VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Generación de un mutante reportero Δ*FgADH1*-GFP de *Fusarium graminearum* mediante transformación por electroporación

Generation of a Δ*FgADH1*-GFP reporter mutant of *Fusarium graminearum* by electroporation-mediated transformation

Axel Emilio Valadez-Medina[1], Víctor Daniel Caudillo-López[1], Evelyn Ramírez-Hernández[1], Sandra Elizabeth González-Hernández[1], Ana Lilia Martínez-Rocha[1]*.
[1]Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.
*anamartinez@ugto.mx

Resumen

Fusarium graminearum es un importante hongo fitopatógeno responsable de la fusariosis de la espiga en cereales y constituye un modelo de estudio para la comprensión de mecanismos de patogenicidad y regulación génica. En este trabajo se evaluó la generación de una cepa reportera Δ*FgADH1*-GFP mediante transformación genética asistida por electroporación. Se verificó molecularmente la construcción plasmídica pII99-GFP mediante análisis de restricción con las enzimas *EcoR*I y *Hind*III, obteniéndose los patrones esperados de fragmentación. Posteriormente, el fragmento de interés de 4467 pb fue purificado y utilizado en ensayos de transformación. Se compararon cuatro protocolos de transformación genética en la cepa mutante Δ*FgADH1* de *F. graminearum* basados en electroporación de conidios. Aunque todos los tratamientos permitieron la regeneración celular, no se obtuvieron transformantes resistentes a geneticina. Los resultados sugieren que la baja concentración y pureza del ADN purificado, así como la eficiencia limitada de los procedimientos de debilitamiento y digestión de la pared celular, constituyeron factores críticos que restringieron la incorporación del ADN exógeno. Este trabajo proporciona información relevante para la optimización futura de protocolos de transformación genética en *F. graminearum* y para el desarrollo de cepas reporteras fluorescentes destinadas al estudio de procesos de infección y colonización vegetal.

Palabras clave: *Fusarium graminearum*, transformación genética, electroporación, conidios, protoplastos.

Introducción

Fusarium graminearum (teleomorfo *Gibberella zeae*) es uno de los hongos fitopatógenos más importantes asociados a cereales de interés agrícola. Es el principal agente causal de la fusariosis de la espiga (Fusarium Head Blight, FHB) en trigo, cebada y otros cereales, enfermedad que ocasiona importantes pérdidas de rendimiento y calidad, además de la acumulación de micotoxinas como deoxinivalenol y nivalenol, las cuales representan un riesgo para la salud humana y animal (Haidoulis & Nicholson, 2022). Su capacidad para colonizar tejidos vegetales y adaptarse a condiciones de estrés durante la infección lo ha convertido en un modelo relevante para el estudio de la interacción planta-patógeno y de los mecanismos moleculares asociados con la virulencia y la adaptación ambiental.

El estudio funcional de genes en *F. graminearum* requiere herramientas eficientes de manipulación genética, entre las que destaca la transformación genética para la generación de cepas marcadas, mutantes dirigidos y análisis de expresión génica. Tradicionalmente, los protocolos de transformación en hongos filamentosos han dependido de la obtención de protoplastos mediante digestión enzimática de la pared celular y posterior incorporación de ADN mediante polietilenglicol (PEG) o electroporación (Kapoor, 1995; Sánchez & Aguirre, 1996). Sin embargo, estos métodos presentan limitaciones asociadas con la variabilidad de los preparados enzimáticos, la regeneración de la pared celular y la reproducibilidad experimental, factores que incrementan la complejidad y el costo de los procedimientos (Kapoor, 1995; Ozeki *et al*., 1994). Como alternativa, la electroporación ha surgido como una herramienta eficiente para la introducción de ADN exógeno en hongos filamentosos. Esta técnica utiliza pulsos eléctricos de alta intensidad que generan poros transitorios en la

membrana celular, permitiendo la entrada del ADN sin requerir necesariamente la producción de protoplastos (Kapoor, 1995). Diversos estudios han demostrado su aplicabilidad en especies como *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* y *Acremonium chrysogenum*, utilizando conidios germinados o micelio joven como células receptoras y obteniendo eficiencias de transformación comparables o superiores a las logradas mediante métodos convencionales (Chakraborty *et al*., 1991; Cruz-Ramón *et al*., 2018; Ozeki *et al*., 1994; Sánchez & Aguirre, 1996). Particularmente, Yörük & Albayrak (2015) demostraron la viabilidad de la transformación genética mediante electroporación en *F. graminearum* y *F. culmorum*, confirmando que la transferencia génica mediada por pulsos eléctricos constituye una estrategia prometedora para estos hongos fitopatógenos. Asimismo, los avances recientes en sistemas de marcaje fluorescente han permitido el desarrollo de cepas reporteras que facilitan el estudio de procesos celulares y de la dinámica de proteínas durante la infección. La proteína verde fluorescente (GFP) se ha consolidado como uno de los marcadores más utilizados para estudios de localización subcelular y expresión génica en hongos debido a su estabilidad, sensibilidad y facilidad de detección mediante microscopía de fluorescencia (Cormack, 1998).

