

La ingeniería genética de las plantas cultivadas, clave para mejorar la nutrición y la salud humanas

JOSÉ PÍO BELTRÁN

*Académico Correspondiente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

RESUMEN

La recolección de simples, el aislamiento de productos naturales o las técnicas de la agricultura molecular, que permiten la modificación de las plantas mediante ingeniería genética para convertirlas en biofactorías de productos de interés farmacológico, constituyen distintas aproximaciones para utilizar las plantas en beneficio del hombre. En este trabajo se muestra la utilización del anticuerpo monoclonal A1, que reconoce la proteína específica de las anteras de flores de guisante (*Pisum sativum* L.) END1, para aislar el gen correspondiente y caracterizar su región promotora. Se muestra la capacidad de dicha región para dirigir la expresión del gen citotóxico *barnasa* específicamente a las anteras de distintas especies vegetales y construir plantas transgénicas androestériles que son la base para la producción de semillas híbridas generadoras de plantas con mayor vigor que las líneas parentales. Mediante dicha tecnología se han producido también frutos partenocárpicos de tomate de interés para la agricultura, la industria, la tecnología culinaria y el consumidor. Todo ello se enmarca en la situación actual y las perspectivas futuras que presenta el uso de la biotecnología vegetal en el campo de la nutrición y la salud.

Palabras clave: *Pisum sativum*.—*Lycopersicon esculentum*.—*Nicotiana tabacum*.—*Brassica napus*.—END1.—Plantas transgénicas androestériles.—Partenocarpia.

SUMMARY

Genetic Engineering of Crop Plants, a Key Approach to Improve Human Nutrition and Health

To collect wild type plants, to isolate plant natural products or to produce molecules of pharmacological interest by means of the so called molecular farming techniques with genetically engineered plants represent different approaches to the use of plants for human benefit. Here we show the isolation of the protein END1 and the corresponding coding gene, including its promoter region by means of the monoclonal antibody A1 which recognizes END1 expression in anthers of *Pisum sativum* plants. The ability of the *END1* promoter region to drive the expression of the cytotoxic gene *barnase* specifically to the anthers of different plant species is demonstrated. This allowed us to obtain male sterile plants needed to give rise to hybrid seeds characterized for producing plants more productive than their parental lines. Using the same biotechnological tools we have produced parthenocarpic tomato fruits of interest for farmers, industries, and consumers. These results are discussed in the frame of the current and future perspectives of plant biotechnology to improve human nutrition and health.

Key words: *Pisum sativum*.—*Lycopersicon esculentum*.—*Nicotiana tabacum*.—*Brassica napus*.—*END1*.—Androsterile transgenic plants.—Parthenocarpia.

INTRODUCCIÓN

Los objetivos científicos de la Biología vegetal tienen que ver con poder descifrar las pautas que gobiernan el desarrollo de las plantas y su respuesta frente a agentes patógenos y frente a estreses abióticos. El avance en la comprensión de los mecanismos que subyacen a los procesos vitales de las plantas debería permitir un mejor aprovechamiento de las mismas. Durante la segunda mitad del siglo pasado los abordajes experimentales utilizados variaron con la propia evolución de la metodología científica, desde los utilizados en Fisiología de organismos completos a los de la Fisiología y Bioquímica de órganos y tejidos y posteriormente a los de la Biología molecular y al análisis genético molecular de procesos de desarrollo, así como a la Ingeniería Genética. El uso de las plantas para mejorar la nutrición y salud humanas entronca con una de las tradiciones de la Farmacia, que en el pasado se concretaban en la elaboración de la Farmacopea y de la Triaca Magna. Para poder dirigir y controlar el uso de las plantas es necesario conocerlas en profundidad y a ese conocimiento han con-

tribuido numerosos farmacéuticos entre los que cabría destacar, entre otros, por orden cronológico y desde finales del siglo XIX a Mariano del Amo y Mora, a Blas Lázaro Ibiza, al gran farmacéutico y fitógrafo valenciano Carlos Pau Español, a Pío Font Quer y su Dioscórides renovado, a Mariano Losa España, al igual que a los miembros de la saga de los Rivas, comenzando por don Marcelo Rivas Mateos, los hermanos Juan y Salvador Rivas Goday y al hijo de este último, Salvador Rivas Martínez, ilustre Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia (1).

También fue muy relevante el papel jugado por los farmacéuticos en la introducción de la Bioquímica en España como es el caso de don José Rodríguez Carracido y don Ángel Santos Ruiz. De igual manera, y en esta recíproca relación Bioquímica/Botánica, quiero recordar al bioquímico vegetal, recientemente fallecido, don Roberto Fernández de Caleyá y Álvarez que, consciente de la importancia de unificar y modernizar las distintas floras españolas, impulsó e hizo posible el inicio del Programa *Flora Ibérica*, iniciativa que constituye el orgullo de los botánicos españoles y la envidia de los foráneos.

PRODUCIR MÁS ALIMENTOS, CON MAYOR VALOR NUTRICIONAL, Y MEJORAR LA SALUD HUMANA COMO OBJETIVOS PARA EL SIGLO XXI

La ingeniería genética permite cambiar en un solo gen el patrimonio genético de una especie cultivada. Las modificaciones que se pueden conseguir no están limitadas por la barrera de la especie; son dirigidas y se pueden obtener de forma más eficaz que las producidas, al azar, por hibridación o mutagénesis. Esta tecnología no se debe ver como una alternativa a la domesticación de las plantas y a las técnicas de mejora tradicional sino como un complemento. El ingeniero genético trabaja, en general, sobre variedades ya mejoradas.

A pesar del éxito de la conocida Revolución Verde (2) liderada en el siglo pasado por la obtención de los trigos híbridos enanos de Norman Borlaug, la mecanización del campo y el uso de fertilizantes y plaguicidas, hoy, 800 millones de personas pasan hambre o sufren malnutrición por defecto mientras que, también hoy, más de 800 millones son personas obesas y sufren, o sufrirán con alta probabi-

lidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares derivadas de un exceso o de una incorrecta alimentación.

