

**PRODUCCIÓ BIOTECNOLÒGICA DE FÀRMACS:  
INTERACCIONS ENTRE LA BIOTECNOLOGIA  
VEGETAL I LA BIOLOGIA SINTÈTICA**

**DISCURS**

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmica Corresponent

**Il·lustre Sra. Dra. M. Mercè Bonfill Baldrich**

Celebrat el dia 28 de març de 2022

**PRESENTACIÓ**

a càrrec de l'Acadèmica Numerària

**Excel·lentíssima Sra. Dra. Carmen Morales Pujol**

Barcelona

2022

*L'Acadèmia no es fa solidària de  
les opinions que s'exposen en les publicacions,  
de les quals és responsable l'autor.*



Generalitat de Catalunya  
**Departament de Justícia**

Amb la col·laboració del Departament de  
Justícia de la Generalitat de Catalunya

Dipòsit legal: B-5153-2022  
TIRO Y RETIRO

## PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmica Numerària

**Excel·lentíssima Sra. Dra. Carmen Morales Pujol**



**Excel·lentíssim Senyor President,  
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,  
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,  
Estimats familiars, amics i companys,  
Senyores i Senyors,**

Tengo el honor y la satisfacción de presentar a la Dra. Mercedes Bonfill Baldrich como Académica Correspondiente electa en este acto que hoy se está llevando a cabo en esta tan prestigiosa Institución como es la Real Academia de Farmacia de Cataluña.

La Dra. Bonfill se licenció en Farmacia en 1980 y a continuación realizó la Tesis de licenciatura en el departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia bajo la dirección del Dr. José Iglesias Anglés. En 1987 comenzó su Tesis Doctoral sobre producción biotecnológica de digitoxina en cultivos *in vitro de Digitalis purpurea* en el Departamento de Fisiología Vegetal, de la cual yo misma fui directora. Pero antes de continuar con la labor y cualidades académicas y personales de la Dra. Bonfill, haré un breve inciso para comentar la trayectoria científica del laboratorio en el que ha llevado a cabo su docencia e investigación.

La Fisiología vegetal se estableció como materia troncal de la licenciatura de Farmacia en 1952 con la incorporación del Dr. Manuel Serrano que trajo a la Facultad su enorme interés sobre el metabolismo secundario vegetal, aspecto de la fisiología vegetal del que fue pionero y profesor muy destacado. El metabolismo secundario de las plantas es la razón básica de la importancia de esta disciplina en nuestro centro ya que es la fuente de innumerables compuestos que se han

utilizado y se utilizan como medicamentos y nutracéuticos. Por todo ello, en nuestro departamento, desde sus inicios el tema de investigación ha sido el estudio del metabolismo secundario y el conocimiento de las rutas biosintéticas que llevan a la formación de compuestos de interés con valor añadido, a su regulación y especialmente a la mejora de su producción, a la vez que se han dado a conocer nuevas moléculas a partir de plantas de muchos lugares del mundo, de las cuales se han demostrado actividades farmacológicas muy destacadas. Mientras que al principio la mayor parte de los estudios se llevaron a cabo con plantas crecidas en invernadero, a partir de los años 80 ya se adoptaron las técnicas de cultivo *in vitro* utilizando plantas productoras de compuestos de interés, con el fin de profundizar en el estudio del control de su biosíntesis, pudiendo así incrementar los niveles de los mismos.

Fue en esta época, a mediados de los 80, cuando la Dra. Bonfill se incorporó a nuestro laboratorio para llevar a cabo su tesis doctoral, cuya presentación tuvo lugar en 1993 obteniendo la calificación de Excelente *cum laude*. Su interés por mejorar sus conocimientos sobre la producción biotecnológica de compuestos de utilidad en Farmacia y en especial sobre las nuevas técnicas de biología molecular que se podían aplicar a su investigación, la llevo a realizar una estancia postdoctoral de casi dos años (1995 – 1996) en el CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) de Gif-sur-Yvette, París, disfrutando de una beca Marie Curie concedida por la Comunidad Europea. En 2003 obtuvo una plaza de profesor Titular, cargo que disfruta en la actualidad. En 2004 realizó varias estancias en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Varsovia (Polonia) y en 2012 gracias a un periodo sabático concedido por la Universidad de Barcelona, estuvo 6 meses en la Faculty of Health and Life Sciences en la De Montfort University, Leicester, United Kingdom, colaborando con el grupo del Dr. Randolph Arro.

La investigación que la Dra. Bonfill ha llevado a cabo hasta el momento abarca los siguientes aspectos biotecnológicos:

- Bioproducción de alcaloides tropánicos en *Solanaceae* (*Datura metel*, *Duboisia*, *Hyoscyamus niger*) y estudio de los genes *rol* de *A. rhizogenes*.

- Bioproducción de terpenos (*Digitalis purpurea*, *Lavandula dentata*, *Ruscus aculeatus*, *Galphimia glauca*, *Withania coagulans*) y estudio del metabolismo y producción de ginsenósidos en raíces transformadas de *Panax ginseng*.
- Producción de saponinas triterpénicas en cultivos celulares de *Centella asiática*.
- Estudio del camino biosintético de la podofilotoxina en cultivos celulares de *Linum album* mediante la adición de precursores.
- Mejora de la producción de taxol<sup>®</sup> en cultivos celulares de *Corylus avellana*.

De todas formas, actualmente su línea de investigación principal es la mejora de la producción de taxol<sup>®</sup> y otros taxanos de interés en cultivos celulares de *Taxus* spp, mediante aproximaciones empíricas y sobre todo aproximaciones moleculares.

Toda esta investigación llevada a cabo por la Dra. Bonfill ha sido siempre subvencionada con proyectos concedidos por el Ministerio de Investigación y Ciencia y por compañías del sector farmacéutico/cosmético como Boeringher Ingelheim, Montedison, L'Oreal, Lubrizol, etc.

La Dra. Bonfill tiene más de 100 publicaciones en revistas con alto índice de impacto en su área, a parte de diversos capítulos de libro. También debo destacar que el grupo de investigación de la Dra Bonfill ha sido considerado por la Generalitat de Catalunya como grupo consolidado desde 1998.

La Dra. Bonfill también destaca por su capacidad comunicativa, hecho que le ha valido la obtención de muy buenas opiniones por parte de los alumnos de las numerosas asignaturas que ha impartido a lo largo de su carrera docente, tanto de licenciatura, de grado, de doctorado como de master, no sólo en la UB, sino también en las Universidades Pompeu Fabra y Ramón Llull, en las que también ha impartido docencia como profesora invitada. Cabe mencionar su actividad docente en la licenciatura y grado de Farmacia con las asignaturas de Fisiología vegetal, Biotecnología vegetal, Biotecnología farmacéutica y Bio-

factorias vegetales de productos farmacéuticos. Su participación en la docencia de segundo ciclo en la licenciatura de Ciencia y Tecnología de los alimentos con la asignatura Biotecnología agroalimentaria y en el Grado de Ciencia y Tecnología de los alimentos con la asignatura Biotecnología alimentaria. También destacar su participación en el Máster Experimental en Ciencias Farmacéuticas, el Máster Interuniversitario de Biotecnología, el Máster Interuniversitario de Investigación, Desarrollo y Control de Medicamentos y el Máster Interuniversitario de Biotecnología Molecular, todos ellos de la UB, y en el Máster Interuniversitario de Biología, Genómica y Biotecnología Vegetales del CRAG/UAB.

Su gran facilidad de comunicación le ha llevado a impartir conferencias en diversas universidades europeas, africanas y asiáticas acerca de su investigación y la biotecnología vegetal en general. Su destacada labor docente también viene avalada por la dirección de 6 Tesis doctorales y más de 15 tesinas y tesis de master.

Además, la internalización de la labor docente de la Dra. Bonfill viene también acreditada por el hecho de que en 2014 participó en el Programa ERASMUS para la movilidad de profesores universitarios para impartir clases de Biotecnología vegetal a alumnos de Doctorado, Máster y últimos cursos de Grado en el ESAC-Politécnico de Coimbra (Portugal), lo que ha facilitado que varios estudiantes del Politécnico de Coimbra hayan realizado su trabajo final de Grado en nuestro laboratorio de la Facultad de Farmacia (UB).

A la vez, deseo destacar que ha sido miembro del Programa TEMPUS de la Comisión Europea (543865-TEMPUS-1-2013-1) titulado “Establish a New Joint Master Degree in Biotechnology Applied to Agri-Science, Environment and Pharmacology” para el desarrollo de la Educación Superior en Egipto, concretamente en 7 Universidades egipcias (Benha, Fayoum, Minia, Zagazig, Aswan, Sina y Misr), desde marzo 2014 a diciembre de 2017.

Finalmente comentar que ha participado activamente en los programas de intercambio de estudiantes a todos los niveles, dirigiendo estancias en el laboratorio de alumnos de bachillerato para la realización del Treball de Recerca, y de alumnos de Grado y Máster dentro



del Programa Delfín con Universidades de México y del Programa ERASMUS+ / Prácticas con Universidades europeas.

La trayectoria investigadora y docente de la Dra. Bonfill que acabamos de comentar, junto con sus cualidades personales y su entusiasmo y rigurosidad en todas las empresas que acomete, la hacen merecedora del honor de ser nombrada Académica Correspondiente de esta Institución, con la que con toda seguridad colaborará con gran ilusión y efectividad.



**Excel·lentíssim Senyor President  
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,  
Il·lustres col·legues Professors de la Universitat de Barcelona,  
Distingides autoritats acadèmiques i professionals  
Senyores i Senyors,**

És per a mi un gran honor ésser aquí amb motiu del meu ingrés com a acadèmica corresponent de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya. Abans de tot vull manifestar el meu agraïment més sincer als il·lustres membres d'aquesta Reial Acadèmia per haver-me admès, i molt particularment a la Dra. Carmen Morales Pujol, per la seva iniciativa i el seu suport presentant la meva candidatura, i també a la Dra. Asunción Alsina Esteller i al Dr. Salvador Cañiguerol Folcara, qui, al seu torn, ens varen recolzar en el nostre propòsit.

Vull també manifestar un especial agraïment a la Dra. Joana Maria Planas Rosselló i a la Dra. Rosa Maria Cusidó Vidal per la seva ajuda i per animar-me en tot moment a estar avui aquí. També, a tots els altres acadèmics que han confiat en mi els vull transmetre el meu profund agraïment.

Voldria, a més, expressar el meu reconeixement al Dr. Manuel Serrano García, a qui tinc ara molt present, a la Dra. Maria Teresa Piñol Serra, a la Dra. Carmen Morales Pujol, a la Dra. Rosa M Cusidó Vidal i al Dr. Javier Palazón Barandela, que varen permetre que m'introduís definitivament en el món del metabolisme secundari vegetal i del cultiu *in vitro* de plantes, i a tots aquells que en el decurs de la meua vida professional, han fet possible que estigui avui en aquest acte acadèmic. Gràcies a cada ú per tot el suport que m'heu donat!!!

Acabaré amb un agraïment molt singular a la meva família, als meus pares que ja no hi són, als meus germans, als meus nebots i a tots aquells que m'han acompanyat i m'acompanyen en el dia a dia.

A tots, GRÀCIES!!!

La meva recerca, ja des de l'inici, ha tingut una estreta relació amb les plantes i el seu metabolisme secundari. Quan estava finalitzant la Llicenciatura de Farmàcia vaig fer la tesina de llicenciatura al Departament de Farmacognòsia i Farmacodinàmia sota la direcció del Dr. José Iglesias Anglés, a qui agraeixo sincerament haver-me fet conèixer el metabolisme secundari vegetal des de la vessant fitoquímica, amb un estudi sobre els flavonoides de *Melissa officinalis*. Posteriorment vaig realitzar la tesi doctoral a la Unitat de Fisiologia Vegetal sota la direcció de la Dra. Carmen Morales i la Dra. Rosa M Cusidó, que seguint amb el metabolisme secundari de les plantes, em varen endinsar en el cultiu vegetal *in vitro* i la producció biotecnològica dels glucòsids cardiotònics de *Digitalis purpurea*.

