

**ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ: МЕТОДИЧЕСКИЙ ОБЗОР****С.А. Тимофеев\*, В.С. Журавлев, В.В. Долгих***Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург*\* ответственный за переписку, e-mail: [ts-bio@ya.ru](mailto:ts-bio@ya.ru)

Энтомопатогенные грибы широко используются в качестве безопасной для окружающей среды альтернативы химическим пестицидам против сельскохозяйственных вредителей и переносчиков болезней человека. Одним из перспективных способов увеличения эффективности биопрепаратов на основе мицелиальных грибов является их генная модификация. С помощью генетической трансформации можно существенно повысить вирулентность используемых штаммов, а также повысить их устойчивость к абиотическим факторам среды. В данном обзоре представлены современные методики трансформации энтомопатогенных анаморфных аскомицетов: полиэтиленгликоль-опосредованная трансформация протопластов, трансформация с помощью агробактерий, электропорация пророщенных конидий и химическая трансформация бластоспор. Сравнительный анализ данных методик показал, что агробактериальная трансформация является наиболее универсальным методом, широко описанным для различных видов мицелиальных патогенов насекомых, таких как представители родов *Beauveria*, *Metarhizium* и *Lecanicillium*. В то же время простой и наименее затратный по времени метод химической трансформации бластоспор на сегодняшний день применялся только для вида *B. bassiana*. Также в обзоре описаны способы рекомбинации встраиваемых последовательностей в геном грибов и генетические маркеры, применение которых возможно для негативной и позитивной селекции модифицированных организмов.

**Ключевые слова:** энтомопатогенные грибы, трансформация, защита растений, протопласты, агробактерии, электропорация

Поступила в редакцию: 03.02.2019

Принята к печати: 30.05.2019

**Введение**

Энтомопатогенные грибы являются важными природными регуляторами популяций насекомых, в том числе сельскохозяйственных вредителей. Анаморфные аскомицеты родов *Beauveria*, *Metarhizium* и *Lecanicillium* выделяются как одни из наиболее перспективных агентов биологической борьбы с вредными насекомыми (De Faria, Wraight, 2007; Goettel et al., 2008; Ansari et al., 2011). Кроме того, представители данных видов могут использоваться для борьбы с переносчиками заболеваний человека, передающихся векторным путем, например, малярии (Tomas, Read, 2007). Тем не менее, применение биопрепаратов на основе данных видов в полевых условиях ограничено из-за относительно медленного уничтожения насекомых и чувствительности грибов к абиотическим стрессам, таким как ультрафиолетовое излучение, высокая температура и низкая влажность (Rangel et al., 2008). На сегодняшний день наиболее перспективным направлением создания экономически эффективных биопрепаратов на основе энтомопатогенных грибов является их генетическая модификация для повышения вирулентности и устойчивости используемых штаммов к абиотическим факторам среды (Gressel, 2007).

Чаще всего в геном грибов встраивают последовательности, кодирующие различные факторы вирулентности, такие как секретируемые формы токсинов, способных приводить к быстрой гибели зараженного насекомого, различные формы хитиназ, протеиназ и гидролаз, способствующих более эффективному заражению насекомых и распространению патогена. Эффективное увеличение вирулентности наблюдалось как при встраивании синтетически созданных последовательностей, так и генов энтомопатогенных грибов других видов, последовательно самого насекомого-хозяина, а также генов различных

хищных насекомых (например, пауков или скорпионов) (Lovett, Leger, 2018).

«Для получения трансформированных энтомопатогенных грибов применяют, как правило, следующую стратегию, которая включает три этапа: (1) доставка экзогенной ДНК в клетку-реципиент с использованием одной из плазмид-опосредованных систем трансформации; (2) интеграция чужеродной ДНК в геном гриба; (3) отбор трансформированных клеток, с оценкой экспрессии перенесенной последовательности в клетках трансформантов грибов».