Al margen de las valoraciones éticas o sociopolíticas que nos pueda merecer esta situación, está claro que tenemos ciertas deficiencias tecnológicas para garantizar una correcta alimentación y una buena salud para las generaciones futuras. La agricultura industrializada, heredera de las prácticas de la segunda Revolución Verde, es hoy muy productiva, aunque gasta muchos recursos al tiempo que también contamina mucho. De acuerdo con estimaciones de la FAO y de la Comisión Europea, la producción de alimentos necesitará seguir aumentando en el futuro inmediato (20, 25), y los alimentos deberán ser de alta calidad, seguros y baratos (3, 4). El reto consiste en dar un salto tecnológico a un tipo de agricultura sostenible capaz de producir más, utilizando menos recursos y contaminando menos y que, sobre todo, permita incorporar sus desarrollos a la práctica de la agricultura de subsistencia, práctica a la que están condenados hoy un gran número de agricultores, básicamente en el tercer mundo. No parece que para estos fines vayan a ser significativas *per se* las prácticas de la agricultura orgánica o agricultura ecológica (5, 6) que produce un tipo de alimento que responde, en parte, a las demandas de algunos ciudadanos del mundo desarrollado que, en casos extremos sufren una adicción enfermiza a los alimentos supuestamente naturales, denominada en términos psiquiátricos «Ortorexia» (7), adicción que afecta ya al 1 por 100 de los adultos jóvenes españoles y que viene a sumarse a los trastornos de la conducta alimentaria propios de los países que disponen de un exceso de alimentos.

La ingeniería genética, sin embargo, sí dispone de un potencial para contribuir a caminar en la dirección deseada (8). La ingeniería genética necesita, en primer lugar, disponer de métodos para identificar y aislar los genes responsables del carácter a modificar; asimismo, necesita disponer o desarrollar tecnologías de transformación genética no sólo para la especie sino, a veces, para la variedad que se desea mejorar. Recientemente se ha producido un avance en el desarrollo de genes delatores que permiten visualizar los transformantes *in vivo* en las primeras etapas de la transformación genética. Un ejemplo es el uso del gen que codifica para la proteína fluorescente GFP aislada de la medusa *Aequorea victoria*. El uso de la GFP ha sido muy útil en nuestro laboratorio en el desarrollo

de un método de transformación genética en el melocotonero para el que no existe alternativa actualmente (9). Conseguida la transformación genética estable, estamos en condiciones de abordar la introducción de genes que mejoren las características productivas o el comportamiento frente a diferentes estreses de los melocotoneros con el fin de producir plantas que se puedan incorporar a los programas de mejora. Nuestro método ya ha sido utilizado con éxito para transformar varias especies de *Prunus* ornamentales en Agriculture and Agri-Food Canada (comunicación personal de su director Daniel Brown).

Sólo si disponemos de los genes adecuados de las regiones promotoras para dirigir la expresión de los mismos a los órganos o tejidos «diana» y de los métodos de transformación específicos para la especie o incluso la variedad a mejorar, será posible construir estrategias para desarrollar plantas más productivas y con mayor valor nutricional, con un mejor comportamiento frente a condiciones adversas o, incluso, convertirlas en bio-factorías para la producción de compuestos de interés farmacológico o médico (10). La biotecnología vegetal también presenta algunos aspectos socialmente controvertidos a los que me referiré brevemente al final del artículo (11).

Plantas transgénicas que producen moléculas de interés farmacológico

Durante las últimas dos décadas no han cesado de aumentar los ejemplos de producción de moléculas de interés médico y farmacológico en plantas modificadas por ingeniería genética. Sin ánimo de ser exhaustivos, se puede producir ya en plantas la hormona del crecimiento humano; IgGs; la albúmina del suero humano; vacunas contra el virus de la hepatitis B; la alfa amilasa de uso industrial; IgAs; la elastina; la avidina; el colágeno humano; vacunas multi componentes contra la toxina del cólera y otros enteropatógenos; la proteína insecticida Bt; la tripsina bovina o conseguir la producción de anticuerpos en algas (12).

Por otra parte, aunque la primera generación de variedades transgénicas, con interés comercial, ha consistido básicamente de plantas de maíz resistentes a insectos y de plantas de soja tolerantes al

herbicida glifosato obtenidas por modificación de un solo gen, ya se está preparando la segunda generación con la que se persigue disponer de plantas con mayor valor nutricional, lo que a veces conlleva la modificación/introducción simultánea de varios genes (10).

De hecho, se intenta la producción de alimentos transgénicos funcionales, que son aquellos que, independientemente de su valor nutritivo, aportan algún componente importante para la salud del consumidor. Quizás el exponente más claro de este tipo de plantas sea el denominado «arroz dorado», desarrollado por Ingo Potrykus, arroz modificado por ingeniería genética para producir carotenoides con el objetivo de suplir la deficiencia en Vitamina A de más de 120 millones de personas malnutridas debido a la ingesta de dietas basadas en este cereal, con escaso o nulo consumo de frutas, legumbres y alimentos de origen animal. El arroz sólo posee parte de la ruta metabólica que produce la provitamina A. Potrykus y sus colaboradores introdujeron en el mismo los genes que codifican los enzimas fitoeno sintasa y licopeno ciclasa (ambos aislados del narciso) y la fitoeno desaturasa (aislado de *Erwinia uredovora*) completando así dicha ruta metabólica (13). Esta variedad transgénica se ha incorporado a los programas de mejora genética tradicional del «Internacional Rice Research Institute» de Filipinas para transferir esta característica a las variedades autóctonas de uso en China, India, Sudeste asiático, África y América Latina (14).

La tecnología para insertar los enzimas de la vía de biosíntesis de fitoeno está pues disponible y, en la actualidad, se obtienen las primeras cosechas enriquecidas en beta-caroteno de oleaginosas de la importancia agronómica de la colza (*Brassica napus*) y de la mostaza parda (*Brassica juncea*) (15).