Recientemente, en nuestro laboratorio se construyó el mutante nulo (Δ*FgADH1*) en el gen FGSG_10855 que codifica una proteína alcohol deshidrogenasa 1 (Silva-Juárez, 2026). En estudios anteriores se demostró que este gen se sobreexpresa en las estructuras de infección de *F. graminearum* necesarias para la penetración en las espigas de trigo (Mentges *et al*., 2020). En este contexto, el presente trabajo se enfoca en la verificación de un plásmido portador de GFP y del casete de resistencia a geneticina, así como la generación de una cepa reportera del mutante Δ*FgADH1* de *F. graminearum* marcada con esta proteína fluorescente. El desarrollo de esta cepa reportera constituye una herramienta fundamental para futuros estudios de localización y dinámica celular del mutante, además de proporcionar una plataforma experimental para la evaluación y optimización de métodos de transformación genética basados en la electroporación, con el objetivo de disponer de procedimientos más rápidos, reproducibles y accesibles para la manipulación genética de este importante patógeno vegetal (Cormack, 1998; Yörük & Albayrak, 2015).

Metodología

Cepas fúngicas utilizadas

En este trabajo se utilizó el mutante D*FgADH1* (D13) derivada de la cepa silvestre *Fusarium graminearum* PH1.

Extracción de plásmido

Se utilizó el protocolo estándar de lisis alcalina para la extracción de ADN plasmídico. Brevemente, se cultivaron células de E. coli DH5-α que contenían el plásmido pII99-GFP en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). Después de 20 h de cultivo a 37 °C y 200 rpm, las células se resuspendieron en buffer (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)). Después se lisaron usando hidróxido de sodio y SDS. La mezcla se neutralizó con acetato de sodio y se centrifugó para separar el ADN plasmídico de proteínas. El ADN en la fase superior se puso en un tubo nuevo y se precipitó usando isopropanol. Finalmente, el ADN se lavó con etanol al 70% y la pastilla se resuspendió en 30 µL de agua mQ estéril y se adicionaron 0.5 µL de RNAsa (Birnboim & Doly, 1979).

Digestión mediante enzimas de restricción

El ADN plasmídico se digirió con las endonucleasas *EcoR*I y *Hind*III en reacciones independientes, utilizando las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). La movilidad electroforética y los tamaños se determinaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en TAE 1× a 85 V durante 45 min, usando el marcador GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Los tamaños esperados derivan del mapa de restricción in silico generado con SnapGene® software (Dotmatics; disponible en snapgene.com).

Purificación del ADN digerido

La purificación del fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la proteína verde fluorescente (eGFP) y el casete de resistencia a geneticina (pII99-eGFP) se realizó utilizando el kit Qiagen QIAEX Gel Extraction de

acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). Los principios generales de recuperación de ADN a partir de geles de agarosa, ya sea por electroelución de la banda o por solubilización diferencial de la agarosa seguida de precipitación etanólica, son procedimientos estándar bien documentados (Guo *et al*., 1983; Higuchi *et al*., 1988; Tabak & Flavell, 1978).

Producción de conidios del mutante D13

Fragmentos de 1 mm de micelio del mutante D13 de *F. graminearum* se inocularon en medio de germen de trigo (0.5 % p/v) y se incubaron de 5 a 6 días a 28 °C y 150 rpm para obtener conidios frescos. Posteriormente, el medio se filtró, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y los conidios colectados se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Finalmente, los conidios se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se contaron en una cámara Fuchs-Rosenthal.

Hinchazón y pretratamiento de los conidios para transformación

Para inducir la hinchazón de los conidios se inoculó una suspensión de $1x10^7$ conidios/mL en 100 mL de medio YEPD (10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona y 20 g/L dextrosa, pH 6.5). Se incubaron a 28 °C a 150 rpm de tres a cuatro horas, realizando observaciones cada hora. Después de la hinchazón, se centrifugaron los conidios (3000 rpm por 10 min) y se resuspendieron en 50 mL de buffer BPC (0.8 M NaCl, 50 mM buffer de fosfato de potasio pH 7.0, 0.02 M $MgSO_4$ (adicionado después de la esterilización), suplementado con 0.1 M dithiothreitol (DTT)) y se incubaron a 28 °C por 2 h con agitación a 100 rpm. Finalmente, los conidios hinchados (y germínulas) se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y se lavaron tres veces por centrifugación en 10 mL de agua mQ estéril, fría. Este paso es necesario para eliminar por completo las sales.