Процесс доставки чужеродной ДНК в клетки энтомопатогенных грибов является основным и наиболее трудоемким этапом трансформации (Ruiz-Díez, 2002). Это обусловлено особой структурой клеточной стенки у данных организмов, а также необходимостью отбирать одноклеточные стадии жизненного цикла грибов. На сегодняшний день для этого используются четыре основных методики: полиэтиленгликоль-опосредованная трансформация протопластов, трансформация с помощью агробактерий, электропорация пророщенных конидий и химическая трансформация бластоспор. Эти методики, а также особенности жизненного цикла анаморфных аскомицетов будут рассмотрены отдельно в заключительной части обзора.

Встраивание чужеродной последовательности в геном грибов чаще всего происходит неспецифично за счет негомологичной рекомбинации в случайный участок геномной ДНК (Xu et al., 2014). Создание конструкций для гомологичной рекомбинации целевой последовательности в определенный участок генома энтомопатогенных анаморфных аскомицетов значительно затруднено из-за крайне низкого уровня гомологичной рекомбинации в их клетках, что может быть обусловлено особенностями функционирования их восстановительного пути соединения

негомологичных концов ДНК (NHEJ) (Chen et al., 2017). На сегодняшний день данная система у анаморфных аскомицетов плохо изучена, однако было показано, что нарушение функционирования гомологов генов, ответственных за NHEJ у других групп организмов, значительно увеличивает уровень гомологичной рекомбинации в клетках грибов *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa* и *Metarhizium robertsii* (Ninomiya et al., 2004; Krappmann et al., 2006; Xu et al., 2014). Еще одной перспективной методикой, позволяющей как внедрять чужеродные последовательности ДНК в определенный участок генома эукариот, так и осуществлять целенаправленный мутагенез, является редактирование ДНК с помощью CRISPR/Cas9, возможность применения которой для энтомопатогенных грибов была показана на примере *B. bassiana* в 2017 году (Chen et al., 2017).

Выбор маркеров для негативной селекции трансформированных энтомопатогенных грибов сильно ограничен, так как они обладают естественной устойчивостью к большинству антибиотиков, используемых в качестве селективных маркеров (Chen et al., 2017). В настоящее время повсеместно используются только два маркера устойчивости: ген фосфинотрицинацетилтрансферазы (*bar*) для устойчивости к гербициду фосфинотрицину и ген ацетоллактатсинтазы (*sur*) фитопатогенного гриба *Magnaporthe oryzae* для отбора с помощью сульфонилмочевины (Koukaki, et al., 2003; Zhang et al., 2010). Однако в 2011 году был создан штамм *L. lecanii* с нарушенным функционированием нитратредуктазы, не способный развиваться на среде с хлоратом. Трансформация грибов экзогенной последовательностью, кодирующей нитратредуктазу *Aspergillus nidulans*, восстанавливала эту способность (Hasan et al., 2011), что свидетельствует о том, что новые системы негативной селекции могут быть получены генно-инженерными методами.

Система позитивной селекции для энтомопатогенных грибов на сегодняшний день практически не разработана, так как эффективные инструменты для целенаправленного мутагенеза этих организмов появились лишь в недавнем времени. На сегодняшний день уже создан штамм *B. bassiana*, не способный синтезировать нуклеозид уридин в результате нарушения гена *ura3*. Мутанты не развивались без экзогенного уридина и были способны расти на питательной среде, содержащей 5-фтороротовую кислоту (5-FOA), что указывает на то, что ауксотрофность по уридину может быть использована в качестве селективируемого маркера для трансформации энтомопатогенных грибов (Ying et al., 2013).

#### **Особенности жизненного цикла энтомопатогенных мицелиальных грибов в природе и культуре в контексте выбора материала для генетической трансформации**

Упрощенная схема жизненного цикла энтомопатогенных анаморфных аскомицетов может быть описана следующим образом: в качестве инвазионной стадии, существующей во внешней среде, выступают одноклеточные толстостенные споры – конидии. Данные клетки, размер которых обычно не превышает нескольких микрометров, имеют сильно развитую клеточную стенку. Попав на организм насекомого-хозяина (проникновение может осуществляться практически через любые участки тела: кишечник,