Los tocotrienoles y tocoferoles (vitamina E) no se sintetizan en los mamíferos, por lo que se consideran un componente esencial de su dieta. La síntesis de tocotrienol comienza con la condensación de ácido homogentísico y geranil-geranil difosfato. Se ha clonado el gen responsable de esta reacción de condensación en arroz, cebada y trigo. La expresión del gen de cebada en maíz ha servido para producir una variedad transgénica que posee seis veces más tocotrienol (16). Actualmente, se está evaluando el efecto *in vivo* de estos derivados de la vitamina E (17).

El problema de la deficiencia en hierro de la población cuya dieta se basa en el arroz se intenta aliviar mediante la obtención de variedades transgénicas de dicho cereal, que expresan los genes que codifican proteínas que acomplejan y almacenan hierro como la ferritina de judía (18). Ensayos con ratas anémicas demostraron que es posible la recuperación de la enfermedad tras veintiocho días de dieta con arroz transgénico que expresa la ferritina de judía (19).

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas que poseen propiedades funcionales entre las que destacan su capacidad antioxidante y su acción vasodilatadora. Recientemente, se ha clonado el gen de tomate que codifica la hidroxicianomil-Co A quinasa, un enzima clave para la síntesis de ácido clorogénico, flavona que previene la aparición de aterosclerosis. Dicho gen se ha expresado en múltiples copias en tomates transgénicos de manera que éstos tienen un aumento del 10 por 100 en los niveles de ácido clorogénico. Este pequeño incremento aumenta grandemente la capacidad antioxidante de los frutos (20).

Por otra parte, es sabido que las proteínas de las legumbres son deficientes en aminoácidos azufrados mientras que las de los cereales tienen bajo contenido en isoleucina y lisina. Pues bien, se ha conseguido desarrollar una variedad transgénica de arroz que sintetiza faseolina, una proteína de reserva de la judía (21). De igual manera, se ha conseguido mejorar las legumbres mediante la expresión de genes que codifican proteínas ricas en metionina provenientes de arroz, maíz, y girasol (22, 23). También es posible aumentar el nivel de lisina en patatas transgénicas mediante la introducción de genes bacterianos que codifican enzimas de la vía de biosíntesis de lisina que escapan al proceso de inhibición «feed-back» que caracteriza dicha ruta metabólica (24).

La mejora de la composición nutricional de los aceites se ha abordado por técnicas de ingeniería genética (25). En 2005, se espera la primera liberación comercial de plantas de algodón modificadas genéticamente con altos contenidos de ácidos oleico y esteárico y bajos niveles de palmitato dirigidas a la producción de margarinas (26). Los ácidos grasos polinsaturados (PUFA) como el ácido araquidónico y el eicosapentanoico son precursores de las prostaglandinas, participan en el desarrollo del cerebro y de la retina y se

les asocia con la prevención de enfermedades cardiovasculares. Los PUFA se sintetizan sólo en los mamíferos. Recientemente, se han descrito plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* capaces de sintetizar estos compuestos (27). Los mismos autores anuncian la inmediata producción de plantas transgénicas de soja capaces de producir PUFA.

Aunque sólo una pequeña parte de las aplicaciones aquí descritas y de otras muchas están próximas a incrementar la lista de alimentos transgénicos disponibles en los mercados, basta repasar el listado para ser optimistas sobre los objetivos y logros de esta segunda generación de plantas transgénicas.

EL ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE MUTANTES HOMEÓTICOS DE DESARROLLO FLORAL ABRIÓ LAS PUERTAS A LA BIOTECNOLOGÍA DE LAS FLORES Y DE LOS FRUTOS

Durante los últimos años hemos estudiado la biología del desarrollo floral en angiospermas, utilizando el análisis genético y molecular de los procesos de transición floral y de la ontogenia de flores y frutos. Este tipo de abordaje experimental ha permitido comprender en sistemas modelo, fundamentalmente *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana*, el conjunto de genes reguladores que gobiernan dichos procesos (28).

Todo comenzó con el análisis molecular de mutantes homeóticos del desarrollo floral, algunos ya observados por Goethe en su tiempo, y posteriormente, guardados celosamente en bancos de germoplasma alemanes y británicos, a pesar de la aparente inutilidad de dichos monstruos (29).

En *Antirrhinum majus* hay disponibles líneas que contienen elementos transponibles activos: los famosos genes saltarines cuyo descubrimiento le valió la obtención del Premio Nobel a Bárbara McClintock. En sus flores el fenómeno se puede visualizar observando los sectores coloreados que provoca en el pétalo el salto de uno de estos elementos, al recuperar todas las células derivadas de aquella que sufre el salto inicial, la capacidad de sintetizar pigmentos

antocianos. El número de saltos se puede aumentar cambiando las condiciones de temperatura. Este fenómeno abre la posibilidad de etiquetar genes con elementos transponibles y desvelar la identidad molecular de los genes asociados a mutaciones concretas.

En el caso del gen *Deficiens*, disponíamos de una serie alélica, lo que facilitó el análisis molecular de las mutaciones en dicho gen y de sus consecuencias. En el caso de *deficiens-globifera*, podemos observar un fenotipo correspondiente a una mutación homeótica en la que los pétalos se transforman en sépalos y los estambres se transforman en carpelo. Alteraciones fenotípicas de carácter homeótico que muestran patrones de cambio conservados se pueden observar en flores de plantas de especies distintas y por supuesto también en las flores de *Arabidopsis thaliana*, la brásica convertida en planta modelo por excelencia.

Nosotros pudimos aislar y caracterizar a nivel molecular el gen *Deficiens* que resultó ser un activador transcripcional y primer miembro descubierto de la familia de genes MADS-box, cuya D corresponde a *Deficiens* (30, 31). Mutaciones en el gen ortólogo de *Deficiens* en *Arabidopsis*, denominado *Apetala-3* causan igualmente un fenotipo de pérdida de función B consistente en las mencionadas transformaciones homeóticas en el segundo y tercer verticilos florales.