Transformación fúngica

Después de los lavados, la pastilla se resuspendió en 10 mL de regulador osmótico frío (1 mM HEPES pH 7, 50 mM manitol), para tener una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Se adicionaron 5 µL de ADN (1 µg/µL) a 100 µL de la suspensión de conidios (1×10^7) y se incubaron en hielo por 15 min. Los controles sin ADN se prepararon bajo las mismas condiciones. Las celdas de electroporación se enfriaron previamente (-20 °C) y se mantuvieron en hielo hasta la electroporación. Las soluciones de conidios control y aquellos mezclados con el ADN para transformar se colocaron en celdas de 0.2 cm y se electroporaron a 5 kV/cm (1000 V), capacitancia de 25 µF y resistencia de 400 Ω, obteniendo como resultado una constante de tiempo de aproximadamente 5 ms. Inmediatamente después del pulso se incubaron 15 min en hielo y posteriormente se adicionó 1 mL de medio TB3 frío (3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de casaminoácidos, 20 % (p/v) de sacarosa o 1.2 M de sorbitol), se transfirió a un tubo estéril de 50 mL y se incubó de 1 a 2 h a 28 °C y 100 rpm. Este periodo de incubación fomenta la regeneración de los conidios después del pulso. Posteriormente se adicionaron 49 mL de TB3 suplementado con agar 1.2 % (50 °C), se mezcló uniformemente y se distribuyó en 5 placas Petri (9 cm de diámetro). Una vez solidificado el medio, las placas se incubaron a 28 °C por 24 h. Al día siguiente, el cultivo se cubrió con 10 mL de TB3 1 % suplementado con geneticina (200 µg/mL) y se siguió incubando por 3-5 días a 28 °C, permitiendo el crecimiento de los transformantes. A uno de los controles sin ADN se le cubre con el medio y el antifúngico para tener un control negativo y confirmar que el crecimiento de los transformantes se debe a la inclusión del material genético preparado. En el control de regeneración no se adiciona antifúngico para evaluar la viabilidad celular después del tratamiento. Para seleccionar las colonias transformantes se pican aquellas que sobrepasaron la cobertura con el antifúngico y se siembran en placas Petri pequeñas con medio (PDA o CM) suplementado con geneticina (100 µg/mL).

En el protocolo general de transformación se siguieron los pasos de hinchazón, pretratamiento y transformación descritos en la metodología. Los parámetros modificados para cada una de las estrategias se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. *Comparación de protocolos utilizados para la transformación de conidios de F. graminearum*

Parámetro Experimental	protocolo	Composición / Condiciones de Incubación	referencia
Buffer osmótico	P1	Sorbitol 1.2 M	Sánchez & Aguirre, 1996
	P2	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 270 mM sacarosa, 1 mM acetato de litio	
	P3 Y P4	1 mM HEPES (pH 7.0), 50 mM manitol	Chakraborty *et al.*, 1991
TRATAMIENTO QUÍMICO	P1	Incubación durante 2 h a 28 °C en buffer sorbitol 1.2 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7.5) y $MgCl_2$ 10 Mm	Cruz-Ramón, *et al.*, 2019
	P3	Incubación por 2 h a 28°C y 150 rpm en buffer BPC (0.8 M NaCl, 50 mM buffer fosfato de potasio pH 7.0, 0.02M MgSO4) suplementado con 0.1M ditiotreitol (DTT)	
TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	P4	Adición de cóctel enzimático* a conidios tras 2h de incubación en medio YEPG; incubación posterior por 1.5h a 28°C y 50rpm	Ozeki *et al.*, 1994

* Quitinasa y β-glucuronidasa diluidas, suplementadas con 1 mg/mL de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Merck).

Resultados

En este apartado se describen los resultados obtenidos en las tres etapas experimentales ejecutadas en este trabajo: (i) la verificación molecular del plásmido pII99-eGFP mediante digestión con enzimas de restricción y resolución por electroforesis en gel de agarosa, (ii) la purificación del fragmento de 4467 pb que contiene el gen que codifica para GFP, y (iii) transformación del mutante D13 de *F. graminearum* mediante seis procedimientos, cinco basados en electroporación de conidios y uno basado en transformación por protoplasto, respaldados en todos los casos por controles de regeneración y por controles negativos de selección.

Se verificó la construcción correspondiente al vector pII99-eGFP que integra un casete de selección de resistencia a la geneticina (Figura 1A), destinado a transformar el mutante D13 de *F. graminearum* para generar una cepa reportera. A partir de colonias independientes de *Escherichia coli* DH5α portadoras de la construcción pII99-eGFP se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Las concentraciones de ADN plasmídico, determinadas por espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific), oscilaron entre 1710.2 y 5842.9 ng/µL en cinco muestras independientes. Las relaciones A260/A280 se situaron en el intervalo de 1.89 a 2.00, dentro del rango aceptado para ADN de pureza adecuada (1.8–2.0), y las relaciones A260/A230 fueron de 1.83 a 2.20, sin evidencia significativa de contaminación por carbohidratos, proteínas o sales. En el perfil electroforético del ADN plasmídico sin digerir se observó una banda mayoritaria de tamaño aparente ≈ 4 kb correspondiente a la forma relajada, junto con bandas de menor movilidad atribuibles a las formas enrollada y superenrollada, sin evidencia de degradación o contaminación por ARN (Figura 1B).