трахеи и т.д.) конидии закрепляются на поверхности кутикулы насекомого за счет гидрофобных взаимодействий между липидными компонентами кутикул и клеточной оболочки споры, а также за счет неровностей и выростов на поверхности кутикулы (Борисов и др., 2001). Затем на одном из полюсов клетки образуется вырост – ростковая трубка, а ядро конидии приступает к митотическому делению. В конечном счете, процесс прорастания завершается миграцией одного из дочерних ядер и большинства клеточных органелл из споры в ростковую трубку и ее последующее отделение от споры септой. Этот процесс приводит к образованию апрессориальных клеток, которые делятся на поверхности кутикулы насекомого, формируют так называемую инфекционную подушку – скопление из нескольких апрессориальных клеток, покрытых слизеподобным веществом. В областях таких скоплений происходит разрушение верхних слоев кутикулы насекомого и внедрение патогена внутрь, с образованием гифальных тел различного порядка, и многоклеточных гиф, прорастающих через кутикулу и гиподерму насекомого. В гемолимфе хозяина за счет септирования гиф происходит образование тонкостенных одноклеточных гифальных тел, которые разносятся гемолимфой по телу насекомого и поражают его различные органы и ткани. Данные стадии, которые для многих видов грибов обозначаются как бластоспоры, лишены классической клеточной стенки и обладают лишь тонким фибриллярным слоем поверх плазматической мембраны (Inglis et al., 2001). Активное распространение патогена по организму хозяина обычно начинается уже после гибели насекомого и завершается прорастанием гиф из насекомого во внешнюю среду, и образованием там конидий для заражения других особей.

В культуре жизненный цикл анаморфных аскомицетов значительно упрощается. При выращивании грибов на твердых средах обычно можно наблюдать формирование гиф и толстостенных конидий, а при культивации в жидких средах помимо гиф формируются бластоспоры, аналогичные гифальным телам, образующимся в гемолимфе зараженных насекомых и не обладающие выраженной клеточной стенкой (Bernardo et al., 2018).

Для генетической трансформации энтомопатогенных грибов обычно используют одноклеточные стадии жизненного цикла грибов, получаемые в культуре: конидии и бластоспоры, которые чаще всего выделяют из культуры за счет фильтрации (Fang, et al., 2004). Так как конидии обладают сильно развитой клеточной стенкой, затрудняющей попадание экзогенной ДНК внутрь клетки, для их трансформации обычно используют методики, предполагающие временное удаление этой оболочки, или расщепления его участка бактериями (трансформация с помощью ПЭГ и агробактериальная трансформация). Для электропорации также могут быть использованы пророщенные конидии, клеточная стенка которых истончается в зоне проростка, что облегчает проникновение ДНК в клетку гриба (Jin et al., 2008). Тонкостенные бластоспоры, не требующие создания протопластов, могут быть непосредственно использованы для трансформации с помощью ПЭГ (Ying et al., 2013), но чаще всего применяются в качестве объекта для химической трансформации с помощью ацетата лития (Ying, Feng, 2006).

### Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ)

Данный протокол является «первопроходцем» среди всех методов трансформации мицелиальных грибов. Первые данные об успешной трансформации конидий *Neurospora crassa* с помощью данной методики были опубликованы в 1979 году (Case et al., 1979). С тех пор метод повсеместно использовался для трансформации фитопатогенных анаморфных аскомицетов, однако для энтомопатогенных грибов он был адаптирован только в 2011 году на примере *L. lecanii* (Hasan et al., 2011). Общая схема данного метода (рис., а) для энтомопатогенов выглядит следующим образом: на первом этапе из культуры грибов отбираются одноклеточные стадии жизненного цикла, обычно конидии, клеточная стенка которых удаляется сложной смесью ферментов для получения протопластов (Liu Z, Friesen, 2012; Zhang et al., 2016). Также описано получение одноклеточных протопластов, подходящих для трансформации, при разрушении клеточной стенки гиф мицелия (Hasan et al., 2011). Для этого процесса обычно используют смесь геликазы или глюосулазы из препаратов желудка улитки, а также целлюлазы, 1,3-глюканазы, хитиназы и др. из *Trichoderma* sp. или других видов грибов. Расщепление обычно проводят в осмотическом буфере, содержащем сорбитол или соль в высокой концентрации, чтобы стабилизировать образующиеся протопласты.