Al llarg d'aquests anys he anat compaginant la recerca i la docència tenint com a rere fons la **biotecnologia vegetal**, utilitzant el cultiu vegetal *in vitro* i les tècniques d'enginyeria genètica i metabòlica per tal de millorar la producció de compostos bioactius sintetitzats per les plantes. Aquesta tasca ha seguit tres nivells diferenciats, que al mateix temps són complementaris, i que es basen en tres maneres d'enfocar la millora de la bioproducció utilitzant els cultius vegetals *in vitro*: primerament un **enfocament empíric** assajant diferents factors que incrementin la bioproducció, en segon lloc un **enfocament racional** incorporant l'expressió diferencial de gens i el transcriptoma cel·lular per saber el paper que tenen a nivell molecular els factors assajats, i en tercer lloc un **enfocament transversal** que inclou les tècniques de la **biologia sintètica** per tal que altres organismes siguin capaços de compartir la bioproducció de fàrmacs.

Amb agraïment cap a tots els que ara m'acompanyeu, llegiré a continuació el resum del discurs, que versarà sobre **les interaccions entre la biotecnologia vegetal i la biologia sintètica** dintre del marc de la **producció biotecnològica de fàrmacs**.

**PRODUCCIÓ BIOTECNOLÒGICA DE FÀRMACS:  
INTERACCIONS ENTRE LA BIOTECNOLOGIA  
VEGETAL I LA BIOLOGIA SINTÈTICA**



# Índex

1. Introducció
2. La Biotecnologia
  - 2.1. Evolució de la Biotecnologia
  - 2.2. La Biotecnologia vegetal
  - 2.3. El cultiu vegetal *in vitro*
  - 2.4. L'enginyeria genètica
3. Aplicacions de la biotecnologia vegetal
  - 3.1. Millora genètica de les plantes
  - 3.2. Les plantes com a bio-factories de productes farmacèutics
4. La Biologia sintètica
  - 4.1 Evolució de la Biologia sintètica
  - 4.2 Aplicacions de la biologia sintètica
5. La Biologia sintètica vegetal: una disciplina emergent
  - 5.1. Exemples pioners de biologia sintètica vegetal
6. Conclusions
7. Bibliografia





## 1. Introducció

En aquest discurs voldria relacionar els conceptes de metabòlit secundari vegetal, com a producte amb propietats farmacològiques, Biotecnologia vegetal, com a eina biològica per a obtenir-los, i després introduir el concepte de Biologia sintètica per tal d'anar un pas més enllà en la producció d'aquests compostos vegetals amb activitat farmacològica.

Les plantes produeixen una gran i diversa varietat de compostos orgànics, però molts d'ells sembla que no tenen una funció directa en el creixement i el desenvolupament del vegetal. Aquestes substàncies són conegudes com a metabòlits secundaris. El concepte de metabòlit secundari es pot atribuir a Kossel (1891- 1947) que va ser qui per primera vegada va definir aquests compostos orgànics (Mothes 1980) “com a incidentals i no de gran importància per a la vida vegetal”, i seguia dient, “una gran majoria d'aquests compostos no participen directament en el creixement, el desenvolupament i la reproducció de les plantes, de manera que es denominen “metabòlits secundaris”.

Els metabòlits secundaris estan implicats principalment en les relacions entre la planta productora i el seu entorn, que inclou les condicions ambientals i els altres organismes del seu medi natural; podríem dir que els metabòlits secundaris constitueixen un món de senyals químics mitjançant els quals la planta es relaciona amb l'exterior.

Entre les diverses funcions que aquests compostos tenen per la planta, cal destacar la de ser atractors de pol·linitzadors i dispersors de llavors perquè la planta pugui habitar nous territoris, la de ser inhibidors del creixement d'altres plantes (anomenats substàncies al·lelopàtiques) i també la de ser compostos que protegeixen a la planta productora d'infeccions o depredadors, anomenats respectivament, fitoalexines i dissuasoris nutritius.

Els metabòlits secundaris de les plantes es poden dividir, tenint en compte les seves rutes de biosíntesi, en tres grups químicament diferenciats, els Terpens, els Fenols i els Alcaloides (Bonfill i col 2013; Goleniowski i col 2013).

A diferència dels metabòlits primaris com la clorofil·la, els aminoàcids, els nucleòtids, els carbohidrats o els lípids de membrana, els metabòlits secundaris no tenen un paper reconegut en processos fonamentals per la vida de planta com la respiració, el transport de soluts, l'assimilació de nutrients i la diferenciació; així i tot, se sap que tenen un paper important en l'adaptació de les plantes al seu entorn. Aquestes molècules contribueixen a la salut de la planta degut a que interactuen amb els ecosistemes.

A més, hi ha metabòlits secundaris que tenen funció de metabòlit primari, és a dir, que sí que participen en processos essencials de la vida de la planta, com són els àcids gibberèlic i abscísic (fitohormones vegetals amb estructura terpènica), els esteroides que formen part de les biomembranes (també amb estructura terpènica) i els carotenoides, que protegeixen els cloroplasts de la fotodestrucció, que ocasionaria la inhibició de la fotosíntesi degut a un excés de llum.

Les rutes implicades en la biosíntesi dels metabòlits secundaris tenen el seu origen en les rutes biosintètiques del metabolisme primari. Per exemple, els terpens són lípids sintetitzats a partir de l'acetil-CoA o a partir d'intermediaris bàsics de la glicòlisi. Els fenols són substàncies aromàtiques que es formen per la via de l'àcid siquímic o de l'àcid malònic. I els alcaloides són biosintetitzats a partir d'aminoàcids. Com es pot veure, les rutes del metabolisme secundari deriven del metabolisme primari i els compostos que es formen són importants per la supervivència de la planta com un tot.

La gran majoria de metabòlits secundaris vegetals tenen importants activitats farmacològiques i s'utilitzen en medicina i veterinària des de fa centenars d'anys. Al mateix temps constitueixen una base molt important per a la síntesi química de nous fàrmacs. Actualment formen part de productes farmacèutics, cosmètics, productes químics i nutracèutics, entre d'altres. Un 40% dels medicaments que hi ha al darrere del mostrador del farmacèutic al món occidental deriven de plantes que la gent ha utilitzat durant segles, inclosos els 20 milers medicaments amb recepta més venuts als Estats Units avui dia (USDA Forest Service, 2020).

Un bon exemple podria ser l'aspirina, que deriva de l'àcid salicílic. La

molècula genuïna o els seus derivats poden ser aïllats en grans quantitats de moltes plantes (*Spiraea ulmaria*, *Betula lenta*, *Salix* spp., etc) però el producte químic es sintetitza com un acetil derivat per disminuir els efectes secundaris com la irritació de l'estómac. També, la quinina extreta de l'escorça de l'arbre sud-americà *Cinchona calisaya* alleuja la malària, i l'arrel de regalèssia (*Glycyrrhiza glabra*) és un ingredient de les gotes per la tos des de fa més de 3.500 anys (USDA Forest Service, 2020).

Altres exemples de metabòlits secundaris amb acció terapèutica són: L'asiaticòsid (venotònic) de *Centella asiatica*, el taxol<sup>Ò</sup> (antitumoral) de *Taxus* spp., la digoxina (cardiotònic) de *Digitalis lanata*, els ginsenòsids (adaptògens) de *Panax ginseng*, l'artemisinina (antimàl·làric ) d'*Artemisia annua*, el ruscòsid (venotònic i antiinflamatori) de *Ruscus aculeatus*, la forskolina (tractament del glaucoma) de *Coleus forskolii*, la camptotecina (antitumoral) de *Camptotheca acuminata*, l'ajmalicina (antihipertensiu) i la vinblastina (antileucèmic) de *Catharantus roseus*, la diosgenina (per l'hemisíntesi d'estrògens) de *Dioscorea deltoides*, etc.

A més de la síntesi química, que moltes vegades és inviable per obtenir aquests compostos degut a que alguns tenen estructures molt complexes, la producció de metabòlits secundaris de plantes s'ha aconseguit, durant molt de temps, pel cultiu al camp. No obstant, les plantes originades a partir de biòtops particulars poden ser difícils de fer créixer fora dels seus ecosistemes locals, i també succeeix que les plantes són sensibles als patògens i no resisteixen llargs cultius al camp. A més, la purificació a partir dels extractes vegetals és difícil i normalment es troben baixes concentracions del compost d'interès, de vegades només en espècies rares o en perill d'extinció (Matsuura i col 2018).

Això ha portat als científics i als biotecnòlegs a considerar els cultius de cèl·lules i òrgans vegetals *in vitro* com un camí complementari/alternatiu per produir els metabòlits secundaris valuosos.

## 2. La Biotecnologia

La Biotecnologia, abreujadament *biotech*, és l'àrea de la biologia que utilitza processos vius, organismes o sistemes per fabricar productes o tecnologia destinats a millorar la qualitat de la vida humana (Rouse 2019). També es pot definir com l'aplicació de sistemes biològics i organismes als processos tècnics i industrials. Segons la tecnologia, les eines i les aplicacions implicades, la biotecnologia es pot solapar amb la biologia molecular, la biònica, la bioenginyeria, l'enginyeria genètica i la nanotecnologia.

El terme Biotecnologia va començar a utilitzar-se a la dècada dels anys 70, amb l'aparició de la tecnologia de l'ADN-recombinant, més comunament coneguda com enginyeria genètica. Per molt de caràcter aplicat que es doni a la Biotecnologia, no es pot separar del seu context científic. La tecnologia es distingeix de la ciència pel seu objecte. La ciència busca el coneixement mentre que la tecnologia busca la seva aplicació. La Biotecnologia no és en sentit estricte una ciència més o menys definida, sino un cos de coneixements pluri- i interdisciplinars procedents principalment de la genètica, la fisiologia, la bioquímica, la biologia molecular i la tecnologia de l'ADN-recombinant dintre del marc de la Biologia, i tots aquests coneixements es troben integrats per a una finalitat.

La biotecnologia es pot dividir en sub-disciplines basades en usos i aplicacions comunes, tal com:

- La biotecnologia farmacèutica que implica processos mèdics com ara modificar organismes per produir nous fàrmacs i utilitzar cèl·lules mare per regenerar teixits humans danyats o tornar a cultivar òrgans sencers.
- La biotecnologia química que inclou processos industrials com la producció de nous productes químics o el desenvolupament de nous combustibles per a vehicles.
- La **biotecnologia vegetal** que s'aplica a processos agrícoles com ara produir cultius resistents a plagues o també, **utilitzar les plantes com a biofactories de productes farmacèutics.**

- La biotecnologia animal per obtenir animals resistents a malalties.
- La biotecnologia ambiental que implica un desenvolupament ecològic.
- La biotecnologia alimentària que fa referència a processos que faciliten la producció d'aliments, anant des de l'aplicació més popular com la fermentació alcohòlica i la làctica, fins l'obtenció de plantes d'arròs amb un alt contingut de provitamina A.

## **2.1. Evolució de la Biotecnologia**

La Biotecnologia ha evolucionat molt ràpidament en els últims anys per la mateixa raó que ha evolucionat el món i tots els seus aspectes: la millora de les condicions de la societat i el seu entorn.

Els humans l'han utilitzada des de fa milers d'anys amb el descobriment de l'agricultura i, posteriorment amb la ramaderia, quan van començar a domesticar i millorar els cultius i els animals mitjançant selecció artificial i creuaments. També, l'ús de microorganismes per a l'obtenció de productes o per a la millora de processos era un fet estès des de fa milers d'anys, tot i que se'n desconegués la presència d'organismes vius. Així, el vi, el pa i la cervesa eren i són aliments derivats de l'aplicació biotecnològica. Els grecs afegien bacteris a la llet per elaborar els iogurts, i actualment es segueix fent, així com també se n'agreguen a la llet per a la producció del formatge; però ara en lloc d'afegir tots els bacteris extrets de l'estómac de remugadors joves, només s'afegeix la proteïna necessària per al quall, aquesta proteïna (quimosina) prové de bacteris transgènics o recombinants.

El panís dels nostres camps no és el que es trobava originàriament 9.000 anys enrera a Mèxic. Al seu moment ja va patir millores genètiques que han donat pas a un panís millorat artificialment arran d'un procés de domesticació.

Els científics del segle passat que realitzaven programes de millora genètica de plantes es basaven en els principis de les lleis de Mendel. A mitjans del segle XX es comencen a aplicar criteris científics i tec-

nològics a la producció agrícola. Així, aquesta ciència mil·lenària ha estat una de les primeres a adoptar la tecnologia de l'ADN recombinant, és a dir, introduir o eliminar material genètic amb una precisió molecular per a millorar les característiques de les plantes i els animals de consum i els seus productes (Kreuzer i Masey, 2008).