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

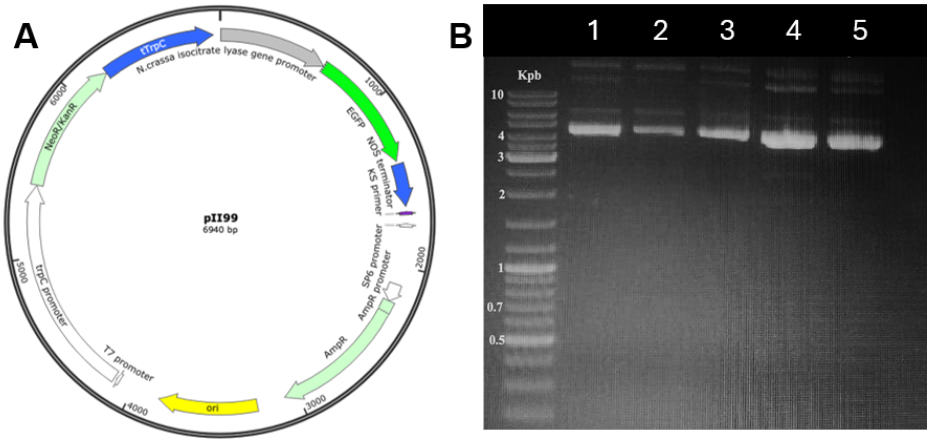


Figura 1. Vector utilizado para la transformación de D13 integrando eGFP. A) *Vector pII99-eGFP: el vector está constituido por un casete de resistencia a geneticina, el cual se encuentra regulado por el promotor y terminador de trpC, involucrado en la ruta de la biosíntesis del triptófano de A. nidulans, así como el gen eGFP bajo el promotor de la isocitrato liasa y con un terminador NOS.* ***B)*** *Patrón de migración del plásmido pII99-eGFP (carriles 1-5). Se observan los patrones característicos de bandas de ADN circular superenrollado, enrollado y relajado.*

Para comprobar la identidad y la integridad estructural de la construcción, el ADN plasmídico se digirió con las endonucleasas *EcoR*I y *Hind*III en reacciones independientes. Los mapas de restricción in silico generados con SnapGene (Figuras 2A y 2C) predijeron, para la digestión con *EcoR*I, la liberación de dos fragmentos, uno de 4467 pb y otro de 2473 pb —de los cuales el de mayor tamaño corresponde al gen de eGFP y al casete de resistencia a geneticina— y, para *Hind*III, la linearización del plásmido en un único fragmento de 6940 pb. En las cinco minipreps analizadas se observaron bandas con los tamaños esperados respecto a los tamaños predichos *in silico*. El patrón de dos bandas (4467 pb y 2473 pb) tras la restricción con *EcoR*I (Figura 2B) y de una única banda (6940 pb) tras la restricción con *Hind*III (Figura 2D).

