

Jóvenes científicos

Hola, soy Ana Isabel Cotilla Martín, este año ya acabo el Grado de Biología. Estoy muy satisfecha de haber elegido estudiar este grado para formarme como bióloga. Esta rama de la ciencia está formada por muchas disciplinas interconectadas que son fascinantes. Para ser biólogo es muy importante entender que al especializarte en una disciplina no sólo vas a enfocarte en esas disciplinas sino que vas a necesitar conocer de otras, además debes ser curioso y preguntarte el porqué de las cosas. En mi caso yo soy alumna interna del departamento de Microbiología, y actualmente estoy realizando una investigación que tiene que ver con la parte más molecular de esta área. Por esta razón, cuando se me dio la oportunidad de entrevistar a Carmen Pizarro Martín, acepté sin pensarlo dos veces ya que ella está especializada en una nueva técnica molecular de edición de genomas CRISPR/Cas9 y para poder evolucionar como bióloga es necesario conocer todo tipo de técnicas.



ANA ISABEL COTILLA MARTÍN

Carmen Martín Pizarro. Investigadora en el Área de Biología molecular y Bioquímica de la UMA está investigando junto a su grupo sobre los factores de transcripción involucrados en la maduración de las fresas, a la vez que tratan de identificar genes que estén implicados en caracteres de calidad como el aroma de esta fruta tan popular y de tanta importancia en Andalucía. Carmen es licenciada en Biología por la Universidad de Málaga en el año 2003 y Máster 2005. Ha participado en varias publicaciones como «Functional analysis of the TM6 MADS-box gene in the octoploid strawberry by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis» Enero 2019, Carmen Martín-Pizarro, Juan Carlos Triviño, David Posé. En este artículo se describe por primera la aplicación de la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 a la fresa cultivada.

Ana Isabel Cotilla Martín (AICM): Buenos días Carmen, gracias por atenderme. Para comenzar nos podrías contar un poco sobre tu grupo de investigación.

Carmen Martín Pizarro (CMP): Buenos días, no hay de qué. Estoy trabajando en el grupo del Dr. David Posé, el cual obtuvo en 2015 un proyecto de la European Research Council. En el grupo trabajamos con fresas, tanto la especie cultivada (*Fragaria x ananassa*), la cual es una especie octoploide, como la especie silvestre (*Fragaria vesca*), diploide, y la cual es la especie modelo de la fresa cultivada. Se trata de un proyecto muy ambicioso en el cual, uno de los principales objetivos es identificar factores de transcripción implicados en la maduración del fruto de la fresa. El grupo está formado por 4 personas y cada uno es responsable de una parte diferente del proyecto, y con respecto a este objetivo general, cada uno está a cargo de una serie de estos factores de transcripción. Para el estudio de los mismos hemos generado plantas transgénicas en los cuales estos genes están silenciados como sobreexpresados, para así determinar y estudiar el efecto que tiene esto sobre diferentes aspectos de la maduración.

AICM: Para realizar estas construcciones usáis la técnica de CRISPR/Cas9. ¿Cómo habéis abordado este reto?

CMP: Uno de los objetivos de este proyecto era aplicar la

técnica de edición génica CRISPR/Cas9 en un organismo genéticamente tan complejo como es la fresa octoploide, ya que hasta la fecha no se había nada descrito en plantas tan complejas genéticamente y con ese grado de poliploidía. Hasta ahora, todos los estudios funcionales en fresa se habían hecho silenciando el gen de interés mediante el uso de construcciones de ARN interferente, pero a veces esta estrategia no es lo suficientemente eficiente, de manera que el gen puede no estar muy silenciado. Por ello, la posible aplicación de CRISPR permitiría tener fresas que sean mutantes (knock-outs) estables. Aunque hace poco se publicó un trabajo en el cual se aplicaba CRISPR en la especie silvestre (diploide), nosotros teníamos desde el principio el objetivo de comprobar la eficiencia de este sistema en la especie octoploide. Es un proceso complejo, ya que la transformación genética en fresa, aunque no es especialmente complicada, es lenta, ya que te puede llevar 6-8 meses hasta conseguir líneas transgénicas estables, tener un número de líneas importante, comprobarlas, y llevarlas a invernadero. Otro problema añadido es que la variedad con la que trabajamos (Camarosa) florece solo una vez al año, por lo que la disponibilidad de frutos es bastante limitada. Pero a pesar de esto, se aprende mucho al afrontar este reto y al solventar los problemas que van surgiendo.



La doctora Carmen Martín Pizarro en el laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la UMA donde desarrolla su labor investigadora.

AICM: Por lo que has hablado de la técnica de CRISPR, vosotros pretendíais poner a punto esta técnica en la fresa, pero ¿cómo lo habéis realizado?