## **2.2. La Biotecnologia vegetal**

La Biotecnologia vegetal és l'aplicació de sistemes biològics i organismes vegetals als processos tècnics i industrials. Utilitza les tècniques del cultiu *in vitro* i de l'enginyeria genètica per el coneixement, millora i productivitat de les plantes.

## **2.3. El cultiu vegetal *in vitro***

El cultiu vegetal *in vitro* es pot definir com el cultiu en condicions artificials de qualsevol part d'una planta (Pierik 1987). És un cultiu que es realitza sobre medis nutritius i en condicions estèrils. El nom de cultiu *in vitro* (*in vitro* significa literalment “en vidre”) va sorgir perquè, al principi, per fer aquest cultiu s'utilitzaven flascons de vidre.

Podriem parlar de l'entorn del cultiu vegetal *in vitro* dient que comprèn factors físics com el control de la temperatura, la llum i el fotoperíode; factors químics com els medis de cultiu i el pH; i per últim les condicions estèrils (que inclouen el material vegetal, els estris pel cultiu, els medis de cultiu, el lloc on es realitza etc).

Els medis del cultiu *in vitro* estan compostos de nutrients inorgànics i nutrients orgànics. Els nutrients inorgànics comprenen tots els minerals que una planta necessita per viure i els podem dividir, segons la concentració, en macronutrients i micronutrients. Els nutrients orgànics inclouen una font de carboni (un sucre) i una font de nitrògen (com vitamines i aminoàcids). A més s'afegeixen al cultiu reguladors del creixement vegetal o fitohormones segons el tipus de cultiu que es porti a terme.

En aquestes condicions es poden cultivar plantes, llavors, embrions,

òrgans com arrels i brots, explants, teixits, cel·lules i protoplasts.

Aquesta tècnica es caracteritza per:

1. Es produeix a micro-escala, és a dir, en un àrea relativament petita.
2. Les condicions de l'entorn, tan físiques com nutricionals i hormonals, estan optimitzades.
3. S'exclouen tots els microorganismes (fongs, bacteris i virus), així com altres plagues de les plantes superiors (insectes, cucs).
4. El patró normal de desenvolupament de les plantes sovint es desajusta, de manera que un teixit aïllat pot donar lloc a una massa desdiferenciada com un call o desenvolupar-se de moltes maneres inusuals (per exemple, formació d'òrgans, embriogènesi somàtica, etc.).
5. La capacitat de cultivar protoplasts o cèl·lules individuals permet manipulacions que abans eren impossibles (Pierik 1987).

Un aspecte a considerar en el cultiu vegetal *in vitro* és la variabilitat de la cèl·lula vegetal, la seva extraordinària capacitat de canvi espontani o induït experimentalment, és a dir, la seva plasticitat, i per tant la plasticitat del genoma vegetal, que ens permet conduir-la i utilitzar-la en la pràctica de la Biotecnologia vegetal. La cèl·lula vegetal té unes particularitats o característiques genètiques que li confereixen un potencial d'expressió fenotípic molt divers, o sigui, que a partir d'un mateix genotip es poden originar diferents fenotips. Aquestes característiques del genoma vegetal constitueixen una de les explicacions possibles de l'aparició de nous fenotips durant el cultiu *in vitro*, com són per exemple l'increment de la productivitat d'un compost econòmicament important, la formació de compostos nous o l'obtenció de plantes resistents a diversos factors, etc. Així doncs, el cultiu *in vitro* crea unes condicions especials a les quals la cèl·lula vegetal s'ha d'adaptar segons diferents vies d'expressió del seu genoma, donant lloc a fenotips originals i diversos a partir d'una mateixa planta (variació somaclonal).

El cultiu vegetal *in vitro* es basa en la totipotència de la cèl·lula vegetal, que és la capacitat que té la cèl·lula vegetal per diferenciar-se i desdiferenciar-se, de manera que a partir de qualsevol cèl·lula vegetal adulta, i per tant diferenciada, podem obtenir una planta sencera.

Les possibles vies d'expressió de la cèl·lula totipotent són: donar lloc

a un embrió somàtic, a una gema de part aèria, a una gema d'arrel, a un teixit de call, a línies cel·lulars amb capacitats bioquímiques diferents (una línia cel·lular podrà formar un metabòlit secundari important, mentre que un altre línia el formarà en molt poca quantitat o inclús no el podrà formar). El fenomen de la totipotència és importantíssim per les aplicacions del cultiu vegetal *in vitro* perquè permet la manipulació genètica de la cel·lula vegetal i que això es pugui expressar a nivell de línia cel·lular, teixit o òrgan, o bé a nivell de planta sencera.

Per tant, la variabilitat en l'expressió del genoma vegetal i la totipotència fan que a partir d'una mateixa planta sigui possible seleccionar *in vitro* diferents genotips que podran expressar-se a diferents nivells, des del nivell cel·lular fins al de planta sencera.

Hi ha tres finalitats principals en el cultiu vegetal *in vitro*: 1) La recerca bàsica 2) La finalitat agronòmica 3) La finalitat industrial.

1) La **recerca bàsica** permet realitzar experiments que són inacessibles a nivell de planta sencera mitjançant cultiu hidropònic, a l'hivernacle o al camp. Així s'han pogut conèixer les rutes de biosíntesi de molts dels metabòlits secundaris. El coneixement dels precursors, intermediaris i enzims que actuen en una ruta biosintètica és fonamental quan hi ha una finalitat industrial.

2) La **finalitat agronòmica** té dos objectius diferents, un és la modificació del genotip per obtenir una nova varietat, aquí s'inclouen les tècniques de la **hibridació somàtica** o fusió de protoplasts; les de les **manipulacions genètiques**, que abasten la infecció de la cèl·lula vegetal mitjançant vectors naturals, és l'anomenat sistema *Agrobacterium*, o bé el bobardeig d'ADN a la cèl·lula vegetal amb microprojectils o també la fusió de protoplasts amb liposomes portadors de l'ADN a introduir; i per últim la de la **mutagènesi**.

L'altre objectiu de la finalitat agronòmica és la multiplicació o la fixació d'un genotip interessant. Pel que fa a la multiplicació d'un genotip interessant, s'utilitza la multiplicació vegetativa *in vitro*, que inclou l'embriogènesi somàtica, la caulogènesi i la micropropagació o cultiu d'esqueixos *in vitro*; i per la fixació d'un genotip s'utilitzen els haplomètodes.



3) Per últim, la **finalitat industrial**, que utilitza els cultius de cèl·lules i òrgans vegetals *in vitro* com a biofàctories de productes amb activitat terapèutica o per a la indústria cosmètica. En les últimes dècades s'han desenvolupat biofàctories vegetals per a la producció a nivell industrial de compostos bioactius d'alt valor afegit, com la siconina, el taxol® i la berberina, entre d'altres (Sharma i col. 2014; Hidalgo i col. 2018).

## 2.4. L'enginyeria genètica

L'enginyeria genètica és una tècnica de la biotecnologia que s'utilitza per modificar, eliminar o introduir gens en el genoma d'un organisme, la seva finalitat es troba en l'obtenció de productes beneficiosos pels éssers vius.

Podem definir l'enginyeria genètica com la manipulació, modificació i recombinació d'ADN o altres molècules d'àcid nucleic de manera artificial, per modificar un organisme o una població d'organismes (EB 1998).

La tecnologia de l'ADN recombinant va sorgir amb el descobriment dels enzims de restricció l'any 1968 pel microbiòleg suís Werner Arber. L'any següent, el microbiòleg nord-americà Hamilton O. Smith va purificar els anomenats enzims de restricció de tipus II, que es van trobar essencials per a l'enginyeria genètica degut a la seva capacitat de trencar un lloc específic dins de l'ADN (a diferència dels enzims de restricció de tipus I, que escindeixen l'ADN en llocs aleatoris). Basant-se en el treball de Smith, durant el 1970-71 el biòleg molecular nord-americà Daniel Nathans va ajudar a avançar en la tècnica de la recombinació de l'ADN i va demostrar que els enzims de tipus II podrien ser útils en estudis genètics. L'enginyeria genètica basada en la recombinació va ser iniciada el 1973 pels bioquímics nord-americans Stanley N. Cohen i Herbert W. Boyer, que van ser dels primers a tallar l'ADN en fragments, unir diferents fragments i inserir els nous gens en *E. coli*, que després es multiplicava.

El 1980 els “nous” microorganismes creats per la investigació de l'ADN recombinant es van considerar patentables, i el 1986 el De-

partament d'Agricultura dels EUA va aprovar la venda del primer organisme viu alterat genèticament: un virus del qual s'havia tallat un sol gen, que s'utilitza com a vacuna de la malaltia d'Aujeszky o Pseudorabia que afecta als porcs i altres animals de granja. Des de llavors, s'han adjudicat diversos centenars de patents per a bacteris i plantes modificats genèticament. Les patents sobre organismes genèticament modificats, especialment dels cultius i altres aliments, van ser, en canvi, un tema polèmic i es van mantenir fins l'actualitat.

Una generació posterior de tècniques d'enginyeria genètica sorgida a principis del segle XXI es va centrar en l'edició gènica. L'edició de gens, basada en una tecnologia coneguda com CRISPR-Cas9, permet als investigadors personalitzar la seqüència genètica d'un organisme viu fent canvis molt específics en el seu ADN. L'edició de gens té una àmplia gamma d'aplicacions, que s'utilitzen per a la modificació genètica de les plantes de cultiu i el bestiar i dels organismes model de laboratori (per exemple, ratolins). La correcció dels errors genètics associats a malalties en animals suggereix que l'edició de gens té aplicacions potencials en teràpia gènica per a humans (EB 1998).

L'enginyeria genètica ha avançat en la comprensió de molts aspectes teòrics i pràctics de la funció i l'organització dels gens. A través de tècniques d'ADN recombinant, s'han creat bacteris capaços de sintetitzar la insulina humana, l'hormona del creixement humà, l'interferó alfa, la vacuna contra l'hepatitis B i altres substàncies útils per a la medicina. No obstant això, una gran preocupació s'ha centrat en aquests assoliments per por que puguin ocasionar la introducció de trets desfavorables i possiblement perillosos en microorganismes que prèviament estaven lliures d'ells (per exemple, resistència als antibiòtics, producció de toxines o tendència a causar malalties). De la mateixa manera, l'aplicació de l'edició de gens en humans ha generat preocupacions ètiques, especialment pel que fa al seu ús potencial per alterar trets.

L'enginyeria genètica té aplicacions a la ramaderia, l'agricultura, la indústria química i la medicina. Una d'aquestes és la de produir plantes transgèniques per a l'agricultura, amb la introducció d'un o diversos gens, o amb la modificació de la funció d'un gen propi. En aquest sentit, actualment s'estan desenvolupant plantes de segona i tercera

generació que persegueixen diversos objectius, com la obtenció de plantes amb llurs qualitats nutricionals millorades, o bé amb finalitats industrials o per tal de convertir-les en productores de proteïnes o molècules d'ús farmacèutic (Molecular Pharming).

### **3. Aplicacions de la Biotecnologia vegetal**

#### **3.1. Millora genètica de les plantes**

La millora genètica tradicional de plantes té una limitació, ja que no pot anar més enllà del creuament entre plantes de la mateixa espècie, sexualment compatibles. En alguns casos s'ha aconseguit el creuament de plantes de dues espècies diferents i el resultat d'aquest procés ha estat un híbrid. Però, si volem introduir una característica nova a una planta que no tingui cap parent pròxim que la contingui, hem de recórrer a la tecnologia de l'ADN recombinant, la qual ens permet identificar un gen d'interès, copiar-lo i introduir-lo en un altre organisme, que pot ésser de la mateixa espècie o d'una espècie totalment diferent. D'aquesta manera es trenca la limitació de la transferència de gens entre diferents espècies. Després del procés de transformació d'una planta, el gen forà que s'introdueix queda integrat de forma permanent al genoma vegetal, i aquesta planta es denomina transgènica.