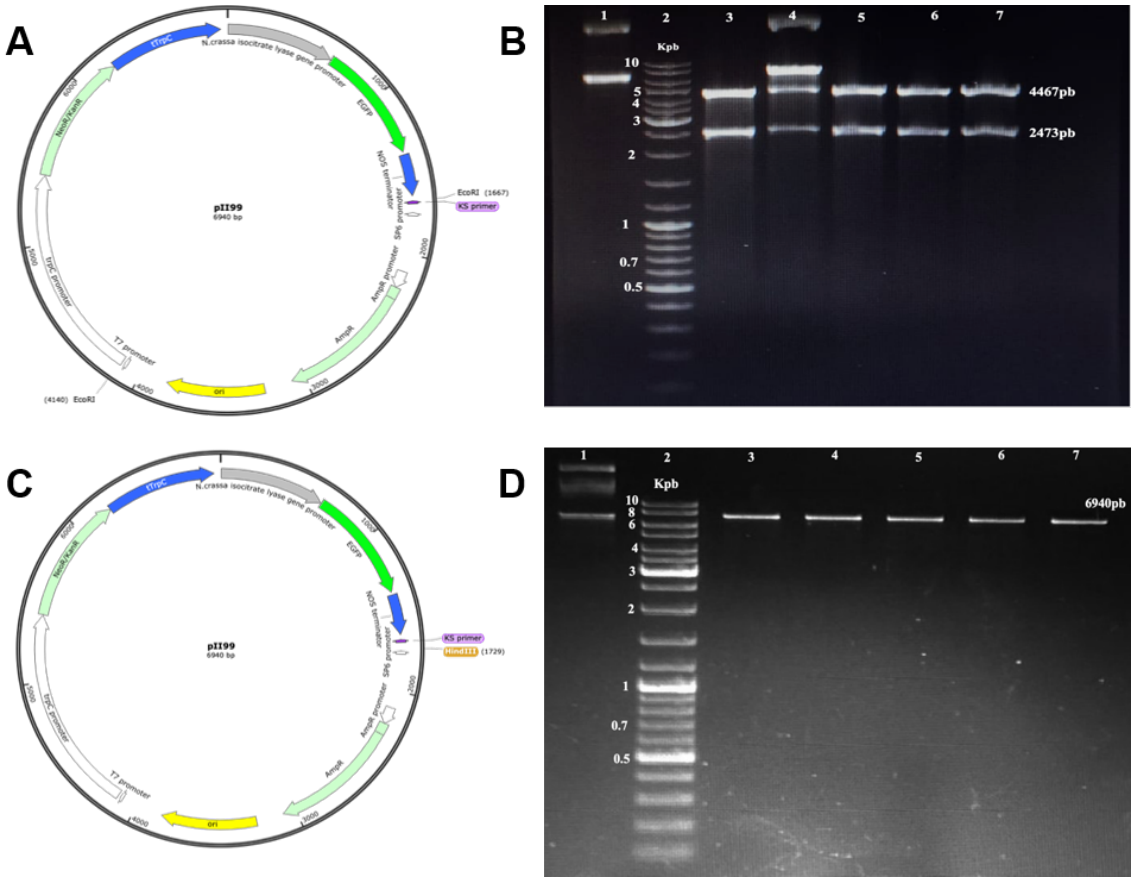


Figura 2. Mapas de restricción para la comprobación del vector pII99-eGFP. A) Mapa de restricción de pII99-eGFP con EcoRI. B) Fragmentos esperados de 4467pb (fragmento de importancia para transformación) y de 2473 pb (fragmento con casete bacteriano). Carril 1: plásmido sin digerir, carril2: marcador de tamaño, carriles 3-7: plásmidos digeridos. C) Mapa de Restricción de pII99-eGFP con HindIII. D) La digestión con HindIII linealiza el vector, dejando una banda de 6940 pb, es decir del mismo tamaño del vector. Carril 1: plásmido sin digerir, carril2: marcador de tamaño, carriles 3-7: plásmidos digeridos.

A partir de la digestión con *EcoR*I, el fragmento de 4467 pb —que contiene el gen de eGFP y el casete de resistencia a geneticina— se separó en gel de agarosa y se visualizó bajo luz UV tras tinción con bromuro de etidio. La banda correspondiente se escindió del gel con bisturí estéril y el ADN se purificó utilizando el kit QIAEX Gel Extraction (Qiagen). El punto de partida fue una digestión de 30 µg de ADN de la cual la banda de 4467 pb fue escindida, purificada y eluida en 25 µL. La concentración y la pureza de los fragmentos purificados se evaluaron por espectrofotometría UV (NanoDrop ®, Thermo Scientific) en siete mediciones independientes. Para cada muestra se registraron la concentración del fragmento purificado en nanogramos por microlitro (ng/µL), la relación de absorbancia A260/A280 y la relación de absorbancia A260/A230 (Tabla 2).

***Tabla 2**. Concentración y pureza del fragmento de 4467 pb para transformación.*

Medición	Concentración del fragmento purificado (ng/µL)	Relación A260/A280	Relación A260/A230
1	16.7	1.36	1.02
2	10.7	1.19	0.90

3	14.4	1.17	0.52
4	36.3	1.15	0.80
5	24.1	0.88	0.53
6	59.6	1.60	0.60
7	34.1	1.52	1.42

Las siete mediciones arrojaron concentraciones comprendidas entre 10.7 y 59.6 ng/µL. El conjunto de los siete valores (16.7, 10.7, 14.4, 36.3, 24.1, 59.6 y 34.1 ng/µL) muestra una marcada variabilidad a lo largo del registro cronológico, con un mínimo de 10.7 ng/µL en la medición 2 y un máximo de 59.6 ng/µL en la medición 6, una fluctuación de aproximadamente 5.6 veces entre los extremos. En lo que respecta a la pureza del ADN del fragmento, las siete lecturas de la relación A260/A280 (1.36, 1.19, 1.17, 1.15, 0.88, 1.60 y 1.52) se situaron en todos los casos por debajo del umbral 1.8 del intervalo aceptado para ADN de pureza adecuada (1.8–2.0), y las siete lecturas de la relación A260/A230 (1.02, 0.90, 0.52, 0.80, 0.53, 0.60 y 1.42) tampoco alcanzaron el intervalo 2.0–2.2 esperado para ADN carente de contaminación por carbohidratos, proteínas o sales. La baja eficiencia global de esta purificación restringió la cantidad efectiva y la calidad del ADN puesto a disposición de los procedimientos de transformación, y constituyó una de las limitantes de la transformación identificadas en este trabajo.

