para el que en 1980 obtuvo la plaza de Profesora Adjunta y en 1985 la de Catedrática, en unas condiciones que no le eran favorables, teniendo en contra hasta la RENFE que le hizo perder una oportunidad que le supuso unos años de espera. Algo de ADN aragonés debe tener en sus genes pues al final su terquedad dio sus frutos.

Su amplia labor docente, independientemente de la ejercida en el desarrollo del programa de la asignatura, se pone en evidencia con su docena y media de doctores que investigaron bajo su dirección, algunos de los cuales han conseguido plaza de Titularidad o Cátedra en la Universidad para continuar escribiendo la historia. Como actividad derivada de esta vertiente docente hay que mencionar los muchos cursos que ha impartido o participado en distintas universidades así como el Master Universitario en Biología Agraria y Acuicultura de la de Granada con la participación de un importante elenco de profesores de distinto origen y con gran aceptación por la parte del alumnado y calificado con el grado de excelencia. En dicho master participan como profesores un buen número de investigadores de la Estación Experimental del Zaidín y son utilizadas sus instalaciones, claro exponente de la estima que siempre ha demostrado por su primer Centro de acogida, convirtiéndose en cabeza de puente para facilitar las relaciones personales e institucionales entre la Estación Experimental y la Universidad de Granada.

La trayectoria científica de la Profesora Lluch se puede seguir fácilmente a través del más del centenar de publicaciones y las casi incontables contribuciones de otro tipo, libros, conferencias, seminarios, etc. Dada su capacidad de trabajo, su dedicación a la investigación y enseñanza no se han resentido, por las varias ocasiones que su mencionada disponibilidad la han llevado a desempeñar distintas funciones de gestión en el ámbito universitario ajenas a la propia investigación, como Directora del Secretariado de Programas y Planificación Docente o Directora del Instituto de Ciencias de la Educación, por citar sólo algunas, y al margen de su participación en diferentes comisiones de distintas Universidades para la evaluación de personal, de la calidad de la investigación y de proyectos.

Como no cabía esperar otra cosa, desde sus primeros trabajos en el Departamento de Fisiología Vegetal, toda su devenir científico tiene un hilo conductor que mantiene sin solución de continuidad su investigación sobre la fijación de nitrógeno. Aunque desarrollada principalmente con leguminosas esa dedicación no le han impedido algunos escarceos con caña de azúcar que le han supuesto establecer una estrecha relación, a través de la Agencia Española de Cooperación Internacional, con investigadores cubanos. Se formalizaron varios proyectos conjuntos, con intercambio de visitas y personal, entre ellos varios becarios que terminaron siendo doctores. Como reconocimiento de esta relación con la isla caribeña le fue concedido el Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba en 2004 y el Premio al Mejor Resultado en la Dirección de proyectos en Biotecnología y Alimentos de la Universidad de La Habana en 2002 y 2004. De igual modo, y con la ayuda de la misma Agencia de Cooperación, ha mantenido estrecha relación con universidades del Norte de Africa que también contemplaba intercambio de profesores y becarios, en estos casos para el estudio conjunto de la fijación de nitrógenos en leguminosas crecidas en suelos salinos.

Si al comienzo de su vida profesional la investigación de la Profesora Lluch estuvo dirigida al estudio de la respuesta de las leguminosas y de su simbiosis con *Rhizobium* a la aplicación de azufre y nitrógeno, se centró después en el nitrato abandonando el azufre. La respuesta de las leguminosas a la fertilización con nitrógeno reactivo es diferente a la de otras plantas, especialmente los cereales donde está muy bien estudiada y fue la base de la revolución verde, que ha sido bien descrita en el discurso que acabamos de escuchar. El hecho de que las leguminosas hayan evolucionado junto a bacterias fijadoras de nitrógeno que le están suministrando amonio de forma continua hace que no respondan a la aplicación del fertilizante como cabía esperar. El uso de amonio o nitrato inhibe la fijación de nitrógeno y, aparte de encarecer el cultivo, determina un desequilibrio entre el desarrollo de la planta y las condiciones ambientales en las que crece, de tal forma que la maduración se retrasa y baja la productividad. La sabia Naturaleza ha desarrollado mecanismos para no desperdiciar energía en cualquier sistema de que se trate. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa no es una excepción, por ello en presencia de nitrógeno combinado no hay fijación, e incluso no llegan a formarse nódulos, lugar en los que, como ha mencionado la Profesora Lluch, tiene lugar el proceso. Combinar la aplicación de fertilizante con la fijación para aumentar el rendimiento de las plantas ha sido siempre objeto de estudio y ha estado en la mente de la Profesora Lluch a lo que ha dedicado su esfuerzo en diferentes frentes. Uno de ellos ha sido el estudio del papel que juegan algunas hormonas en el establecimiento y eficiencia de la simbiosis en distintas condiciones de cultivo. Así se encontró con el hecho interesante de que la inhibición por nitrato de la nodulación era neutralizada por la aplicación de aminoetoxivinilglicina, un inhibidor del etileno, una fitohormona responsable de los procesos de estrés en las plantas, en la maduración de los frutos, la senescencia de hojas y flores y de la abscisión del fruto, como se ve, pura fisiología.