CMP: Muchos estudios que hacen CRISPR por primera vez en plantas seleccionan como gen diana la Fitoeno desaturasa (*PDS*), la cual cuando se muta da un fenotipo albino. Es una elección muy buena para ver si funciona la edición o no de una manera rápida. Pero nosotros quisimos ir un poco más allá y seleccionar un gen del cual no se conociese su función en fresa, en concreto un factor de transcripción candidato a estar involucrado en el desarrollo de pétalos y estambres de la flor de fresa (*TM6*). Este gen nos pareció un buen candidato porque en caso de tener edición podíamos ver un fenotipo muy claro en flores. Para ello diseñamos dos RNAs guías (sgRNAs) frente a *TM6* para intentar aumentar la eficiencia del sistema. Además, el uso de dos sgRNAs puede generar una delección grande, lo cual favorece la obtención de knock-outs. Una vez generadas las construcciones, la comprobamos realizando transformaciones transitorias de frutos en la especie diploide. A pesar de que la eficiencia de esta estrategia no es muy buena, comprobamos que había edición y que la nucleasa Cas9 cortaba en ambas guías. Comprobada la funcionalidad del sistema, pasamos a hacer directamente la transformación estable en la especie comercial octoploide. Fue bastante difícil analizar las secuencias de los alelos mutados, ya que al hecho de que se trata de un octoploide hay que añadirle que se generan quimeras por lo que el número de variantes alélicas que se genera es alto. No obstante, pudimos identificar todas las mutaciones. Además, lo más importante es que nuestros resultados mostraron que, a pesar de la complejidad genética de esta especie, es perfectamente aplicable, con una gran eficiencia, de manera que puede ser usado como estrategia en estudios funcionales de genes.

Además, nos permitió estudiar el papel de *TM6*, el cual confirmamos que es clave para un desarrollo correcto de pétalos, estambres y polen.

AICM: Y dentro de este gran proyecto de investigación, ¿en qué te has especializado?

CMP: Yo me he centrado en optimizar esta técnica para que pueda usarse para el estudio de cualquier gen de interés. Aparte también estoy estudiando varios factores de transcripción que están implicados en maduración. En concreto, hemos identificado uno, que llamamos *RIF* (*Ripening Inducing Factor*), el cual es clave para la maduración. Líneas silenciadas muestran un retraso general de la maduración, mostrando un menor contenido de antocianinas (responsable del color rojo de la fresa), y mayor dureza del fruto, sin cambios extremadamente relevantes en cuanto a contenido de azúcares. Hemos estudiado que genes están alterados en estas plantas y qué procesos biológicos. Es un proyecto también muy bonito donde hemos encontrado un gen clave, el cual podría tener mucha importancia biotecnológica porque permitiría ampliar la vida de la fresa una vez recolectada.

AICM: Con respecto al trabajo usando CRISPR. Puesto que esta técnica se basa en la edición génica, ¿habéis tenido algún problema a nivel de bioética?

CMP: No existe ningún problema ético en el uso de CRISPR para investigación, que es lo que hemos hecho nosotros. Ni siquiera tenemos problemas relacionados con la patente, ya que el producto (las fresas que generamos) no serán comercializadas. El uso de CRISPR puede ayudar a mejorar muchos cultivos. Ahora mismo hay un montón de bibliografía donde se observa que la técnica de CRISPR va avanzando a pasos agigantados. Hay mejoras en tamaño de frutos, mayor producción, mayor número de flores, en resistencia a patógenos... Además, permite eliminar por segregación el transgen en aquellos organismos que se puedan reproducir sexualmente, algo que en la fresa cultivada es más complicado ya que las variedades se multiplican de manera vegetativa. En cualquier caso, en Europa, el uso de esta herramienta se ha legislado de manera que los organismos editados genéticamente se consideran organismos modificados genéticamente, por lo que están sujetos a la misma restricción que los organismos transgénicos.

AICM: El director de tu investigación es David Posé, ¿cómo es trabajar con él y como se desenvuelve en el laboratorio?

CMP: Él ya no trabaja en el laboratorio como tal, aunque trata de buscar huecos para hacer alguna cosa. Su trabajo es fundamentalmente de gestión y de supervisión científica del grupo. Es un jefe muy flexible y una persona muy tranquila. Se preocupa mucho porque las cosas vayan bien y ante cualquier duda, él siempre te da una solución. En el grupo hay muy buen ambiente y todos nos ayudamos en lo que podemos, son unos compañeros fenomenales. Me siento muy afortunada de formar parte de su grupo.

AICM: Muchísimas gracias por concederme esta entrevista Carmen, pero antes de irnos ¿algún consejo para nuestros futuros investigadores?

CMP: Lo primero es saber cuál es la rama que te gusta y que más te llama la atención. La investigación es dura pero a mí me resulta muy gratificante. Es verdad que hay periodos duros pero ya depende de lo que cada uno quiera. La investigación te permite conocer a mucha gente, viajar, y trabajar en algo que, si te gusta y tienes vocación, no te parece realmente un trabajo. Yo disfruto mucho aunque a veces aparezcan problemas, pero eso ocurre en

todos los trabajos. Al final el balance es muy positivo. Si verdaderamente te gusta, a por ello. Alumnos que se empiezan en departamentos y hacen TFG o TFM tienen una oportunidad para tener un primer contacto con la investigación y ver si realmente les gusta.

AICM: Muchas gracias por tu simpatía y por contagiarme con tus ganas de investigar y disfrutar de tu trabajo, eres una gran profesional. Espero que os vaya todo muy bien a vuestro equipo de investigación y que obtengáis frutos de vuestra investigación lo más pronto posible. Muchas suerte en tu actual y futuros proyectos.