Actualment és especialment important al dissenyar una planta transgènica, amb l'objectiu de posseir una característica nova d'interès, tenir en compte una sèrie de consideracions: (a) que el caràcter d'interès que s'hi vol introduir sigui durable, és a dir, si pot ser per sempre; (b) que aquesta característica converteixi a la planta en sostenible, que no li sigui una càrrega i hagi de necessitar més tractaments que abans, la qual cosa la faria més cara de conrear; (c) que aquesta nova propietat aportí un valor nou a l'agricultor, al processador d'aliments o al consumidor; (d) que sigui una característica molt específica i (e) que aquesta característica no desenvolupi tolerància.

Alguns exemples de plantes transgèniques que s'han transformat en productes comercials són:

**A) Plantes resistents a plagues**, com el blat de moro resistent al cuc barrinador, que és la plaga més important que ataca aquest cultiu i que

suposa unes pèrdues en producció que poden arribar al 30% de la collita. Per obtenir aquestes plantes transgèniques s'ha introduït al blat de moro els gens *Cry* procedents de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que codifiquen per unes proteïnes cristallines que són toxines específicament actives contra insectes de diversos ordres i contra nematodes (cucs).

**B) Plantes resistents a herbicides**, com la soja transgènica tolerant a l'herbicida glifosat. A la soja se li va introduir un gen copiat del bacteri *Agrobacterium tumefaciens*, que codifica per a la síntesi d'un enzim que no és afectat pel glifosat. Per tant, en expressar aquest gen bacterià, la planta de soja es converteix en tolerant a l'herbicida glifosat i pot sobreviure a la seva aplicació per exterminar les males herbes. El glifosat, a diferència d'altres herbicides utilitzats en l'agricultura tradicional, resulta més econòmic i de fàcil degradació al sòl, per la qual cosa evita els efectes residuals que podrien perjudicar els conreus posteriors i redueix la contaminació de l'aigua i del medi.

**C) Plantes que produeixen medicaments (molecular pharming)**, com la producció de glucocerebrosidasa mitjançant cultius de cèl·lules en suspensió de pastanaga. La malaltia de Gaucher, també coneguda com a deficiència de glucocerebrosidasa, és un trastorn autosòmic recessiu, i constitueix el trastorn d'emmagatzematge lisosòmic (LSD) més freqüent al món. És un dels trastorns que afecten enzims específics que normalment descomponen materials per a la seva reutilització a les cèl·lules. Si falten aquests enzims o no funcionen correctament, els materials es poden acumular dintre de les cèl·lules i esdevenir tòxics. La malaltia de Gaucher es produeix quan un lípid anomenat glucosilceramida s'acumula a la medulla òssia, als pulmons, la melsa, el fetge i, de vegades, al cervell. Està present en aproximadament 1 de cada 20.000 naixements vius. Els símptomes de la malaltia poden incloure fatiga, anèmia, contusions i sagnat fàcil, dolor ossi greu i ossos fàcilment trencats, estómac distès i trombocitopènia augmentada. El que dona millor resultat per la cura d'aquesta malaltia és la teràpia de reemplaçament o substitució d'enzims (ERT). La teràpia de substitució d'enzims és un tractament mèdic en el qual s'injecten enzims recombinants a pacients en els quals l'enzim manca o no funciona. Per a la malaltia de Gaucher, s'injecta glucocerebrosidasa (GCD) recombinant per substituir l'enzim natural GCD mutat o deficient. El tractament ERT pot ajudar les persones a viure una vida normal.

L'1 de maig de 2012, la Food and Drug Administration (FDA) dels EUA va aprovar la taliglucerasa alfa per injecció, com a teràpia de reemplaçament d'enzims (ERT) per al tractament a llarg termini de pacients adults amb un diagnòstic confirmat de la malaltia de Gaucher tipus 1. La taliglucerasa alfa és una forma recombinant de GCD i és el primer medicament aprovat per l'empresa Protalix, que l'ha desenvolupat utilitzant un sistema d'expressió basat en cèl·lules vegetals anomenat ProCellEx<sup>®</sup>. La taliglucerasa alfa també va ser aprovada pel Ministeri de Salut israelià el setembre del 2012, pel ministeri de salut brasiler el març del 2013 i per les autoritats reguladores d'altres països. La taliglucerasa alfa és la primera proteïna terapèutica recombinant basada en cèl·lules vegetals aprovada per la FDA o qualsevol altra autoritat reguladora important. El 2009 Protalix va signar un acord de col·laboració amb Pfizer Inc. per al desenvolupament i la comercialització d'Elelyso<sup>®</sup>, el nom registrat d'aquest medicament (Uthailak N i col. 2018). A l'octubre de 2015, aquest acord es va modificar proporcionant a Pfizer els drets de màrqueting mundial per a Elelyso<sup>®</sup>, comercialitzat a Amèrica Llatina, a excepció del Brasil, amb el nom de Uplyso<sup>™</sup>. Al Brasil, la taliglucerasa alfa es ven amb la marca Bio-Manguinhos alfa-taliglicerasa en virtut d'un acord especial de subministrament i transferència de tecnologia amb la Fundação Oswaldo Cruz.

Altres exemples de plantes transgèniques, encara que no siguin productes comercials, són:

**D) Plantes amb una millora de les característiques organolèptiques del fruit**, com el tomàquet McGregor o Flavr Savr que va ser el primer aliment transgènic comercialitzat.

L'objectiu era que el tomàquet madurés a la tomaquera però es mantingués ferm més temps, fins i tot permetent que es pogués transportar al mercat sense deteriorar-se. Transportar fruits que haguessin madurat a la planta evitaria la pràctica de la fruita verda i la seva maduració artificial mitjançant un tractament amb etilè, cosa que dona un color de tomàquet madur, però no el sabor i les característiques pròpies del tomàquet madurat a la planta. Per aconseguir això, es va introduir un gen que retrasava la maduració del tomàquet, perquè inhibia l'acció d'un enzim que dissol la paret cel·lular.

Els esforços de recerca i de màrqueting que van produir el tomàquet

FLAVR SAVR van tenir com a resultat un èxit científic i un èxit de vendes temporals, però es va retirar del mercat al cap de poc temps per raons sense fonament. La història d'aquest tomàquet revela com pot ser de difícil introduir al mercat productes modificats genèticament, com les objeccions amb poc o cap criteri científic poden influir en el resultat i com la importància de l'opinió pública pot determinar l'èxit comercial (Bruening i Lyons, 2000).

**E) Plantes amb una millora nutricional**, com el panís que produeix carotenoides desenvolupat pel grup de recerca de la Dra Teresa Capell al laboratori de Biotecnologia Aplicada de la Universitat de Lleida (Christou i col 2011). Les fruites i hortalisses proporcionen gairebé totes les vitamines i els aminoàcids essencials necessaris per mantenir la salut i el benestar en els éssers humans; ara bé, els cereals majoritaris, com el panís i l'arròs, són deficientes en vitamines i aminoàcids claus. Fins a un cinquanta per cent de la població mundial, principalment la gent pobre dels països en vies de desenvolupament, es veu afectada per aquestes deficiències a causa de la impossibilitat d'accedir a una dieta variada. Davant la desigual distribució agrícola al món i la dificultat de canviar els cultius, principalment per la manca d'aigua, la producció de plantes transgèniques amb un contingut elevat de vitamines i aminoàcids podria contribuir a alleugerir aquestes deficiències. Els carotenoides són pigments grocs (donen el color al panís groc), taronges (per exemple la provitamina A dona el color a la pastanaga) i vermells (per exemple, el licopè dona el color al tomàquet) que es troben en moltes fruites i verdures. En molts països subdesenvolupats es fa servir panís totalment blanc per a ús humà. La farina que se'n obté no té gaire valor nutricional. Mentre que el panís groc, del qual també s'obté una farina blanca, constitueix el menjar dels animals. És un fet cultural. No resultaria difícil fer un panís amb un valor nutricional afegit, per exemple vitamines o micronutrients, que, en ésser consumit, pal·liés alguna de les carències inherents. Així es va regenerar un panís que contingués provitamina A, vitamina C i àcid fòlic. L'estratègia va consistir a copiar cinc gens d'organismes que els tinguessin funcionant i introduir-los a la planta per reconstruir la ruta metabòlica que portés a la producció de provitamina A, vitamina C i àcid fòlic.

### 3.2. Les plantes com a biofàctories de productes farmacèutics

Les plantes han sigut utilitzades des de l'antiguitat com a medicaments per totes les civilitzacions del món, i, també ara, són la major font de nous fàrmacs. Un dels interessos de la Biotecnologia vegetal consisteix en la utilització de cultius de cèl·lules i òrgans vegetals per a la producció de compostos bioactius que sintetitzen les plantes, com un camí alternatiu/complementari a la síntesi química o al cultiu al camp (Malik i col 2011; Bonfill i col 2015; Lalaleo i col 2016).

Com ja s'ha dit anteriorment, la majoria d'aquests compostos orgànics són productes del metabolisme secundari de les plantes. L'alt preu al mercat de molts d'ells, degut a la seva escassetat dins la natura, a la difícil adaptació al cultiu de les espècies vegetals productores o a factors de caràcter geopolític, ha despertat l'interès de moltes empreses per produir-los mitjançant sistemes biotecnològics vegetals.

Els principals sistemes biotecnològics vegetals que s'utilitzen per a la producció de compostos amb activitat farmacològica són els cultius cel·lulars (cultius de cèl·lules en suspensió i de cèl·lules immobilitzades) i els cultius d'òrgans (arrels i brots).

Alguns exemples de producció industrial utilitzant cultius de cèl·lules i òrgans vegetals *in vitro* són:

- La siconina, que és el primer compost que es va produir comercialment mitjançant un procés biotecnològic, a partir de cultius de cèl·lules en suspensió de *Lithospermum erythrorhizon*. És un colorant vermell que s'utilitza a la indústria cosmètica i proporciona el típic color vermell als pintallavis. L'empresa productora és Mitsui Chemicals Inc. (Japó).
- La berberina, que s'obté industrialment a partir de cultius de cèl·lules en suspensió de *Coptis japonica*, per la indústria Mitsui Chemicals Inc. (Japó). És un antidiabètic.
- El taxol® o paclitaxel, que es produeix industrialment a partir de cèl·lules en suspensió d'espècies de *Taxus* per l'empresa Phyton Biotech Inc. (USA/ Alemanya) i per Samyang Biopharmaceuticals Corp. (Korea). És un anticancerígen.

- Els ginsenòsids també s'obtenen biotecnològicament a nivell industrial per l'empresa Nitto Denko Corporation al Japó. Es tracta de cultius de cèl·lules en suspensió de *Panax ginseng*. Tenen activitat adaptògena.
- Els polisacàrids d'*Echinacea* spp. també s'obtenen biotecnològicament a partir de cultius cel·lulars per l'empresa Diversa (Alemanya). Són compostos amb propietats antivíriques.

En els casos en què la biosíntesi d'un compost a la planta està restringida a un òrgan específic, els sistemes no organitzats, com els cultius de cèl·lules vegetals, a vegades no són adequats per a la seva biosíntesi, i llavors, la seva producció es basa en l'establiment de cultius d'òrgans com són les arrels o els brots de part aèria (Hussain i col. 2012).

Moltes vegades les arrels cultivades *in vitro* d'una planta tenen poc creixement i quan s'intenta augmentar-lo, afegint auxines al medi de cultiu, aquestes arrels no són productives.

En aquest context, els cultius d'arrels transformades obtingudes per transformació genètica de cèl·lules vegetals amb una soca d'*Agrobacterium rhizogenes* presenten un ràpid creixement al ser cultivades aïlladament i normalment produeixen el mateix perfil de metabòlits secundaris que les arrels de la planta original (Pistelli i col. 2010). En el procés de transformació genètica, l'*A. rhizogenes* transfereix un fragment del seu DNA, el T-DNA o DNA de transferència, que conté els anomenats gens *rol* (root locus) i que condicionen a la cèl·lula vegetal receptora a dividir-se i desenvolupar-se com una arrel. Igual que els cultius de cèl·lules vegetals, els cultius d'arrels transformades han estat utilitzats per a la producció de compostos vegetals bioactius escassament distribuïts a la naturalesa o amb complexes estructures que fan que la seva síntesi química sigui inviable. Un exemple és la producció de l'anticolinèrgic escopolamina a partir d'arrels transformades de *Duboisia* spp. per l'empresa Sumitomo Chemical Co Ltd (Japó), o la producció de ginsenòsids mitjançant el cultiu d'arrels transformades de *Panax ginseng*.

Així doncs, les biofàctories vegetals basades en cultius de cèl·lules en suspensió i arrels transformades representen una alternativa promete-



dora als cultius agronòmics per a la producció d'aquests compostos.