El análisis genético molecular de los mutantes homeóticos de desarrollo floral ha permitido establecer el denominado modelo ABC que explica la formación e identidad de los verticilos florales de acuerdo con tres tipos de actividades básicas, A, B y C, de forma que en el territorio donde se expresa la actividad A se forma un sépalo; A y B en el mismo lugar darán lugar a la formación de un pétalo, mientras que B y C especifican el órgano sexual masculino o estambre, y C especifica el órgano sexual femenino, el carpelo (28).

Basados en este modelo y con los genes responsables de las actividades A, B y C aislados es posible diseñar flores de *Arabidopsis* que tienen en cada verticilo la clase de órgano que deseemos. De la misma manera que el triple mutante abc tiene, como postula el modelo, todos los órganos de los verticilos de la flor transformados en hojas, hecho curiosamente ya anticipado por Goethe y que provocó hilaridad entre los científicos de su tiempo.

LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANDROESTÉRILES COMO EJEMPLO DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUCIR LAS PLANTAS DEL FUTURO

Nosotros trabajamos fundamentalmente con leguminosas, en concreto con el guisante como planta de interés agronómico; aunque también hemos desarrollado diversos programas de genética reversa como la del RNAi y el etiquetado de genes por Tnt1 de tabaco en *Medicago truncatula*, leguminosa que utilizamos como modelo experimental para estudiar la arquitectura de la planta y el desarrollo de flores y frutos (32-42).

El inicio del proyecto: la búsqueda de marcadores moleculares del desarrollo floral

Hace años nos planteamos la necesidad de producir marcadores moleculares que permitieran identificar mezclas de órganos y tejidos en mutantes homeóticos florales con transformaciones incompletas. Elegimos como alternativa la producción de anticuerpos monoclonales que reconocieran proteínas expresadas específicamente en un órgano floral (43). La estrategia, sencilla en su planteamiento y tediosa en su ejecución, pasaba por conseguir extractos de proteínas de los distintos órganos florales y sus correspondientes anticuerpos policlonales. Cada extracto proteico se sometió a inmunosustracción con los anticuerpos policlonales obtenidos contra las proteínas de los otros órganos con el fin de inmunosustraer las proteínas comunes. Con aquellas proteínas de cada extracto que no se pudieron inmunosustraer (0,2 por 100 de las iniciales), generamos anticuerpos monoclonales. Es así como obtuvimos una pequeña colección de marcadores moleculares específicos de órgano floral. Pronto llamó nuestra atención uno que habíamos denominado A1. El anticuerpo A1 reconoce una proteína que se expresa específicamente en estambres, tal y como desveló el análisis Western. Se trata de una proteína de 26 kDa que las inmunolocalizaciones muestran que está presente exclusivamente en las anteras.

Utilización del anticuerpo monoclonal A1: desde el producto génico al gen codificante *END1*

Los estambres están formados por el filamento y por la antera. Descartada la expresión en los filamentos se trataba de conocer en qué tipos celulares de las anteras se expresa el producto génico reconocido por el anticuerpo A1. Veamos, en primer lugar, la estructura de las anteras. Una sección transversal de la antera nos muestra las tres capas celulares iniciales L1, L2 y L3 del primordio estaminal y los tipos celulares a los que dan lugar en la antera madura, epidermis, endotecio, tapetum externo, tapetum interno, tejido conectivo y haz vascular que estructuran la antera en dos tecas con cuatro sacos polínicos. Disponer del anticuerpo monoclonal A1 nos permitió aislar por cromatografía de afinidad la proteína que reconoce; y aplicando técnicas de microsecuenciación, pudimos desvelar los primeros veinte aminoácidos de su extremo amino terminal. Esto hizo posible que diseñáramos una estrategia para aislar, primero, el cDNA correspondiente al gen y, luego, el DNA genómico correspondiente. La disponibilidad del cDNA nos permitió dos tipos de análisis de la expresión del gen, de tipo Northern y de hibridación *in situ*. El análisis Northern confirmó que el gen es específico de estambres y que dentro de los estambres se expresa en las anteras y no lo hace en filamento, tubo estaminal y granos de polen. Estos resultados se corroboraron y ampliaron por experimentos de hibridación *in situ* que mostraron que el gen, al que denominamos *END1*, tiene un patrón de expresión temporal desde el momento en que las primeras células adquieren la identidad de primordio estaminal hasta la dehiscencia de la antera, así como que, espacialmente, se expresa en epidermis, endotecio y tejido conectivo, esto es, en los tejidos que más contribuyen a dar soporte estructural a las anteras. Experimentos de inmunolocalización confirmaron que la proteína END1 tiene el mismo patrón de expresión espacio-temporal que el correspondiente mRNA.

El análisis tipo Southern mostró un patrón de restricción indicativo de que el gen END1 se encuentra como gen de copia única en el genoma del guisante.

El patrón de expresión espacio-temporal de *END1* y la funcionalidad de su región promotora en especies heterólogas sugieren su potencial uso biotecnológico

El guisante es una planta recalcitrante desde el punto de vista de la transformación genética. Por ello, decidimos realizar estudios de funcionalidad del promotor de *END1* en sistemas heterólogos como *Arabidopsis*, tabaco y tomate con dos objetivos: comprobar si la región promotora es capaz de dirigir la expresión de genes a las anteras de dichas especies y, en caso positivo, determinar la región promotora mínima.

El promotor del gen *END1* de guisante resultó ser funcional también en *Arabidopsis*, tabaco y tomate, al ser capaz de dirigir la expresión del gen delator *GUS* a la epidermis, endotecio y tejido conectivo de las anteras de plantas transgénicas de dichas especies (40).

El análisis *in silico* de la región 5' de *END1* nos permitió localizar distintos motivos o elementos presentes en otras regiones promotoras de genes específicos de anteras y, especialmente, nos llamó la atención la presencia de posibles cajas CArG, que son elementos en cis reconocidos por los factores transcripcionales codificados por los genes MADS-box.