Así continuó con su investigación con el grupo que había formado con sus primeros doctores hasta que en los primeros noventa evolucionó hacia un objetivo de particular interés, como era el cultivo de leguminosas en suelos salinos. Más de la última mitad de sus publicaciones, comunicaciones a congresos y de sus 28 proyectos para los que ha recibido subvención, se ocupan de conocer la respuesta de estas plantas y del eficiente establecimiento de su asociación con *Rhizobium* en presencia de sal y de los posibles medios de actuación para conseguir unos rendimientos satisfactorios de los cultivos.

Cuando el incremento de la población mundial parece imparable y la superficie de suelo utilizable no aumenta al mismo ritmo, es de importancia fundamental la necesidad de aprovechar cualquier posibilidad al alcance para mitigar ese desequilibrio. Los suelos salinos, de todo tipo, ocupan según la FAO unos 3,23 millones de km². La irrigación y desertificación son causas del aumento de la salinidad de los suelos. Aproximadamente un tercio de las extensiones de regadío en los países más importantes experimenta serios problemas debido a su salinización. Nada más que en Europa, los suelos salinos alcanzan 20,7 millones de hectáreas. Se comprende por ello el interés de toda investigación que se dirija al aprovechamiento de la máxima superficie de suelo de potencial uso agrícola. No en vano 500 años después de que Leonardo da Vinci dijera que “hoy sabemos más de los cuerpos celestes que del suelo que pisamos”, la ONU ha declarado 2015 como Año Internacional del Suelo, considerado bajo sus diferentes aspectos, entre ellos el agrícola.

La salinidad supone para la planta un doble estrés. Por un lado, la disminución de la disponibilidad de agua y, por otro, los efectos tóxicos de los iones acumulados. Al contrario que con especies vegetales de otras familias, los estudios con leguminosas, se complican al no poder considerar la planta en el medio natural independientemente de la bacteria con la que se

asocia, y al presentar cada uno de los miembros que la forman distinta sensibilidad a la sal en el medio.

Algunas de las estrategias de las que las plantas han echado mano para enfrentarse al estrés salino, son coincidentes con las utilizadas por las bacterias tolerantes a la sal. Una de ellas, por ejemplo, es la acumulación de solutos compatibles u osmolitos, que son compuestos no tóxicos que incrementan su concentración celular en medios salinos y no interfieren con la actividad metabólica. Aumentan el ajuste osmótico que permite mantener el turgor de las células que de otra forma se deshidratarían. Ejemplo de tales compuestos son la prolina, la betaína, la trehalosa, y algunos más con las mismas características, que sustituyen al potasio que se ha acumulado en una rápida respuesta de la célula al choque hiperosmótico. Aparecen también en otras situaciones de estrés, como sequía y heladas, que inducen en la plantas efectos miméticos al exceso de sal. Hay, además, que tener en cuenta el papel que se ha atribuido a algunos de los osmolitos en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno, o ROS, que se inducen en las condiciones de estrés citadas, y en la presencia de patógenos. Estas ROS, de no controlarse, producen importantes daños en las células a nivel de membrana y ADN.

La citid trehalosa es un disacárido no reductor de presencia prácticamente general en los seres vivos y por tanto en la planta y en la bacteria que se asocia con ella. El papel que juegan la trehalosa y la trehalasa, la enzima que la hidroliza a glucosa, en esta simbiosis en condiciones salinas está siendo bien estudiado por el equipo de la Profesora Lluch. Paralelamente ha estudiado con resultados esperanzadores otras estrategias para paliar el efecto de la sal, tales como la implicación y uso de hormonas, como el ácido abscísico, productos fitosanitarios, como la validamicina, compuestos implicados en resistencia, como el ácido salicílico, y, finalmente, polyaminas y brasinoesteroides, estos últimos

sujetos del reciente proyecto concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad..

Hoy día, la introducción de la biología molecular permite avanzar a pasos de gigante en busca de la solución. A la bacteria, si no los tiene, se le pueden transferir genes que la faculten para la resistencia, y por parte de la planta es factible la construcción de transgénicas resistentes a altas concentraciones de sal o modificar la regulación de aquellos genes que ya posee. A pesar de la gran cantidad de información existente sobre la resistencia de las plantas a la salinidad el problema no está resuelto. Aunque se han patentado más de 700 resultados obtenidos implicando genes específicos para la resistencia el éxito es muy poco evidente, por lo que dedicarse a la búsqueda de una solución del problema, aunque sea parcial, es una tarea con futuro y animamos a la nueva académica continuar en esta dirección.