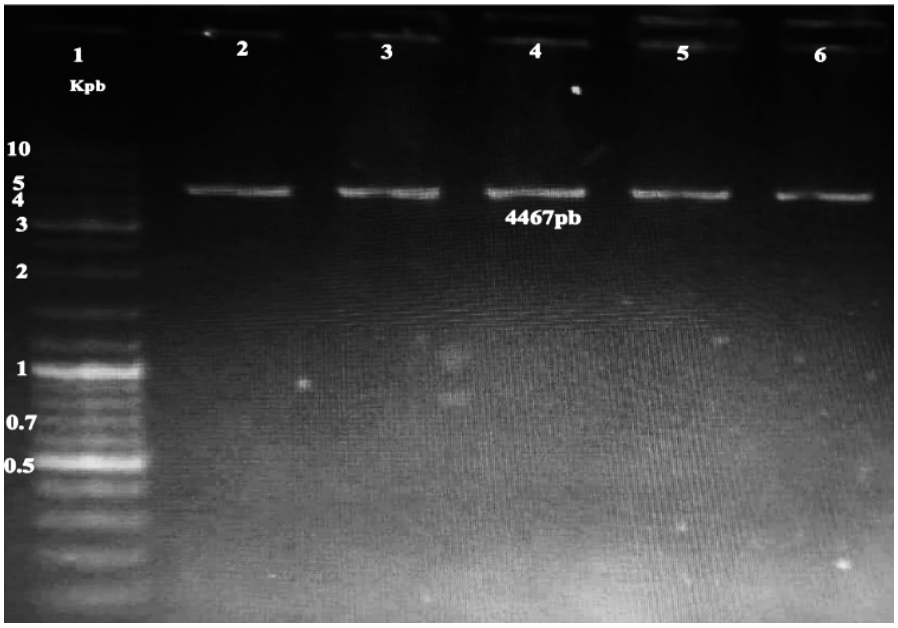


Figura 3. Electroforesis de los fragmentos de 4467 pb purificados. *La purificación se llevó a cabo usando el kit* ***QIAEX Gel Extraction (Qiagen).*** *Carril 1: marcador de tamaño, carriles 2-6: fragmentos purificados.*

En esta etapa se ejecutaron sobre el mutante D13 de *F. graminearum* cuatro procedimientos de transformación basados en electroporación de conidios hinchados (P1 a P4), adaptados a partir de las estrategias de electroporación de conidios germinados y micelio joven descritas en las referencias presentadas en la Tabla 1, con variantes sistemáticas en la composición del pretratamiento de pared, el tampón de electroporación, la cantidad de ADN transferida, los parámetros del pulso y el modo de selección. Las etapas comunes — generación y lavado de conidios, hinchazón o pretratamiento de pared, fase de recuperación y selección por

antibiótico— se detallan en la metodología. Las condiciones que variaron entre procedimientos y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.

***Tabla 3**. Comparación de las variables experimentales evaluadas en los protocolos de transformación de conidios de Fusarium graminearum.*

Variable experimental	**p1 EP-Sorbitol**	**P2 EP-LiOAc**	**P3 EP-BPC/DTT**	**P4 EP-+ enzimas líticas**
Estrategia de permeabilización celular	sorbitol - Tris-HCl $MgCl_2$	Hinchazón en medio YEPG	Reducción con BPC + DTT	tratamiento con enzimas líticas* de pared celular
Buffer de transformación	Sorbitol	Tris–LiOAc–sacarosa	HEPES–manitol	
Tipo de ADN	Plásmido superenrollado		Fragmento lineal (4467 pb)	
Cantidad de ADN	1–10 µg	1–2 µg	5 µg	
Concentración celular	1 × 10^7 conidios mL^{-1}	1 × 10^7 conidios mL^{-1}	1 × 10^8 conidios mL^{-1}	1 × 10^7 conidios mL^{-1}
Condiciones de Electroporación	Doble pulso (1.5 y 2.5 kV cm^{-1})	Doble pulso (1 y 2 kV cm^{-1})	Pulso único (5 kV cm^{-1})	Pulso único (5 kV cm^{-1})
Estrategia de selección	PDA-Geneticina 100 ug/mL	Overlay PDA geneticina 100 ug/mL	Overlay TB3-geneticina (200 ug/mL)	
Control regeneración	positivo	positivo	positivo	positivo
Transformantes	0	0	0	0

** Descrita en metodología. EP. Electroporación*

En ninguno de los cuatro procedimientos de transformación ejecutados sobre el mutante D13 (Δ*FgADH1*) se obtuvieron colonias presuntamente transformantes en las condiciones de selección aplicadas. Las placas de selección incubadas hasta 5 días a 28 °C, bajo los distintos regímenes de antifúngico (genenticina 100 µg/mL (P1 y P2) o genenticina 200 µg/mL para P3 y P4), permanecieron sin crecimiento atribuible a un evento de transformación estable.