Para caracterizar la región promotora mínima capaz de mantener el patrón de expresión espacio-temporal del gen *END1*, realizamos diversas deleciones sucesivas e internas de posibles elementos reguladores. El análisis de funcionalidad se llevó a cabo en plantas transgénicas de *Arabidopsis* utilizando como gen delator el gen *GUS* y evaluando la expresión de la correspondiente proteína colorimétricamente. A tal fin, clasificamos la expresión de *GUS* como fuerte, moderada, débil o ausente. La deleción de la zona comprendida entre los nucleótidos -685 y -426 mostró que dicha zona contiene elementos reguladores positivos. Asimismo, entre los nucleótidos -426 y -386 observamos la presencia de elementos reguladores negativos. Entre los nucleótidos -336 y -309 hay elementos imprescindibles para la expresión del gen ya que en su ausencia se pierde completamente la capacidad de dirigir la expresión de *GUS*. Estos resultados muestran que la región comprendida entre -336/-6 define la secuencia 5' de la región promotora mínima para la correcta expresión espacial y temporal del gen.

Los experimentos de deleciones internas nos llevan a concluir que en las regiones adyacentes -336/-347 y -347/-309 hay elementos con funciones redundantes para la expresión del gen. El efecto observado al eliminar la región -225/-208 desvela la existencia de un elemento represor o, alternativamente, el acercamiento de dos elementos reguladores positivos cercanos. Finalmente, la eliminación del motivo CArG contenido entre -115/-99 desvela que dicho motivo es esencial para la regulación de la expresión de *END1*. Por tanto, concluimos que *END1* podría ser un gen «diana» de los genes de identidad de órgano floral que especifican el estambre.

El patrón de expresión espacio-temporal del gen *END1* de guisante y la funcionalidad de su región promotora en otras especies nos sugirió la posibilidad de aplicar su uso a la obtención de plantas androestériles.

La producción de plantas de cosecha híbridas, clave para aumentar la cantidad y la calidad de los alimentos

Biotecnológicamente, es posible utilizar estrategias de ingeniería genética para producir la ablación celular. Para ello, es necesario disponer de un promotor que pueda dirigir la expresión de un agente citotóxico en las células que se pretenden destruir y contar con un sistema de transformación genética eficaz para la especie o variedad deseada. Ejemplos de agentes citotóxicos empleados son diversas proteasas, lipasas, RNasas, toxinas como DTA y la exotoxina A entre otros. Nosotros seleccionamos el gen de la barnasa, una ribonucleasa de *B. amyloliquefaciens* para el que se dispone de otro gen que codifica el barstar, que es un inhibidor específico de la barnasa.

Si se reprodujera el patrón de expresión del gen *END1* en el guisante en otras especies, una planta transgénica que porte una construcción pEND1::barnasa comenzaría a expresar el gen citotóxico en las células parietales primarias, lo que afectaría a la diferenciación de las células esporógenas y produciría de manera eficaz plantas con esterilidad masculina.

La producción de líneas vegetales puras con esterilidad masculina garantiza la posibilidad de producir híbridos mediante cruces

dirigidos. Recordemos que los híbridos se caracterizan por un fenómeno no comprendido a nivel molecular conocido con el nombre de heterosis y que los hace ser más vigorosos y productivos que las líneas puras parentales. De hecho, la utilización de híbridos fue una de las bases de la segunda Revolución Verde. Si las líneas parentales femeninas son androestériles porque expresan en las anteras el gen de la barnasa, la fertilidad en los híbridos se podría restaurar si la línea parental masculina expresara en los mismos tejidos de la antera el gen *barstar*, que es su inhibidor específico.

La construcción *pEND1::barnasa* produce plantas transgénicas androestériles de *Arabidopsis*, tabaco, tomate y colza

La expresión del gen de la barnasa dirigida por el promotor del gen *END1* de guisante en plantas de *Arabidopsis* tiene como consecuencia la producción de plantas androestériles, siendo posible aislar líneas con 100 por 100 de androesterilidad. No se producen otros efectos fenotípicos, excepto que las plantas son más longevas y producen un mayor número de flores. De hecho, se puede observar que los estambres de las plantas transgénicas son más cortos que los silvestres ya que sus filamentos sólo alcanzan una longitud de la tercera parte de la esperada. Además, las anteras presentan malformaciones evidentes y los tipos celulares de su superficie recuerdan más a los tipos del filamento que a las células estrelladas de la superficie de las anteras.

Para comprobar la posibilidad de restaurar la fertilidad de la descendencia híbrida, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* y se seleccionaron plantas homocigotas para el transgén *barstar*. Se realizó un cruce entre una planta de una línea hemicigota *END1::barnasa* y una planta de una línea homocigota *END1::barstar* y se estudió su descendencia.

Se pudo observar el efecto esperado si el inhibidor es capaz de impedir la acción de la barnasa. La descendencia mostraba estambres normales y fertilidad restaurada. Por tanto, concluimos que es posible utilizar un abordaje de ingeniería genética basado en las características del promotor del gen *END1* de guisante para producir

semillas híbridas. Este procedimiento fue objeto de una patente internacional adquirida por la empresa NewBiotechnic (44).

De igual manera, si comparamos plantas transgénicas de tabaco que expresan en anteras el gen de la barnasa con las correspondientes silvestres, se observa una mayor longevidad y una mayor producción de flores en las transgénicas. El fenotipo de las anteras transgénicas mostraba una malformación que les da aspecto de punta de flecha. Si observamos las anteras por microscopía electrónica de barrido concluimos que las anteras transgénicas, además de deformadas externamente, carecen de granos de polen en su interior, aspecto este último también visible por microscopía óptica en cortes transversales de las anteras.

En las plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen de la barnasa en sus anteras son incluso más llamativos los efectos de longevidad y la mayor producción de número de flores que lo eran en *Arabidopsis*.

Las plantas transgénicas de tomate cv. Microton pEND1::*barnasa* mostraban malformaciones en la anteras ya que no forman correctamente el cono estaminal capaz de mantener encerrado al carpelo. Las plantas con los fenotipos más extremos permiten observar a simple vista el ovario con el estilo y el estigma.