Llegando al final de estas palabras mías quiero resaltar por su interés tres cuestiones, en cierto modo relacionadas, que ya ha señalado la Profesora Lluch y que de por sí son importantes y de actualidad y que dirigirán la investigación en el campo de la fijación biológica de nitrógeno. Una es el papel que este proceso juega en la lucha contra el cambio climático. La fertilización nitrogenada en la que se sustenta los altos rendimientos de los cultivos en el mundo desarrollado, conlleva unos efectos indeseados que deben paliarse y en lo posible eliminarse. Todos estamos obligados a respetar el ambiente. A las palabras del Papa Francisco que ha mencionado la Profesora Lluch: “Dios perdona siempre, el hombre a veces, la naturaleza nunca”, añado unas de Nelson Mandela que se pueden traer aquí a colación: “La gran responsabilidad de cada generación, es la siguiente”

A la baja eficiencia del nitrógeno aplicado a los cultivos, ya que más del 50 por ciento se pierde por lixiviación, hay que añadir el daño ambiental

causado. Contaminación de las aguas, por un lado, y aumento de la temperatura de la superficie terrestre, por otro, debido a los gases de efecto invernadero, el CO₂ liberado en la síntesis de las más de 100 millones de toneladas/año de amonio, y el dióxido de nitrógeno procedente de la actividad microbiana desnitrificante del suelo sobre el nitrato aplicado. Aparte de una fertilización más racional de tal forma, que como también hemos escuchado a la Profesora Lluch, con menores inputs se obtengan iguales resultados, hay que intensificar la investigación, y esta es la segunda de las cuestiones señaladas, necesaria para extraer el máximo rendimiento de la potencialidad que encierra la fijación de nitrógeno, bien consiguiendo plantas que sean capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico por sí mismas, por transferencia de la dotación genética correspondiente, objetivo plausible pero de futuro lejano, o con la construcción, no me gusta este término pero me parece que es el que más se ajusta al caso, de sistemas simbióticos similares al ya muy citado *Rhizobium*-leguminosa pero con otras especies vegetales implicadas. De esta forma, los cereales y demás plantas de interés agrícola podrían utilizar el nitrógeno de una forma limpia y barata a través de las bacterias con las que se asociaran. Personalmente creo, que teniendo en cuenta el cúmulo de conocimientos que ya se tiene especialmente a nivel de hospedador, que van desde el reconocimiento de la señal emitida por *Rhizobium*, en respuesta a la de la planta, su transducción a través de una larga cascada de genes hasta la formación del nódulo y creación de las condiciones adecuadas para la reducción del nitrógeno, que muy claramente ha expuesto la Profesora Lluch, este objetivo es más fácil de alcanzar. Las micorrizas están ayudando mucho con una experiencia asociativa superior a los 400 millones de años y extenderse al 80 por ciento de las plantas. Más que de la carencia de genes para universalizar el proceso, el problema es de regulación. Por todo ello creo que no me equivoco, y estoy pensando para mí, si afirmo que en 10 o 20 años podrían estar listas prometedoras simbiosis mutualistas.

En el interin no se debe despreciar el trabajo que se realiza para conseguir el mayor partido de los endófitos fijadores de los que la Profesora Lluch se ha ocupado en el arriba mencionado ejemplo concreto de la caña de azúcar.

Y la tercera cuestión a considerar es la llevada a la práctica de los resultados conseguidos. Las plantas fijadoras serán transgénicas y para su introducción en el mercado habrá que resolver el problema persistente de la contestación social. Espero que para entonces se haya alcanzado el nivel cultural suficiente para aceptar el fruto de las investigaciones realizadas y desoir todos los cantos de sirena de la manipulación. En nuestras manos está cooperar a ello. No es de recibo que la población con alimentación deficiente en vitamina A, para los que se ha desarrollado y puesto en circulación el arroz dorado, salga en manifestación contra su cultivo, como hemos podido ver recientemente en la prensa. A este asunto se puede aplicar la conocida frase de Albert Einstein de que “los nuevos conocimientos deben de ser comprendidos con responsabilidad y con una humildad proporcional a nuestra ignorancia”.

Sólo me queda ya desear que la Profesora Lluch, que de todo lo dicho tiene un alto conocimiento y manifiesta un gran interés, siga adelante en su trabajo con el mismo entusiasmo de siempre y con éxito en su quehacer diario, y no deseo, sino que espero y creo con seguridad, que su incorporación como académica supone un enriquecimiento en el saber y prestigio de esta docta Corporación.

He dicho