## **4. La Biologia sintètica**

La biologia sintètica pretén aplicar els principis de l'enginyeria al disseny i a l'alteració de sistemes naturals o bé a la construcció de nous dispositius biològics artificials i sistemes que presenten comportaments previsibles (Schwille 2011).

Imaginem-nos un futur en què les meduses sintètiques circulin per les vies fluvials a la recerca de toxines per destruir; on els plàstics i combustibles ecològics es recullin de tancs de llevat; on els virus estiguin programats per destruir el càncer i on els dispositius electrònics es reparin a si mateixos com organismes vius.

Aquest és el món de la biologia sintètica o "sinbio", on les possibilitats podriem dir que no tenen límit. Els seus professionals no veuen la vida com un misteri, sinó com una màquina que pot dissenyar-se per resoldre una sèrie de problemes urgents de salut, energia i medi ambient (Crow 2018).

Es tracta, doncs, de connectar peces vives per construir nous éssers vius. Els investigadors poden ordenar seqüències d'ADN en línia de la mateixa manera que els entusiastes de l'electrònica compren peces a eBay. Els components de treball s'enumeren en inventaris de parts biològiques estandaritzades. Aquesta cultura és altament col·laborativa, amb biòlegs sintètics que comparteixen dades i eines amb el mateix esperit que impulsa els moviments de codi obert, de copyleft (domini públic, sense drets d'autor) i de bricolatge.

Dit d'una altra manera, la biologia sintètica és una nova àrea interdisciplinària que implica l'aplicació de principis d'enginyeria a la biologia. El seu objectiu és el re-disseny i fabricació de components i sistemes biològics que encara no existeixen al món natural.

La biologia sintètica combina la síntesi química de l'ADN amb un coneixement creixent de genòmica per permetre als investigadors fabricar ràpidament seqüències d'ADN catalogades i muntar-les en

nous genomes.

Les millores de la velocitat i el cost de la síntesi d'ADN permeten als científics dissenyar i sintetitzar cromosomes bacterians modificats que es poden utilitzar per a la producció de biocombustibles avançats, bioproductes, productes químics renovables, productes químics especialitzats amb base-bio (com productes intermedis farmacèutics, productes químics fins, ingredients alimentaris), i també en el sector assistencial.

Ens podem preguntar quina diferència hi ha entre la biologia sintètica i la biologia de sistemes i com encaixa en tot això l'enginyeria genètica. Doncs, la biologia de sistemes estudia sistemes biològics naturals complexos com a components integrats, utilitzant eines de modelat, simulació i comparació per experimentar. La biologia sintètica estudia com construir sistemes biològics artificials, utilitzant moltes de les mateixes eines i tècniques experimentals. El focus se centra sovint en prendre parts dels sistemes biològics naturals, caracteritzar-los i simplificar-los, i després utilitzar-los com a components d'un sistema biològic enginyeritzat. Resumint, la biologia de sistemes proporciona els coneixements de base per al disseny i la construcció de la biologia sintètica, i la biologia sintètica millora el coneixement a nivell de sistema mitjançant la reconstrucció.

Pel que fa a l'enginyeria genètica, aquesta implica generalment la transferència de gens individuals d'un microbi o cèl·lula a un altre; la biologia sintètica, en canvi, preveu la construcció de nous genomes microbians a partir d'un conjunt de peces genètiques estandaritzades que després s'insereixen en un microbi o cèl·lula.

Alguns dels objectius de la biologia sintètica són:

1. Desenvolupar peces biològiques estandaritzades: Per fer això, s'identifiquen i cataloguen les parts genòmiques normalitzades que es poden utilitzar (i sintetitzar ràpidament) per construir nous sistemes biològics.
2. El disseny aplicat de proteïnes: Redissenyar les peces biològiques existents i ampliar el conjunt de funcions de proteïnes naturals per a nous processos.

3. La síntesi de productes naturals: Enginyeritzar microbis perquè produeixin tots els enzims i funcions biològiques necessàries per realitzar la producció complexa de diversos productes naturals (Cravens i col 2019).

4. La genòmica sintètica: Dissenyar i construir un genoma “senzill” per a un bacteri natural.

Alguns exemples de companyies de biologia sintètica són:

1. Les empreses comercials que venen ADN sintètic (oligonucleòtids, gens o genomes) als usuaris, són empreses de síntesi d'ADN, com: ATG:biosynthetics, Blue Heron Biotechnology, DNA 2.0, GENEART i Genomatica.

2. Les empreses que estan construint nous sistemes biològics per a bioproductes, biocombustibles i pel sector sanitari; inclouen Amyris Biotechnologies Inc., Codexis, Genencor (una divisió de Danisco), Life Technologies, Genomatica, Qteros, CODA Genomics, Genetics modulars , DNA2.0 Inc., Verdezyne, DSM, Myriant, Gevo Inc., LS9 Inc., OPX Biotechnologies, Solazyme i Synthetic Genomics Inc.

### **Com encaixa aquí la biotecnologia industrial?**

La biotecnologia industrial proporciona eines per millorar els mecanismes naturals dels processos biològics per tal de produir eficientment enzims, productes químics, polímers, o fins i tot productes quotidians com vitamines i combustible. Els científics han estudiat els genomes dels microbis per identificar processos biològics que poden substituir les reaccions químiques per fer nous productes, operacions de fabricació més netes i reduir el nombre de passos de producció.

Per exemple, aprofitant el poder natural dels enzims o sistemes cel·lulars sencers i utilitzant sucres com a matèria prima per a la fabricació de productes, les empreses biotecnològiques industrials poden treballar amb la natura per ajudar-nos a passar d'una economia basada en el petroli a una “economia basada en bio”.

Actualment les innovacions en biotecnologia industrial competeixen

amb èxit i substitueixen els processos de fabricació petroquímica tradicionals. Les empreses que adopten biotecnologia industrial troben que poden reduir costos, reduir la contaminació i la seva petjada de carboni i augmentar la rendibilitat.

Els científics i les empreses industrials biotecnològiques han estat utilitzant formes de biologia sintètica des de fa anys, incloent l'acoblament de gens, l'enginyeria metabòlica i l'evolució dirigida. Els microorganismes dissenyats s'utilitzen en dipòsits de fermentació tancats per produir els productes finals desitjats. Els microbis mil·lorats genèticament (GEM) estan regulats per la Llei de control de substàncies tòxiques.

Com acabem de comentar, la biologia sintètica obre noves possibilitats per modificar o fabricar organismes vius. Per això, la biologia sintètica es troba amb el “dilema del doble ús” de les tecnologies, cosa que significa que la tecnologia es pot utilitzar bé o malament amb propòsits nefastos. Tot i que no es pot eliminar per complet la possibilitat d'abús de la biologia sintètica, es poden minimitzar els riscos mitjançant la consciència plena dels perills i mitjançant l'aplicació adequada de mesures ètiques i reguladores pertinents (Wang i Zhang 2019).

## **4.1. Evolució de la Biologia sintètica**

Els anys setanta i vuitanta va sorgir l'enginyeria genètica amb finalitats mediambientals, com la bioremediació. Es va desenvolupar un bacteri capaç de digerir components del petroli. De fet, la primera patent de biotecnologia va ser per a un microorganisme de neteja de vessaments de petroli.

L'any 2002, Eckard Wimmer, de la Universitat Estatal de Nova York a Stony Brook, va sintetitzar el genoma del virus de la poliomièlitis. Aquest genoma va proporcionar un virus viu de poliomièlitis que podria infectar i matar ratolins.

L'any 2003, científics del J. Craig Venter Institute (JCVI) dirigits pels Drs. Smith, Hutchinson i Venter van construir *in vitro* un cromosoma totalment sintètic (PhiX174) en només 14 dies i van publicar els re-

sultats a la Proceedings of the National Academy of Sciences (Smith i col 2003).

Al desembre de 2004, George M. Church de la Harvard Medical School i Xiaolian Gio de la Universitat de Houston van anunciar que havien inventat una nova tècnica de síntesi d'ADN "multiplex" que acabaria reduint el cost de la síntesi d'ADN a 20.000 parells de bases per dòlar (Tian i col 2004)

A principis del 2006, el doctor Jay Keasling, director del Centre de Biologia Sintètica de Berkeley i tres investigadors postdoctorals van descobrir i re-enginyar un llevat que contenia gens bacterians i de donzell (*Artemisia absinthium*) convertint-lo en una fàbrica productora d'un precursor de l'artemisinina per a ser utilitzat com a fàrmac barat contra la malària (Ro i col 2006).

Al juny de 2007, el JCVI va desenvolupar mètodes de trasplantament de genoma per transformar un tipus de bacteri en un altre tipus segons el cromosoma trasplantat i va publicar els resultats a la revista Science (Lartigue i col 2007).

El gener del 2008, el JCVI va construir el primer genoma bacterià sintètic, *Mycoplasma genitalium* JCVI-1.0 (525 gens), que representava la major estructura d'ADN creada per l'home. Tanmateix, la lenta taxa de creixement de *M. genitalium* (que té un temps de divisió de 16 hores) significava que un sol experiment podria trigar diverses setmanes a completar-se, així que, malgrat el seu genoma minúscul, *M. genitalium* va ser substituït per *M. mycoides*, que té el genoma més gran (901 gens) però un creixement més ràpid (Gibson i col 2008; Sleator 2010).

Per tant, el 2010, científics del J. Craig Venter Institute (JCVI) van fabricar la primera forma de vida sintètica del món: una rèplica del bacteri del bestiar *Mycoplasma mycoides* (1079kb i 901 gens). L'anomenaren "JCVI-syn 1.0" i el seu codi d'ADN va ser escrit en un ordinador, acoblat en un tub d'assaig i inserit a la carcassa buida d'un bacteri diferent. L'organisme unicel·lular té quatre "filigranes" escrites al seu ADN per identificar-lo com a sintètic (Gibson i col 2010). Aquesta és, doncs, la primera cèl·lula bacteriana que conté un

genoma completament sintètic i, per tant, és la primera ciutadana de la biologia sintètica, es va anomenar “Synthia”.

El treball del doctor Venter sobre aquest bacteri és similar, en principi, al del primer virus sintetitzat uns anys abans, el de la poliomielitis, excepte que el genoma del virus de la poliomielitis sintetitzat té només 7.500 pb i el genoma del bacteri és més de 100 vegades més gran. S’havia aconseguit la síntesi, el muntatge i el trasplantament d’un genoma, que són passos essencials que permeten aconseguir l’objectiu final que és una cèl·lula activada totalment sintètica.

Al 2016 l’equip de Venter, a partir d’aquest bacteri sintètic JCVI-syn1.0, rèplica de *M. mycoides*, va fabricar un *M. mycoides* amb la quantitat mínima de gens necessaris per viure, el va anomenar JCVI-syn3.0 i consta de només 473 gens. Aquesta forma de vida té aproximadament la meitat dels gens que el seu precursor (Hutchison III i col 2016). Durant la obtenció del JCVI-syn 3.0 es varen utilitzar 4 cicles de Disseny-Construcció-Prova (en anglès DBT, de Design-Build-Test) i el tercer cicle va donar lloc al JCVI-syn2.0, la primera cèl·lula sintètica minimitzada, amb un genoma menor que *M. genitalium*.

## 4.2. Aplicacions de la Biologia sintètica

Els biòlegs sintètics estan construint organismes que poden satisfer les nostres necessitats materials d’una manera més neta i més verda (Crow 2018).

Darrerament s’ha innovat en els següents projectes:

### 1. Medicina:

A) El laboratori de Timothy Lu, “The Synthetic Biology Group”, a Harvard, combina computació, medicina i biologia. Com a resultat d’aquestes disciplines han sortit projectes força revolucionaris. Un d’ells busca programar virus que aniquilin el càncer. L’equip ha programat virus per augmentar la capacitat del sistema immunitari i combatre el càncer. El càncer es propaga quan un contingent de l’exèrcit immune conegut com a cèl·lules T assassines no està fent la seva feina correctament. A vegades no detecten les cèl·lules canceroses, altres

vegades les cèl·lules canceroses desarmen el seu armament. Per a millorar l'eliminació de cèl·lules cancerígenes, el grup de Lu va carregar un virus amb un circuit genètic que transmet senyals d'alarma anomenades citocines. Quan el virus infecta una cèl·lula cancerosa, el circuit envia una alarma que alerta a les cèl·lules T assassines sobre el càncer. També allibera un compost per evitar que la cèl·lula cancerosa desarmi la cèl·lula T assassina. Per garantir que les cèl·lules normals infectades pel virus no acabin com a dany col·lateral, el circuit genètic només respon en presència de dues proteïnes específiques del càncer, myc i E2F. Els gens operen com una “porta lògica” en un circuit electrònic, amb el virus alliberant la seva càrrega útil només quan es detecten les dues proteïnes. “El llenguatge informàtic facilita el procés de disseny”, diu Lu. Fins ara han aconseguit tractar el càncer d'ovari en ratolins.