En secciones transversales de tomate se puede comprobar como la construcción pEND1::*GUS* es capaz de expresar GUS en la epidermis, endotecio y tejido conectivo de las anteras de plantas transgénicas, mientras que la construcción pEND1::*barnasa* produce malformaciones severas que impiden el correcto desarrollo de los sacos polínicos.

El potencial biotecnológico del promotor pEND1 se extiende a la producción de frutos partenocárpico en tomate y a la modificación de monocotiledóneas de alto valor agronómico como arroz y trigo

La ablación de las anteras en plantas transgénicas de tomate induce el desarrollo de frutos partenocárpico. Hasta ahora, la partenocarpia en tomate se había observado en algunas mutaciones

homeóticas como las de pérdida de función B, es decir, en flores en los que los pétalos se han transformado en sépalos y los estambres se han transformado en carpelo, por lo que se había planteado la posibilidad de que la ausencia de estambres estuviera relacionada con el desarrollo de frutos partenocárpicos. Sin embargo, la emasculación o eliminación manual de los estambres no induce partenocarpia en los frutos. Estos experimentos constituyen la primera prueba inequívoca de que la eliminación de los estambres en los estadios iniciales de su desarrollo es suficiente para provocar la partenocarpia. Probablemente, los estambres producen un inhibidor del desarrollo del fruto que se formaría por defecto en ausencia del mismo. En la actualidad, estamos llevando a cabo el análisis genético molecular de los frutos partenocárpicos con objeto de desvelar el gen o los genes implicados en el desarrollo partenocárpico de frutos.

Este procedimiento de ingeniería genética ha sido objeto de patente (45), cuyos derechos han sido adquiridos por la empresa New-Biotechnic.

Por un lado, la producción de frutos sin semillas es de mucho interés para los agricultores puesto que permite cultivar el tomate y producir frutos fuera del margen de temperaturas en el que la formación de granos de polen es viable; por otro lado estos frutos también son de interés para los industriales de producción de sopas, pastas y salsas de tomate porque les permite suprimir la etapa de filtrado de la pulpa para eliminar las semillas ya que su presencia termina por transmitir sustancias que perjudican el sabor y el valor nutritivo de los productos. Los frutos sin semillas también son apreciados en tecnología culinaria al tiempo que son preferidos por un sector de los consumidores.

Si observamos el interior de los frutos de tomate podemos comprobar el correcto desarrollo de los frutos transgénicos cuya única diferencia con los frutos silvestres es la ausencia de semillas. La maduración de los tomates partenocárpicos es normal y culminan su desarrollo presentando sus lóbulos rellenos de pulpa de un color rojo intenso. En la actualidad, estamos realizando experimentos con cultivares comerciales de tomate con objeto de valorar la productividad de las plantas transgénicas y las características y composición nutricional de los frutos.

Por otra parte, la empresa NewBiotechnic, en colaboración con el consorcio alemán Centrum für Grüne Gentechnik DLR, ha comprobado que la tecnología para producir plantas androestériles es eficaz asimismo en colza. Las flores con fenotipo intermedio o severo en la malformación de las anteras resultaron ser androestériles. También estamos desarrollando, en colaboración con otros laboratorios, estudios de funcionalidad del promotor del gen *END1* de guisante en otras especies de interés agronómico con objeto de comprobar la viabilidad de utilizarlo para dirigir la expresión de genes foráneos a los estambres de dichas especies. Así, en colaboración con investigadores del IRTA, hemos producido plantas transgénicas pEND1::*GUS* de arroz. Hemos podido comprobar la expresión de GUS específicamente en las anteras y las lodículas de la flor de arroz. De igual manera, en colaboración con investigadores del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba, hemos podido confirmar que el promotor pEND1 es también funcional en trigo.

CONCLUSIÓN

He pretendido mostrar alguna de las posibles aplicaciones de la ingeniería genética para mejorar las plantas cultivadas derivadas de nuestro trabajo sobre la biología del desarrollo floral. Algunas de ellas, como la producción de híbridos, la producción de frutos partenocárpicos o la disponibilidad de un método para evitar la transferencia horizontal indeseada de genes son ya una realidad, mientras que otras, como el aumento del número de flores por planta, la obtención de plantas con flores más resistentes a las bajas temperaturas o al estrés hídrico o la modificación de la distribución de energía para favorecer el desarrollo de las partes vegetativas están todavía en fase de experimentación.

Quisiera llamar la atención sobre varios aspectos de este trabajo. En primer lugar, que las aplicaciones surgen como consecuencia de la observación de unos resultados que inicialmente nos planteamos desde una perspectiva básica: disponer de marcadores moleculares para identificar células y tejidos florales, corroborando una vez más que no hay la ciencia básica y la aplicada sino la Ciencia y sus aplicaciones.

En segundo lugar, merece especial atención el hecho del amplio espectro de especies en el que el promotor pEND1 es funcional; funcionalidad que traspasa el límite entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Esta característica podría dar la imagen falsa de que, una vez aislado un promotor, su utilización funcional es generalizable a las distintas especies y variedades de interés agronómico. ¡Nada más lejos de la realidad! De la misma manera que para evitar falsas expectativas, hay que recordar la existencia de numerosas especies y variedades recalcitrantes a la transformación genética, hecho este que limita el número de aplicaciones posibles en la actualidad.

EPÍLOGO

En este trabajo he pretendido mostrar, a partir de trabajos desarrollados en mi laboratorio, algunos aspectos del «estado del arte» de los avances tecnológicos que comienzan a permitir la modificación dirigida de las plantas con objeto de producir compuestos útiles para la nutrición adecuada y la buena salud de las personas. Es de esperar que los recientes avances en tecnologías «ómicas» ayuden a diseñar nuevas estrategias en los próximos años.