Los controles constituidos por conidios electroporados sin ADN y sembrados en medio sin antifúngico (controles de regeneración) mostraron regeneración del material biológico, con desarrollo de hifa y microcultivos en grados variables según el protocolo. Los controles sembrados con antifúngico en ausencia de ADN de selección (controles negativos) no presentaron crecimiento, confirmando la actividad de los antibióticos empleados y la ausencia de contaminación cruzada.

Discusión

Para evaluar la función génica, los investigadores establecen protocolos de transformación en los que, en la mayoría de los casos, el éxito depende de los microorganismos en particular. En hongos, varias estrategias de transformación génica se han establecido, entre las que se incluyen transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (MPT), conidios mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), electroporación de protoplastos y conidios, biobalística mediada por liposomas, vectores virales y nanomateriales (He *et al*., 2017; Li *et al*., 2017).

En *F. graminearum,* la transformación mediada por protoplastos utilizando PEG/$CaCl_2$ sigue siendo el método de referencia debido a su elevada eficiencia para obtener transformantes (Wiebe *et al*., 1997, Moradi *et al*., 2013). Usando este método de transformación, en el grupo de trabajo se obtuvieron transformantes resistentes a higromicina, con deleción en el gen FgADH1 que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa 1 (Silva-Juárez, 2026). FgADH1 es un gen de *F. graminearum* que se expresa mayoritariamente en estructuras que facilitan la colonización y penetración de la pared celular del trigo (Mentges *et al*., 2020), por lo que esta enzima podría tener una función importante en el proceso infectivo de la planta. Para evaluarlo, el propósito de este proyecto fue generar transformantes que expresaran la proteína verde fluorescente (eGFP) en el mutante D13 carente de la Adh1, donde el comportamiento de la mutante D13-eGFP (Δ*FgADH1*) podría contrastarse frente a la cepa silvestre reportera (WT-GFP), que no presenta alteraciones en su capacidad fitopatógena al crecer en espigas de trigo.

Sin embargo, la transformación mediada por electroporación ha sido poco explorada en *F. graminearum*. En un estudio se utilizaron protoplastos y se logró la obtención de transformantes resistentes a geneticina, pero con una eficiencia de transformación muy baja (Yörük & Albayrak, 2015). Como se mencionó previamente, la eficiencia de transformación genética está condicionada por las características propias de los microorganismos y la reproducibilidad de los protocolos empleados. Para el cumplimiento del objetivo de este proyecto, aún se debe estandarizar el protocolo de transformación mediante electroporación, debido a que se presentaron dos limitantes críticas: 1) la poca cantidad de DNA purificado posterior a las digestiones del plásmido pII99-GFP (Figura 3), y 2) la baja actividad de los extractos enzimáticos destinados a la degradación de la pared celular.

Los protocolos utilizados evidencian que todos los tratamientos evaluados mantienen la viabilidad celular del hongo (Tabla 3), permitiendo la regeneración de los conidios germinados tras el proceso de electroporación. Por lo tanto, la ausencia de transformantes fenotípicos no se atribuye a una pérdida de viabilidad celular, sino a una falla en la internalización del ADN exógeno, lo cual impide la expresión del casete de resistencia al antifúngico geneticina (G418) y del gen que codifica la proteína eGFP (Yörük & Albayrak, 2015; Li *et al*., 2017).

En los protocolos P1 y P2 se evaluó la electroporación de conidios intactos utilizando diferentes condiciones osmóticas y de preparación celular. P1 empleó un buffer basado en sorbitol, ampliamente utilizado para mantener la integridad osmótica durante la aplicación del pulso eléctrico, mientras que el protocolo P2 incorporó una etapa de hinchazón de los conidios en medio YEPG y un tampón con sacarosa y acetato de litio, con el propósito de favorecer un estado fisiológico más propicio para la entrada del ADN (Sánchez & Aguirre, 1996). Sin embargo, ninguno de estos procedimientos produjo colonias resistentes al antifúngico, lo que sugiere que la pared celular de *F. graminearum* constituye una barrera importante en la internalización de ADN exógeno. Con la finalidad de alterar significativamente la estructura de los conidios, los protocolos P3 y P4 incorporaron estrategias orientadas a incrementar la permeabilidad de la pared celular. El tratamiento con DTT se seleccionó por su capacidad para reducir puentes disulfuro presentes en glicoproteínas de la pared celular, aumentando su permeabilidad sin comprometer la viabilidad celular (Cruz-Ramón, *et al*., 2019). En el protocolo P4, esta estrategia se complementó con una digestión enzimática parcial mediante un cóctel de enzimas hidrolíticas que permitieran la modificación de componentes estructurales de la pared, y así incrementar la probabilidad de internalización del ADN (Ozeki, *et al*., 1994). Estos protocolos (P1-P4) fueron previos a la transformación por electroporación, la cual es una estrategia rápida y simple que, sin embargo, requiere ajustar varios parámetros con el objetivo de optimizar condiciones.