B) La major història d'èxit de la biologia sintètica fins ara és la síntesi d'artemisinina, l'ingredient clau en els millors medicaments d'avui dia per a combatre malària. El Dr Jay Keasling i els seus col·legues de la Universitat de Califòrnia, Berkeley, van fer possible la seva producció a gran escala i van descobrir com fer-ho utilitzant el llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Paddon i Keasling 2014). La artemisinina va ser aïllada per primera vegada de la planta *Artemisia annua*, a principis de la dècada de 1970 per la química xinesa Youyou Tu, un descobriment que finalment li faria guanyar una part del Premi Nobel de Medicina 2015.

*Artemisia annua* produeix artemisinina a partir d'una molècula precursora anomenada farnesil pirofosfat (FPP). Les cèl·lules de llevat també produeixen FPP, que utilitzen com a material de partida per a produir ergosterol, un component bàsic de les parets cel·lulars del llevat.

L'equip del Dr. Keasling va augmentar l'expressió dels gens de llevat que produeixen FPP i va rebutjar els gens que converteixen FPP en ergosterol. Després va prendre un gen de la planta que converteix el FPP en àcid artemisínic i el va inserir en el genoma del llevat. Al laboratori es va fer el petit pas de convertir l'àcid artemisínic en artemisinina. El Dr Keasling i els seus col·laboradors van establir una companyia anomenada Amyris per comercialitzar l'artemisinina sintètica. El 2008 va lliurar la tecnologia a l'empresa farmacèutica francesa Sanofi.

## 2. Bio-combustibles:

A) Els científics d'Amyris van dissenyar una ruta sintètica per convertir el FPP en l'hidrocarbur farnèsè, l'únic biocombustible prou dens en energia per a ser aprovat com a combustible pels avions. A més de ser un substitut dels combustibles fòssils, el farnèsè també té el benefici ambiental de no expulsar ni partícules ni sofre. I quan es crema, fa olor a pomes verdes.

B) Un altre avanç en aquesta àrea ha sigut el de l'empresa Synthetic Genomics de Craig Venter, que va aconseguir duplicar la concentració d'olis a l'alga *Nannochloropsis gaditana*, permetent així reduir els costos de l'extracció de l'oli i donant un altre pas cap a la producció de combustibles a partir de les algues.

Les algues produeixen oli i només requereixen aigua salada i llum solar per créixer, però en produeixen poc i recol·lectar-lo és costós. Perquè sigui econòmicament viable cal augmentar la taxa de creixement de les algues i la quantitat d'oli produït. Fins ara, no hi havia solució: si es vol duplicar la producció d'oli es priva les algues de nitrogen, però això paralitza el seu creixement. L'equip de Synthetic Genomics va identificar l'interruptor genètic per produir oli en l'alga *Nannochloropsis gaditana*, després el va ajustar per produir oli fins i tot quan el nitrogen és abundant. El resultat va ser una duplicació del contingut d'oli en les algues, del 20% a més del 40%, sense un impacte significatiu en el seu creixement (Ajjawi i col 2017). Encara que no és suficient per a la viabilitat comercial, Venter segueix sent optimista perquè eventualment les algues proporcionaran una font d'energia alternativa viable.

**3. Productes cosmètics:** Si bé els guanys dels bio-combustibles encara poden estar molt lluny, les noves empreses de biologia sintètica veuen guanys més immediates a l'equipar les seves fàbriques vives per obtenir productes de gran marge, com els productes cosmètics.

El farnèsè produït pel llevat s'està utilitzant per fabricar productes per a la cura personal com la vitamina E, el pàtxulol (de l'oli de pàtxuli) i l'esqualè, un compost obtingut dels fetges dels taurons, que és apreciat pels seus atributs com humectant de la pell i altres beneficis terapèutics.

L'estructura química que li dóna al farnèsè l'olor de les pomes ver-



des s'està aprofitant al laboratori de la Dra Vickers a la Universitat de Queensland. El seu equip ha tornat a dissenyar llevats i bacteris per produir hidrocarburs com el farnesè que, entre altres coses, emeten fragàncies que es poden comercialitzar. La longitud ho és tot per a aquesta classe d'hidrocarburs, coneguts com isoprenoides. La Dra Vickers diu que el seu equip produeix cadenes de 10-15 carbons que no només emeten olors agradables, sinó que també poden ajudar a produir bio-combustibles, repel·lents d'insectes, vitamines i hormones utilitzades en l'agricultura per modificar l'estructura i el creixement de les plantes.

**4. Bio-plàstics:** Si tallem els isoprenoides fins arribar a una cadena de cinc carbonis tindrem l'isoprè, la matèria primera per al cautxú, que tradicionalment s'extreia de l'arbre del cautxú. El cautxú sintètic es va fabricar per primera vegada a principis del 1900, i ara gairebé tot el cautxú prové del processament de gairebé un milió de tones d'isoprè a partir del petroli cru cada any. Genencor, una companyia amb seu a Califòrnia, va dissenyar bacteris per produir isoprè d'una manera més sostenible (Bourzac 2010). L'empresa Dupont va comprar la companyia i ha produït bio-isoprè per fabricar pneumàtics conceptuals amb la marca Goodyear.

La biologia sintètica també ofereix una opció més ecològica per a plàstics com el niló. Actualment, la producció de niló a partir del petroli cru representa el 10% de les emissions d'òxid nitrós produïdes per l'home, un gas d'efecte hivernacle aproximadament 300 vegades més potent que el diòxid de carboni. El laboratori del Dr Keasling a Berkeley va dissenyar un bacteri que produeix àcid adípic, la molècula utilitzada per fabricar niló.

Si bé la competència amb els productes derivats del petroli és ferotge i dinàmica, aquests productes de biologia sintètica (medicaments, cosmètics, perfums i plàstics) ja estan transformant la manera de fabricar productes bàsics de la vida moderna.

**5. Sensor d'arsènic:** S'estima que cada dia 200 milions de persones beuen aigua enverinada per alts nivells d'arsènic. Si tan sols tinguessin una prova ràpida per veure els seus pous es podrien evitar moltes intoxicacions. Una col·laboració entre investigadors de les universi-

tats de Cambridge i Edimburg està desenvolupant una prova d'arsènic fiable i barata que explota les capacitats naturals dels bacteris, és el biosensor d'arsènic. Els microbis poden detectar concentracions d'arsènic inferiors a 10 ppb, el llindar de l'OMS per a beure de manera segura. La tecnologia es va originar en dos projectes empresos per la competició internacional de Màquines d'Enginyeria Genètica (iGEM), un concurs on els estudiants universitaris s'uneixen per resoldre problemes globals amb l'ajuda de la biologia sintètica.

Chris French, de la Universitat d'Edimburg, va dirigir un equip que va convertir el bacteri *E. coli* en un sensor d'arsènic, al cablejar-li dos gens. Un gen detecta arsènic i activa gens per expulsar-lo fora de la cèl·lula i l'altre gen permet que els bacteris digereixin la lactosa, produint àcid làctic. La nova connexió dels gens implica posar el gen per digerir la lactosa sota el control del gen sensor d'arsènic. Quan es detecta arsènic, el gen que digereix lactosa s'encén. L'àcid làctic que produeix amb la digestió de la lactosa fa que l'aigua sigui més àcida, i això es pot detectar amb un indicador de pH barat: si la lectura és blau, l'aigua és segura, i si dona groc vol dir que és perillosa. A la Universitat de Cambridge, un grup dirigit per Jim Ajioka va convertir l'invent en un sensor de la mida d'una targeta de crèdit per poder-lo utilitzar de manera pràctica al camp.

Ara el veritable obstacle és obtenir l'aprovació regulatòria. Els països que es podrien beneficiar més de la tecnologia, com Bangladesh, no tenen el marc regulador per provar i aprovar el biosensor. El pla és associar-se amb investigadors dels EEUU perquè el biosensor sigui provat i aprovat allà. Això hauria d'aplanar el camí per a la seva acceptació en altres llocs.

**6. Cèl·lules que construeixen circuits:** L'equip de Biologia Sintètica de Harvard del Dr Lu, ha dissenyant bacteris per produir plaques de circuits electrònics que funcionen. Com a metge, Lu sabia que els bacteris es protegeixen dels antibiòtics unint-se i produint una bio-pel·lícula que està formada per proteïnes anomenades fibres de curli, aquestes fibres s'enreden com velcro per donar una làmina atapeïda. La proteïna curli és un tipus de fibra amiloide produïda per certes soques d'enterobacteris. Com a biòleg sintètic, el Dr Lu es va preguntar si aquesta bio-pel·lícula podria formar l'estructura d'un circuit viu.

El grup que ell dirigeix va redissenyar l'ADN dels bacteris perquè algunes de les proteïnes de fibra de curly (subunitats CsgA) s'unissin als metalls, cosa que moltes proteïnes poden fer. Van programar diferents bacteris de manera que alguns produïssin fibres arrissades d'unió a metalls mentre que d'altres no. Això els va permetre programar un patró en la bio-pel·lícula, una mica com imprimir un patró a la roba. Després van ruixar àtoms d'or sobre la bio-pel·lícula perquè s'unissin a les proteïnes i així formar camins de filferros d'or. Per completar la placa del circuit, els científics van equipar altres fibres proteïques per unir-se a “punts quàntics”, semiconductors a nanoescala que emeten llum.

Lu descriu el treball, publicat a *Nature Materials* al 2014, com una prova de concepte per inspirar el que és possible fer: sensors ambientals per a metalls, esponges per extreure or dels relaves i panells solars auto-reparables (Chen i col 2014).

Al 2017, Lingchong You de la Universitat de Duke va fer un sensor de pressió a nanoescala. Va utilitzar la tècnica per generar bio-pel·lícules que formen estructures en forma de cúpula de la mida d'una piga. Cada cúpula estava connectada a una bombeta LED a través d'un cablejat de coure. Quan es va aplicar pressió a les cúpules, va canviar la conductivitat i la brillantor de les bombetes. Havia fabricat un sensor de pressió viu i auto-reparable.

**7. Sentinelles de medusa:** La Dra Nina Pollak de la Universitat de Sunshine Coast a Queensland està sintetitzant meduses per netejar vessaments tòxics. El 2012, la científica nascuda a Àustria es va inspirar en un estudi publicat per Kevin Kit Parker a l'Institut Wyss d'Enginyeria Biològica de Harvard. El grup de Parker havia transformat les cèl·lules musculars del cor de la rata en una criatura nedadora anomenada “medusoide” (Nawroth 2012).

Començant amb un disseny d'ordinador, els investigadors van col·locar cèl·lules de múscul cardíac de rata en una bastida de polímer de silicona amb forma de flor de vuit pètals. Es podia fer que la criatura nedés amb polsos d'electricitat: la corrent que flueix fa que el múscul es contragui; quan la corrent s'atura es relaxa i la silicona elàstica de la medusoide la torna a la seva forma original. El moviment fa ressò del que utilitzen les meduses per impulsar-se.

L'objectiu de Parker amb la medusoide era modelar el batec d'un cor i provar noves drogues, Pollak en cavi, va imaginar la possibilitat de crear un viatger aquàtic per detectar i netejar contaminants oceànics. El seu enfocament es basa en dirigir les cèl·lules mare embrionàries de ratolí a formar cèl·lules cardíques, el batec de les quals hauria de proporcionar el moviment. Les cèl·lules mare també es dissenyaran per transportar un gen que detecta l'organofosfat tòxic, un pesticida comú en els residus aquosos agrícoles, i altres gens que després poden descompondre els tòxics químics. El resultat final és un organisme semblant a una medusa que pot atrapar i destruir contaminants. Sembla que aquest ambiciós projecte valdrà la pena si ofereix una solució pels vessaments tòxics.