La tradicional búsqueda, aislamiento y uso de compuestos de interés nutricional y farmacológico entre los productos naturales de las plantas se complementa ahora con la utilización de las plantas como biofactorías en un campo científico-técnico emergente: la Agricultura molecular. En este contexto, la Ingeniería Genética se presenta como llave o clave para abrir las puertas de dicha disciplina y conviene recordar que las llaves pueden ser útiles para abrir puertas y acceder a nuevos caminos. Sin embargo, al abrir estas puertas es necesario hacer una valoración adecuada de los beneficios y riesgos que estos abordajes conllevan (11). Pienso que los beneficios son claros.

Respecto de los riesgos, se suelen resumir en riesgos para la salud por el consumo de organismos modificados genéticamente y riesgos para el medio ambiente. No existiendo el «riesgo cero» en ninguna tecnología, me atrevería a aseverar que, desde el punto de vista de la salud y la nutrición, los alimentos transgénicos son los alimentos más seguros de los que nunca haya dispuesto la humanidad.

Respecto de los riesgos medioambientales, sin que se puedan generalizar, convendría realizar un análisis exhaustivo, caso por caso.

En mi humilde opinión, añadiría un nuevo riesgo que deberíamos evitar: «el riesgo de no desarrollar las capacidades para mejorar las propiedades de las plantas», es decir, que un riesgo importante de los transgénicos consiste en no hacerlos. En nuestro país, algunos colegas han visto recientemente cómo el fundamentalismo de unos pocos se tornaba en destrucción, delictiva, de sus campos experimentales en los que se crecían, legalmente, cosechas de plantas mejoradas biotecnológicamente para contribuir a desarrollar una agricultura menos contaminante. Pienso que entre todos debemos conseguir que los científicos de este campo, también los españoles, no tengan que identificarse con el famoso «grafitti» de Bogotá que decía: «Y cuando sabíamos la respuesta... nos cambiaron la pregunta».

AGRADECIMIENTOS

La realización de los trabajos aquí descritos no hubiera sido posible sin la participación de numerosas personas, entre las que hay que destacar a Luis Cañas, María Dolores Gómez, Edelín Roque, Cristina Ferrándiz y Francisco Madueño. También hay que destacar el excelente trabajo de los técnicos Teresa Caballero y Mari Cruz Rochina, y el cuidado de las plantas en el invernadero de Rafael Martínez Pardo y Antonio Villar. Asimismo estos trabajos han sido financiados parcialmente por diferentes proyectos de la UE (Bridge PL89004) de convocatorias públicas estatales (CICYT BIO97-0583; BIO2000-0940; BIO2003-01171) y de la Generalitat Valenciana (GV 03/66).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) FOLCH, G. (1986) *Historia General de la Farmacia. El medicamento a través del tiempo*. Ediciones Sol. Madrid. ISBN 84 86624 00 2.
- (2) GARCÍA OLMEDO, F. (1998) *La Tercera Revolución Verde. Plantas con luz propia*. Ed. Debate, Madrid.
- (3) FAO. (2004) *The State of Food and Agricultura: Agricultural Biotechnology, meeting the needs of the poor?* 209 pp. ISBN 92 5 105079 1.

- (4) EUROPEAN COMMISSION. (2004) Position paper: Plants for the Future. 22 pp.
- (5) GEWIN, V. (2004) Organic FAQs. *Nature* 428: 796-798.
- (6) MACILVAIN, C. (2004) Organic: Is it the future of farming? *Nature* 428: 792-793.
- (7) GARCÍA OLMEDO, F. (2004) Ortorexia: la obsesión por los alimentos naturales. *Revista de Libros* n.º 96, pp. 26-27. Diciembre 2004.
- (8) RAMÓN, D. (1997) *Los genes que comemos*. Ed. Bromera. Alzira. Valencia.
- (9) PÉREZ-CLEMENTE, R. M.; PÉREZ-SANJUÁN, A.; GARCÍA-FERRIZ, L.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2004) Transgenic peach plants (*Prunus persica* L.) produced by genetic transformation of embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as an *in vivo* marker. *Molecular Breeding* 14: 419-427.
- (10) CHRISPEELS, M. J.; SADAVA, D. E., eds. (2003) *Plants, Genes and Crop Biotechnology*. Jones and Bartlett Pub. EEUU. ISBN 0 7637 1586 7.
- (11) BELTRÁN, J. P. (2003) Transgénicos o no Transgénicos ¿es esa la cuestión? En *Cognitio atque Inventio*. Ed. Agustín Andreu. Colección Leibnizius Politechnicus n.º 5, pp. 93-110. Aula Atenea de Humanidades. Universidad Politécnica de Valencia. ISBN: 84-9705-301-X.
- (12) FISCHER, R.; SCHILLBERG S. (2004) *Molecular Farming. Pharmaceuticals and Technical Proteins*. John Wiley & Sons Ed. ISBN 3527307869.
- (13) YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. (2000) Engineering the provitamin A (B-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- (14) BEYER, P.; AL-BABILI, S.; YE, X.; LUCCA, P.; SCHAUB, P.; WELSCH, R.; POTRIKUS, I. (2002) Golden Rice: introducing the b-carotene biosíntesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. Abstracts Symposium Plant Breeding: a new tool for fighting micronutrient malnutrition 506S-510S.
- (15) MACKAY, M. (2002) The application of biotechnology to nutrition: an overview. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21:157S-160S.
- (16) CAHOON, E. B.; HALL, S. E.; RIPP, K. G.; GANZKE, T. S.; HITZ, W. D.; COUGHLAN, S. J. (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* 21: 1082-1087.
- (17) DORMAN, P. (2003) Corn with enhanced antioxidant potential. *Nature Biotechnology* 21: 1015-1016.
- (18) LUCCA, P.; HURRELL, R.; POTRYKUS, I. (2002) Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21: 184S-190S.
- (19) MURRAY-KOLB, L. E.; TAKAIWA, F.; GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; THEIL, E. C.; BERAD, J. L. (2002) Transgenic rice is a source of iron for iron- depleted rats. *J. Nutrition* 132: 957-960.
- (20) NIGGEWEG, R.; MICHAEL A. J.; MARTIN, C. (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22: 746-754.
- (21) ZHENG, Z.; SUMI, K.; TANAKA, K.; MURAI, N. (1995) The bean seed B-phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type-II protein bodies of transgenic rice endosperm. *Plant Physiol.* 109: 777-786.