La ausencia de transformantes resistentes a geneticina y/o con fluorescencia usando los protocolos evaluados nos obliga a continuar modificando condiciones. Por lo que se debe evaluar si los conidios son células que no generan poros fácilmente y esta es la posible causa que limita la entrada de ADN. Además, es probable que la sensibilidad de *F. graminearum* a los tratamientos físicos y químicos empleados haya podido reducir significativamente la supervivencia de las células competentes, disminuyendo la probabilidad de recuperar células transformantes. Esto se puede evaluar mediante la cuantificación de la viabilidad de conidios electroporados y no electroporados (condición no evaluada en este trabajo). Con esto, tendremos una

determinación de la viabilidad celular al pulso eléctrico aumentado de manera gradual o de la capacidad de resistir más de un pulso, manteniendo el resto de los parámetros constantes.

Los resultados obtenidos evidencian la complejidad de establecer un sistema de transformación genética por electroporación en conidios hinchados en *F. graminearum* y muestran que la optimización de un único parámetro rara vez es suficiente para incrementar la eficiencia del proceso. En cambio, los datos sugieren que la transformación depende de la interacción entre múltiples variables fisiológicas y metodológicas, por lo que futuras estrategias deberán integrar simultáneamente la optimización de las condiciones de incorporación del ADN y la regeneración posterior al tratamiento para incrementar la probabilidad de obtener transformantes estables.

Referencias

Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids research, 7(6), 1513-1523.

Cormack, B. P. (1998). Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. Current Opinion in Microbiology, 1(4), 406-410. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80057-X

Cruz-Ramón, J., Fernández, F. J., Mejía, A., & Fierro, F. (2018). Electroporation of germinated conidia and young mycelium as an efficient transformation system for Acremonium chrysogenum. Folia Microbiologica, 64(1), 33–39. https://doi.org/10.1007/s12223-018-0625-0

Chakraborty BN, Patterson NA, Kapoor M. (1991). An electroporationbased system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. Can J Microbiol 37:858–863.

Guo, L., Yang, R., & Wü, R. (1983). An Improved strategy for rapid direct sequencing of both strands of long DNA molecules cloned in a plasmid. https://doi.org/10.1093/nar/11.16.5521

Haidoulis, J. F., & Nicholson, P. (2022). Tissue-specific transcriptome responses to Fusarium head blight and Fusarium root rot. Frontiers in Plant Science, 13, 1025161. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1025161

He L., Feng J., Lu S., Chen Z., Chen C., He Y., Yi X., Xi L. (2017). Genetic transformation of fungi. Int. J. Dev. Biol. 61: 375-381. https://doi.org/10.1387/ijdb.160026lh

Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. K. (1988). A general method ofin vitropreparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. https://doi.org/10.1093/nar/16.15.7351

Kapoor, M. (1995). Gene transfer by electroporation of filamentous fungi. En J. A. Nickoloff (Ed.), Electroporation protocols for microorganisms (Methods in Molecular Biology, Vol. 47, pp. 279-289). Humana Press.

Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. Microbial cell factories, 16(1), 168. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7.

Mentges, M., Glasenapp, A., Boenisch, M., Malz, S., Henrissat, B., Frandsen, R. J., ... & Martinez-Rocha, A. L. (2020). Infection cushions of Fusarium graminearum are fungal arsenals for wheat infection. Molecular Plant Pathology, 21(8), 1070-1087

Moradi, S., Sanjarian, F., Safaie, N., Mousavi, A., & Bakhshi, K. G. R. (2013). A modified method for transformation of Fusarium graminearum. Journal of crop protection. 2 (3): 297-304

Ozeki, K., Kyoya, F. F., Hizume, K., Kanda, A., & Hamachi, M. (1994). Transformation of intact Aspergillus niger by electroporation. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 58(12), 2224-2227.

Sánchez, O., and J. Aguirre (1996) "Efficient Transformation of Aspergillus nidulans by Electroporation of Germinated Conidia," Fungal Genetics Reports: Vol. 43, Article 21. https://doi.org/10.4148/1941-4765.1317

Silva-Juárez Misael Horacio, tesis de maestría. (2026). “Rol fisiológico del gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa 1 (FgADH1) en Fusarium graminearum”. Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.

Tabak, H. F., & Flavell, R. A. (1978). A method for the recovery of DNA from agarose gels. https://doi.org/10.1093/nar/5.7.2321

Wiebe, M. G., Nováková, M., Miller, L., Blakebrough, M. L., Robson, G. D., Punt, P. J., & Trinci, A. P. J. (1997). Protoplast production and transformation of morphological mutants of the Quorn® myco-protein fungus, Fusarium graminearum A3/5, using the hygromycin B resistance plasmid pAN7-1. Mycological Research, 101(7), 871–877. https://doi.org/10.1017/S0953756296003425

Yörük, E., & Albayrak, G. (2015). Geneticin (G418) resistance and electroporation-mediated transformation of Fusarium graminearum and Fusarium culmorum. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 29(2), 268-273. https://doi.org/10.1080/13102818.2014.996978