## **5. La Biologia sintètica vegetal: una disciplina emergent**

La biologia sintètica de plantes és un camp emergent que combina principis d'enginyeria amb biologia vegetal per el disseny i la producció de nous dispositius “vius”. Aquest camp emergent ha de jugar un paper important en la futura agricultura per a la millora tradicional de cultius, però també ha de permetre una nova bioproducció en plantes.

Es pot enfocar de dues maneres, o ajustant un model més antic per millorar l'eficàcia (anar de dalt a baix) o construint un model nou des de zero (anar de baix a dalt). L'enfocament de dalt a baix parteix d'un sistema vegetal ja existent i pretén fer un sistema amb una mida mínima i amb el menor nombre de parts, reduint la seva complexitat. L'enfocament de baix a dalt comença amb peces individuals per fer sistemes biològics artificials amb noves propietats.

Utilitzant qualsevol dels dos processos, l'objectiu de la biologia sintètica és redissenyar un sistema per a un propòsit particular i per entendre millor la biologia utilitzant la reconstrucció (Liu i Stewart 2015).

Hem vist que la biologia sintètica va començar en els sistemes bacterians i ha anat avançant cap als eucariotes, incloses les plantes. Amb la invenció dels primers circuits sintètics com l'interruptor de palanca genètica i el “repressor”, la primera onada en biologia sintètica va esser la construcció de circuits genètics artificials i petits mòduls per a

demostrar la prova de concepte. La segona onada de biologia sintètica produeix i prova circuits a nivell de sistemes en sistemes ja establerts, així, la biologia sintètica microbiana beneficia la biologia sintètica de plantes, almenys de dues maneres: Una, els principis i conceptes de disseny desenvolupats per la biologia sintètica amb bacteris són realment aplicables a les plantes pel que fa a l'expressió gènica i a la funció cel·lular bàsica. L'altre manera, algunes parts microbianes s'estan utilitzant directament en plantes per millorar el disseny i la construcció de noves funcions de la planta.

## 5.1. Exemples pioners de Biologia sintètica vegetal

Actualment, només hi ha alguns exemples de biologia sintètica vegetal publicats, com ara la producció de sensors sintètics i de rutes metabòliques sintètiques. Hi ha hagut passos cap a la producció de genomes sintètics de plantes, però encara s'està a les primeres etapes.

**A) Sensors sintètics:** Els sensors sintètics poden ser contruïts per actuar a nivell transcripcional o post-traducciona quan s'incorporen a organismes dissenyats i permeten que les cèl·lules identifiquin i informin de la presència d'estímuls interns o externs.

Un bon exemple de sensor que actua a nivell post-traducciona és la construcció de circuits sintètics, incorporats a llevats, que supervisen la degradació, induïda per auxina, de l'àcid indol-3-àcètic (AIA) vegetal. Aquest sensor permet estudiar el comportament de l'AIA i el seu receptor de manera aïllada, és a dir, sense implicar les rutes pròpies de la planta que intervenen en la senyalització auxínica.

Un altre sensor sintètic que s'ha construït en *Arabidopsis* i blat de moro és el que controla, a nivell transcripcional, la xarxa de senyalització de les cinines vegetals. La cinina s'uneix als seus receptors i inicia una cascada de senyalització que acaba fosforilant els activadors de transcripció nuclears.

Altres bons exemples són els circuits sintètics que configuren els fitosensors d'explosius o de patògens bacterians en tabac transgènic i *Arabidopsis* (Liu and Stewart 2015).

**B) Rutes metabòliques sintètiques:** Un dels objectius de la biologia sintètica vegetal és la construcció de rutes metabòliques sintètiques per a la producció de grans quantitats de metabòlits valuosos o fitoquímics, difícils d'obtenir en condicions naturals, o massa costosos, o inviablès de produir-se per síntesi química, o per la biotecnologia vegetal convencional. Així doncs, es poden aconseguir noves rutes biosintètiques alterant l'expressió dels enzims individuals que les configuren. Per exemple, l'expressió específica en vasos conductors del gen de la cinamoil-CoA 4-ligasa i la introducció d'un bucle de retroalimentació artificial, que expressi un factor de transcripció de les fibres mare amb un dels seus promotors induït, en mutants d'*Arabidopsis* va donar lloc a un contingut en lignina reduït i una deposició més gran de polisacàrids per a la producció de biocombustible (De Meester i col 2018).

També es poden combinar de manera nova enzims biosintètics individuals per a produir metabòlits d'interès. Un bon exemple és la producció del sesquiterpè àcid artemisínic en llevat com a precursor de medicaments antimalàrics. Es va obtenir una producció 500 vegades més alta d'àcid artemisínic mitjançant múltiples modificacions, que podem resumir en dues: Una afecta a la ruta principal de biosíntesi dels sesquiterpens i va consistir en potenciar la formació de farnesildifosfat (FPP), precursor dels sesquiterpens, i al mateix temps bloquejar la utilització del FPP per a la síntesi d'esterols. L'altre modificació es va fer introduint el gen de l'amorfadiè sintasa d'*Artemisia annua*, per convertir el FPP en amorfadiè, que és precursor de l'àcid artemisínic. D'aquesta manera, reemplaçant i afegint parts seleccionades, es va desenvolupar una ruta sintètica més eficient per a la producció del potent antimalàric artemisinina en els llevats (Ro i col 2006, Paddon i col 2013).

D'altre banda, es pot construir una ruta metabòlica sintètica sencera per a la producció de compostos nous. Per exemple una mini-ruta metabòlica sintètica construïda a partir de gens bacterians i introduïda a la patatera, incrementa 3600 vegades la producció de  $\beta$ -carotè. Aquesta mini-ruta està formada per 3 gens d'*Erwinia* que codifiquen per la fitoè sintasa, la fitoè desaturasa i la licopè  $\beta$ -ciclasa sota el control del promotor específic del tubercle. Així s'obtenen patates daurades pel seu contingut en  $\beta$ -carotè (Diretto i col 2007).

L'augment de l'activitat d'enzims clau i per tant del flux de metabòlits cap a la producció de compostos útils, són punts clau per a la construcció de les rutes metabòliques sintètiques. Això demana conèixer les vies i xarxes bioquímiques dels metabòlits secundaris d'interès, així com comprendre el metabolisme de les plantes. Aquests coneixements es podran guiar més tard per les tècniques de modelització metabòlica a escala genòmica i per l'anàlisi del flux metabòlic.

**C) Genomes vegetals sintètics:** Un dels objectius, encara llunyans, de la biologia sintètica és la construcció de nous genomes.

Després de la construcció d'una cèl·lula bacteriana que alberga un genoma de *Mycoplasma* sintètic (Gibson i col 2010) i de la síntesi del braç dret del cromosoma IX i d'una part del cromosoma VI del llevat (Dymond i col 2011), s'han desenvolupat tres principis pel disseny de genomes sintètics:

(1) els genomes sintètics resultants haurien de tenir fenotips i forma física propers als del tipus salvatge; (2) no han de contenir elements desestabilitzadors (gens d'ARNt i transposons); i (3) hi hauria d'haver flexibilitat genètica per a futurs estudis (per exemple, llocs d'edició del genoma).

L'any 2014 es va fer la síntesi completa del cromosoma III de *Saccharomyces cerevisiae*, es va substituir el cromosoma III natural d'aquest llevat per el sintètic, i va resultar ser un cromosoma funcional (Annaluru i col 2014).

Encara que estigui en un futur llunyà, la construcció d'un genoma racionalitzat en una planta serà un èxit important per la biologia sintètica vegetal, aquest fet està limitat principalment per un coneixement insuficient sobre el mínim conjunt de gens necessari per fer un genoma (Scharff i Bock 2014; Juhas i col 2011). En comparació amb la construcció de genomes sintètics, la seva implementació amb èxit serà encara més desafiant (Baker 2011). Per tant, té sentit iniciar el repte del genoma sintètic vegetal començant per un genoma ja racionalitzat: el plastoma cap a la producció d'un cloroplast sintètic. La naturalesa procariota de l'estructura genètica del plastoma hauria de ser favorable per construir circuits sintètics en plantes.

L'any 2011 es va publicar un treball enfocat a obtenir un cloroplast sintètic i introduir-lo en cèl·lules de mamífer. Per això, es va dissenyar el cianobacteri fotosintètic *Synechococcus elongatus* PCC 7942 i va ser injectat en embrions de peixos zebra i en macròfags de mamífers. Els resultats varen demostrar que aquests bacteris fotosintètics fabricats poden envair i replicar-se dintre del citoplasma de cèl·lules de mamífer i, encara que a nivells marginals, donar cloroplasts animals artificials.

També es va obtenir un tabac amb el plastoma contenint la ruta sencera sintetitzada del mevalonat, en el qual múltiples gens de la ruta eran controlats coordinadament per un únic promotor en un operó artificial (Kumar i col 2012). Així, utilitzant el plastoma com a vector, s'obtidria una expressió alta i coordinada sense la necessitat de múltiples promotors, i això permetria aplicar la biologia sintètica a l'enginyeria metabòlica vegetal i la posterior edició del genoma de plantes.

Finalment dir que després dels primers circuits sintètics de plantes per a produir metabòlits vegetals, com el glucòsid cianogènic durrina (Kristensen i col 2005), l'artemisinina (Ro i col 2006) i els carotenoides (Diretto i col 2007), i de la detecció de la contaminació del camp amb trinitrotoluenè (TNT) mitjançant un fitosensor en plantes (Antunes i col 2011), la biologia sintètica vegetal ha arribat a la majoria d'edat. Els exemples que acabem de veure mostren el seu potencial.

S'han de tenir en compte els cicles de disseny de la biologia sintètica, així com els principis clau de l'enginyeria, les parts genètiques i les eines computacionals que es poden utilitzar en Biologia sintètica vegetal. Alguns exemples són pioners i demostren com es pot fer servir la biologia sintètica per modificar plantes per a fins específics. Aquests inclouen sensors sintètics, vies metabòliques sintètiques, genomes sintètics i sistemes de plantes artificials.

## **6. Conclusions i perspectives de futur**

La biologia sintètica, com tota disciplina nova, s'ha enfrontat i s'enfrontarà a molts obstacles al llarg de la seva història. Aquesta revolució científica està en els seus primers passos com a tal, però ja



ha avançat enormement des que es va aconseguir editar seqüències genètiques fins al desenvolupament de nous mètodes per a la producció de seqüències d'ADN a escala industrial.

El Dr. Francis Collins, director de l'Institut Nacional de Salut dels EEUU i director del "Projecte Genoma Humà", diu que la mutagènesi i l'evolució dirigida dels genomes existents podrien ajudar als biòlegs sintètics a compensar els buits actuals en el coneixement. A mesura que s'introdueixen més gens al sistema, cotinua dient Collins, "la incertesa augmenta exponencialment i topes amb els límits d'allò que pots fer amb el modelatge". Encara que ara els enfocaments computacionals no són prou sofisticats per dissenyar nous genomes, si que són bons per utilitzar com a patró els existents. Aquesta comprensió podria ajudar als investigadors a triar les xarxes cel·lulars ja disponibles per a realitzar noves tasques. "Comencem a veure que els laboratoris reconeixen que hi ha molt a explotar dins de la cèl·lula", diu Collins (Baker 2011).

El problema més difícil pot ser un dels menys discutits: posar en marxa el genoma. Tot i que s'han sintetitzat genomes grans i s'han introduït dins de les cèl·lules, aquests genomes no continuen produint proteïnes (Itaya 2005). El grup del Dr Venter havia escollit originalment *Mycoplasma genitalium* per al projecte de síntesi perquè el seu genoma era, aleshores, el més petit conegut: només 583kb. Però *M. genitalium* creix tan lentament que l'equip va canviar a *M. mycoides*, de creixement més ràpid, tot i que el seu genoma és el doble de gran. Sintetitzar l'ADN no és el pas limitant, afirma el Dr Venter, "es tracta molt més de la complexitat de la biologia en contrast amb la síntesi química". Segons ell, un dia, els genetistes podran dissenyar codis genètics a gran escala, fent possible aplicacions que encara no existeixen. I explica: "Després de seqüenciar el genoma humà, els analistes van argumentar que ja no hi havia més necessitat de seqüenciar, i vaig defensar que aquest era el punt de partida". "La qüestió de si la síntesi de tot el genoma serà útil resultarà insensata amb el temps, és com preguntar, per què voldríeu inventar un avió quan la gent ja té cavalls?" (Baker 2011).