- (22) ALTENBACH, S. B.; SIMPSON, R. B. (1990) Manipulation of methionine-rich protein genes in plant seeds. *Trends in Biochemistry* 8: 156-160.
- (23) DE CLERQ A.; VANDEWIELE, M.; VAN DAMME, J.; GUERCHE, P.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCKOVE, J.; KREBBERS, E. (1990) Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. *Plant Physiol.* 94: 970-979.
- (24) SEVENIER, R.; VAN DER MEER, I. M.; BINO, R.; KOOPS, A. J. (2002) Increased production of nutriment by genetically engineered crops. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21: 199S-204S.
- (25) KIDNEY, A. J. (1996) Designer oils for better nutrition. *Nature Biotechnol* 14: 946.
- (26) LIU, Q.; SINGH, S.; GREEN, A. (2002) High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21: 205S-211S.
- (27) QI, B.; FRASER, T.; MUGDORF, S.; DOBSON, G.; SAYANOVA, O.; BUTLER, J.; NAPIER, J. A.; STOBART, A. K.; LAZARUS, C. M. (2004) Production of very long Caín polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnol.* 22: 739-745.
- (28) WEIGEL, D.; MEYEROWITZ, E. M. (1994) The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 7: 203-209.
- (29) GOETHE, J. W. (1790) Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären. C. W. Ettinger, Gotha.
- (30) SOMMER, H.; BELTRÁN, J. P.; HUIJSER, P.; PAPE, H.; LÖNING, W. E.; SAEDLER, H.; SCHWARZ-SOMMER, Z. S. (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein has homology to transcription factors. *EMBO J.* 9: 605-613.
- (31) NACKEN W. K. F.; HUIJSER, P.; BELTRÁN, J. P.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. (1991) Molecular characterization of two stamen-specific genes, *tap1* and *fil1*, that are expressed in the wild type, but not in the *deficiens* mutant of *Antirrhinum majus*. *Mol. Gen. Genet.* 229: 129-136.
- (32) BELTRÁN, J. P. (1991) A flourishing time for flower development. *The New Biologist* 3: 667-670.
- (33) GARCÍA MARTÍNEZ, J. L.; BELTRÁN, J. P. (1992) Interaction between vegetative and reproductive organs during early fruit development in pea. In *Progress in Plant Growth Regulation*. C. M. Karssen, L. C. Van Loon, D. Vreugdenhil Eds. pp. 401-410, Kluwer Acad. Publ.
- (34) RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BELTRÁN, J. P. (1995) Repression of the pea lipoxygenase gene *loxg* is associated with carpel development *Plant Mol. Biol.* 27: 887-899.
- (35) RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; GÓMEZ, M. D.; BELTRÁN, J. P. (1996) Immunolocalization of lipoxygenase in pea (*Pisum sativum* L.) carpels. *Plant Cell Rep.* 15: 620-626.
- (36) BELTRÁN, J. P.; FERRÁNDIZ, C.; GÓMEZ, M. D.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; PÉREZ, A.; NAVARRO, C.; CAÑAS, L. (1996) The use of homeotic mutants to study flower development in *Pisum sativum* L. *Flowering Newsletter* 22: 41-48.

- (37) FERRÁNDIZ, C.; NAVARRO, C.; GÓMEZ, M. D.; CAÑAS, L.; BELTRÁN, J. P. (1999) Flower development in *Pisum sativum*: from the war of the whorls to the battle of the common primordia. *Dev. Genet.* 25: 280-290.
- (38) RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; PÉREZ-GARCÍA, A.; BELTRÁN, J. P. (2001) Up-regulation of genes encoding novel extracellular proteins during fruit set in pea. *Plant Mol. Biol.* 46 (4): 373-382.
- (39) BERBEL, A.; NAVARRO, C.; FERRÁNDIZ, C.; CAÑAS, L. A.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J. P. (2001) Analysis of *PEAM4*, the *API* functional homologue, supports a model for *API*-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *The Plant Journal* 25 (4): 441-451.
- (40) BELTRÁN, J. P.; GÓMEZ, M. D.; ROQUE, E.; MADUEÑO, F.; CAÑAS, L. A. (2002). Biotechnological potential of *End1*, a gene specifically expressed in pea anthers. In *Standardisation Diseases Resistances Screening in Grain Legumes Germplasm Banks*. Ed. A. Ramos and R. Laguna, pp. 33-36. JCL Valladolid. ISBN 84-606-3195-8. C. L.
- (41) BENLLOCH, R.; NAVARRO, C.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2003) Floral development of the model legume *Medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sexual Plant Reproduction* 15: 231-241.
- (42) GÓMEZ, M. D.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2004) The pea *END1* promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta* 219: 967-981.
- (43) CAÑAS, L. A.; ESSID, R.; GÓMEZ, M. D.; BELTRÁN, J. P. (2002) Monoclonal antibodies as developmental markers to characterize pea floral homeotic transformations. *Sexual Plant Reproduction* 15 (3): 141-152.
- (44) GÓMEZ, M. D.; CAÑAS, L. A.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J. P. (2000) Título de la patente: Sequence regulating the anther-specific expression of a gene and its use in the production of androsterile plants and hybrid seeds. N.º de solicitud: P200000814. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 31/05/2000. Entidad titular: CSIC-NewBioTechnic. Países a los que se ha extendido: todo el mundo. PCT/ESO1/00127. Empresa/s que la están explotando: NewBioTechnic.
- (45) ROQUE E.; ELLUL P.; GÓMEZ, M. D.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2004) Título: Tomates partenocárpicos y procedimiento para su producción. N.º de solicitud: P200401761. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 17/07/2004. Entidad titular: CSIC-NewBioTechnic. Países a los que se ha extendido: PCT en trámite. Empresa/s que la están explotando: NewBioTechnic.