Les ambicions de la Biologia sintètica poden semblar condemnades en un món on moltes persones tenen por d'organismes més modestament dissenyats, com els cultius transgènics. Però els biòlegs sintètics

són un grup optimista i estan lluitant per guanyar-se al públic que abans mirava amb recel les noves tecnologies, i per fer-se entendre per la societat amb la seva visió de crear un món més intel·ligent, més verd i més sostenible.

Pel que fa a la recerca existent en biològica sintètica vegetal, encara que petita, ha començat a avançar en l'aplicació de principis i metodologies de la biologia sintètica microbiana amb la introducció de promotors, gens, rutes i trets sintètics en plantes. S'espera que la biologia sintètica vegetal tingui un paper cada vegada més important a l'hora de proporcionar tolerància a l'estrès i d'augmentar la producció d'aliments, bio-combustibles, metabòlits terapèutics i fins i tot formes de vida completament sintètiques. No obstant, actualment el seu progrés és lent, costós i laboriós.

El desenvolupament de la biologia sintètica vegetal avui dia, està fonamentalment limitada no només per la disponibilitat de parts i mòduls sintètics ben caracteritzats i intercanviables, sinó també pel modelatge, muntatge i ajustament de les xarxes de gens sintètics. Les parts i mòduls biològics de vegades són propensos a la dependència del context i pot ser que no siguin del tot previsible. A més, la integració de dispositius sintètics en una planta planteja problemes de compatibilitat, com ara l'optimització del codó, la inestabilitat genètica, els efectes de posició genòmica i les incompatibilitats reguladores. Per superar aquests obstacles i limitacions, es necessita més investigació per millorar i accelerar els cicles de disseny en biologia sintètica de plantes.

## 7. Bibliografia

- Ajjawi I, Verruto J, Aqui M, Soriaga LB, Coppersmith J, Kwok K, Peach L, Orchard E, Kalb R, Xu W, Carlson TJ, Francis K, Konigsfeld K, Bartalis J, Schultz A, Lambert W, Schwartz AS, Brown R, Moellering ER. 2017. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nature Biotechnology* 35: 647–652.
- Annaluru N, Muller H, Mitchell LA, Ramalingam S, Stracqua-

- danio G, Richardson SM, Dymond JS, Kuang Z, Scheifele LZ, Cooper EM, Cai Y et al. 2014. Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome. *Science* 344 (6179): 55-58. DOI: 10.1126/science.1249252
- Antunes MS, Morey KJ, Smith JJ, Albrecht KD, Bowen TA, Zdunek JK, Troupe JF, Cuneo MJ, Webb CT, Hellinga HW, Medford JJ. 2011. Programmable Ligand Detection System in Plants through a Synthetic Signal Transduction Pathway. *PLoS ONE* 6, e16292. DOI: 10.1371/journal.pone.0016292
  - Baker M. 2011. The next step for the synthetic genome. *Nature* 473: 403-408
  - Bourzac K. 2010. Rubber from microbes. *MIT Technology Review* Mar 25. <https://www.technologyreview.com/s/418159/rubber-from-microbes/>
  - Bonfill M, Malik S, Mirjalili MH, Goleniowski M, Cusido R, Palazon J. 2013. Production and Genetic Engineering of Terpenoid Production in Plant Cell and Organ Cultures. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds.), *Handbook of Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, pp. 2761-2796. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6\_123
  - Bonfill M, Cusido RM, Lalaleo L, Palazon J. 2015. Plant cell and organ cultures as a source of phytochemicals In: Muñoz-Torres D, Vinardell MP (eds.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences V*, 2015: 33-49. *Research Signpost* 37/661 (2), Fort P.O. Trivandrum-695 023. Kerala (INDIA).
  - Bourzac K. 2010. Rubber from microbes. *MIT Technology Review* Mar 25. <https://www.technologyreview.com/s/418159/rubber-from-microbes/>
  - Bruening G, Lyons JM. 2000. The case of the FLAVR SAVR tomato. *California Agriculture* 54(4):6-7.
  - Cravens A, Payne J, Smolke Ch D. 2019. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. *Nature Communications* 10: 2142. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09848-w>

- Crow JM. 2018. Life 2.0: inside the synthetic biology revolution. *Cosmos* 78. <https://cosmosmagazine.com/biology/life-2-0-inside-the-synthetic-biology-revolution>
- Chen AY, Deng Z, Billings AN, Seker UOS, Lu MY, Citorik RJ, Zakeri B, Lu TK. 2014. Synthesis and patterning of tunable multiscale materials with engineered cells. *Nature Materials*: 13: 515–523.
- Christou P, Capell T, Bassie L, Zhu C, Naqvi S, Peremart. A, Ramessar K, Gmez S, Dashevskaya S, Yuan D, Sabalza M, Farr. G, Rivera SM, Miralpeix B. 2011. Canviar els gens per millorar el món. Pagès editors. Sant Salvador, 8 - 25005 Lleida (SPAIN).
- De Meester B, De Vries L, Özparpucu M, Gierlinger N, Corneillie S, Pallidis A, Goeminne G, Morreel K, De Bruyne M, De Rycke R, Vanholme R, Boerjana W. 2018. Vessel-Specific reintroduction of cinnamoyl-CoA reductase1 (CCR1) in dwarfed *ccr1* mutants restores vessel and xylary fiber integrity and increases biomass. *Plant Physiology* 176: 611–633.
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer B, Giuliano G. 2007. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS ONE* 2, e350. DOI:10.1371/journal.pone.0000350.
- Dymond JS, Richardson SM, Coombes CE, Babatz T, Muller H, Annaluru N, Blake WJ, Schwerzmann JW, Dai J, Lindstrom DL, Boeke AC, Gottschling DE, Chandrasegaran S, Bader JS, Boeke JD. 2011. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature* 477: 471–476.
- EB-Genetic engineering. The Editors of Encyclopaedia Britannica, Encyclopaedia Britannica 1998. <https://www.britannica.com/science/genetic-engineering>
- Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, Stockwell TB, Brownley A, Thomas DW, Algire MA, Merryman C, Young L, Noskov VN, Glass JI, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. 2008. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 319(5867): 1215-20.
- Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang R-Y, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM, Me-

- rryman C, Vashee S, Krishnakumar R, Assad-Garcia N, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Young L, Qi Z-Q, Segall-Shapiro TH, Calvey CH, Parmar PP, Hutchison III CA, Smith HO, Venter JC. 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329 (5987): 52-56. DOI: 10.1126/science.1190719
- Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazon J. 2013. Phenolic Acids. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds.), *Handbook of Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, pp. 1951-1973. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6\_123
  - Hidalgo D, Sanchez R, Lalaleo L, Bonfill M, Corchete P, Palazon J. 2018. Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures. *Curr Med Chem* 25: 3577-3596.
  - Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman MA, Ahmad IZ, Saeed M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 4(1): 10-20.
  - Hutchison III CA, Chuang R-Y, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, Gill J, Kannan<sup>3</sup> K, Karas BJ, Ma L, James F, Pelletier JF, Qi ZQ, Richter RA, Strychalski EA, Sun L, Suzuki Y, Tsvetanova B, Wise KS, Smith HO, Glass JI, Merryman C, Gibson DG, Venter JC. 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 351 (6280): 1414. DOI: 10.1126/science.aad6253
  - Itaya M, Tsuge K, Koizumi M, Fujita K. 2005. Combining two genomes in one cell: Stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *PNAS* 102 (44): 15971–15976. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503868102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503868102)
  - Juhas M, Eberl L, Glass JI. 2011. Essence of life: essential genes of minimal genomes. *Trends in Cell Biology* 21 (10): 562-568.
  - Kreuzer H, Massey A. 2008. *Molecular Biology and Biotechnology. A guide for teachers*. ASM Press, Washington DC.
  - Kristensen C, Morant M, Olsen CE, Ekstrøm CT, Galbraith DW, Møller BL, Bak S. 2005. Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on

the metabolome and transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1779–1784.

- Kumar S, Hahna FM, Baidoo E, Kahlon TS, Wood DF, McMahan CM, Cornish K, Keasling JD, Daniell H, Whalen MC. 2012. Remodeling the isoprenoid pathway in tobacco by expressing the cytoplasmic mevalonate pathway in chloroplasts. *Metabolic Engineering* 14 (1): 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.11.005>
- Lalaleo L, Khojasteh A, Fattahi M, Bonfill M, Cusido RM, Palazon J. 2016. Plant anti-cancer agents and their biotechnological production in plant cell biofactories. *Current Medicinal Chemistry* 23 (39): 4418-4441.
- Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, Pieper R, Parmar PP, Hutchison III CA, Smith HO, Venter JC. 2007. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 317(5838): 632-8. doi: 10.1126/science.1144622.
- Liu W, Stewart Jr CN. 2015. Plant synthetic biology. *Trends in Plant Science* 20 (5): 309-317.
- Malik S, Cusido RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazon J, Bonfill M. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry* 46: 23-34.
- Matsuura HN, Malik S, Costa F, Yousefzadi M, Mirjalili MH, Arroo R, Bhambra AS, Strnad M, Bonfill M, Fett-Neto AG. 2018. Specialized plant metabolism characteristics and impact on target molecule biotechnological production. *Molecular Biotechnology* 60: 169-183.
- Mothes K. 1980. Historical introduction, pp. 1–10, *in* E.A. Bell and B.V. Charlwood (eds.). *Secondary Plant Products*. Springer-Verlag, New York.
- Nawroth JC, Lee H, Feinberg AW, Ripplinger CM, McCain ML, Grosberg A, Dabiri JO, Parker KK. 2012. A tissue-engineered jellyfish with biomimetic propulsion. *Nature Biotechnology* 30: 792–797.
- Paddon CJ et al. 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496: 528–532.
- Paddon CJ, Keasling JD. 2014. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical develop-

- ment. *Nature Reviews Microbiology* 12: 355–367.
- Pierik RLM. 1997. *In vitro* Cultures of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, AH Dordrecht, The Netherlands.
  - Pistelli L, Giovannini A, Ruffoni B, Bertoli A, Pistelli L. 2010. Hairy root cultures for secondary metabolites production. *Adv Exp Med Biol* 698: 167-184.
  - Ro D-K, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440: 940–943.
  - Rouse M. 2019. *Biotechnology*. <https://whatis.techtarget.com/definition/biotechnology>
  - Scharff LB and Bock R. 2014. Synthetic biology in plastids. *Plant Journal* 78: 783–798.
  - Schwille P. 2011. Bottom-Up Synthetic Biology: Engineering in a Tinkerer’s World. *Science* 333 (6047): 1252-1254. DOI: 10.1126/science.1211701
  - Sharma P, Sharma S, Yadav S, Srivastava A, Puroit I, Shirivastava N. In: *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology*. Paek KY, Murthy HN, Zhong JJ, Ed. Springer Science+Business Media: Dordrecht, 2014, pp. 47-60.
  - Sleator, RD. 2010. The story of *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0: The forty million dollar microbi. *Bioengineered Bugs* 1(4): 229-230. doi: 10.4161/bbug.1.4.12465
  - Sleator, RD. 2016. JCVI-syn3.0 – A synthetic genome stripped bare! *Bioengineered* 7(2): 53–56. doi: 10.1080/21655979.2016.1175847
  - Smith HO, Hutchison III CA, Pfannkoch C, Venter JC. 2003. Generating a synthetic genome by whole genome assembly:  $\phi$ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides *PNAS* 100 (26) 15440-15445. <https://doi.org/10.1073/pnas.2237126100>
  - Tian J, Gong H, Sheng N, Zhou X, Gulari E, Gao X, Church G. 2004. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature* 432 (7020): 1050-1054.
  - USDA Forest Service. *Forest Management, Rangeland Management*

& Vegetation Ecology - Botany Program. Medicinal Botany. <https://www.fs.fed.us/wildflowers/ethnobotany/medicinal/index.shtml>

- Uthailak N, Takao O, Ryo M, Kazuhito F. 2018. The production of human  $\beta$ -glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture. *Int J Mol Sci.* 19(7): 1972.
- Wang F, Zhang W. 2019. Synthetic biology: Recent progress, biosafety and biosecurity concerns, and possible solutions. *Journal of Biosafety and Biosecurity* 1: 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2018.12.003>