Поглощение ДНК протопластами осуществляется путем инкубации протопластов с высококонцентрированной ДНК с последующим добавлением до 10 объемов 40–60 % раствора ПЭГ 4000, а затем еще одним периодом инкубации. Было обнаружено, что ПЭГ вызывает адгезию протопластов, что, как считается, облегчает поступление ДНК в клетки грибов. Однако было показано, что ПЭГ вряд ли индуцирует взаимодействие между ДНК и поверхностью клетки, и слияние протопластов не является прямой причиной поглощения ДНК; следовательно, роль ПЭГ в поглощении ДНК остается в значительной степени неизвестной (Kuwano et al., 2008). После обработки ПЭГ протопласты промывают осмотическим буфером, содержащим сорбитол, и переносят в регенерационную среду для восстановления клеточной стенки перед помещением на селективную среду.

### Агробактериальная трансформация

*Agrobacterium tumefaciens* – грам-негативная почвенная бактерия, способная вызывать образование опухолей и галлов у растений. Данный процесс происходит за счет транспорта участка опухолеобразующей плазмиды (Ti plasmid) из клеток бактерий в клетки растений, встраивания данного участка в геном растительных клеток за счет рекомбинации, и экспрессии генов в составе данного участка, вызывающей трансформацию клеток растений и развитие опухолей. Процесс переноса в свою очередь обусловлен активацией генов вирулентности (*vir genes*), находящихся в составе Ti-плазмиды, которая происходит при контакте бактерии с фенольным соединением ацетосирингон, который вырабатывается клетками большинства двудольных растений (Weijersbergen et al., 1992). Данная особенность уже более трех десятилетий применяется для генетической модификации двудольных растений (Hooykaas, Schilperoort, 1992).

В 1995 году было показано, что данная методика подходит не только для трансформации растений, но и других групп организмов. Авторы продемонстрировали, что при совместной культивации агробактерий и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в среде, содержащей ацетосирингон, также происходит перенос участка Ti-плазмиды из клеток бактерий в клетки дрожжей (Bundock et al., 1995). В 1997 году эта методика впервые была применена для трансформации многоклеточных грибов – анаморфных аскомицетов родов *Aspergillus*, *Fusarium* и др. (de Groot et al., 1998). В 2004 году данная методика была впервые успешно использована для трансформации энтомопатогенных грибов *B. bassiana* (Fang, et al., 2004), в 2006 году – для *M. anisopliae* (Fang et al., 2006) и в 2014 году – для *L. lecanii* (Zhang et al., 2014).

На первом этапе агробактериальной трансформации энтомопатогенных грибов (рис., б) происходит создание конструкции на основе Ti плазмиды *A. tumefaciens*, в которую на место генов онкообразования встраивается целевая последовательность ДНК. Затем полученной конструкцией трансформируется штамм *A. tumefaciens* (Fang et al., 2004, 2006; Zhang et al., 2014). В свою очередь из культуры энтомопатогенных грибов отбираются одноклеточные стадии жизненного цикла, чаще всего конидии. На втором этапе происходит совместная культивация грибов и бактерий в среде, содержащей ацетосирингон, что приводит к активации *vir* генов в составе бактериальной плазмиды и переносу целевого участка ДНК в клетки грибов. Для удобства переноса бактерий и грибов в различные среды, используемые на следующих этапах, совместную культивацию обычно производят на поверхности проницаемой для питательных веществ мембраны, помещенной в чашку Петри с агаризированной питательной средой. В качестве мембраны использовались как нитроцеллюлозные и целлофановые пористые фильтры, так и обычная фильтровальная бумага. После 12–72 часов совместной культивации мембрану с клетками переносят на среду, содержащую селективный агент для отбора трансформантов и антибиотик цефотаксим (в концентрации 200–500 мкг/мкл) для уничтожения клеток бактерий, после чего выросшие колонии трансформантов переносят на свежую чашку Петри с селективной питательной средой.

### Электропорация пророщенных конидий

Электропорация – это один из наиболее простых методов трансформации прокариотических организмов. В некоторых случаях этот метод может быть применен и для эукариот, например для трансформации клеток дрожжей (Jin et al., 2008). При электропорации образец подвергается воздействию импульсного напряжения, что приводит к созданию пор в билипидной мембране клетки, в результате чего экзогенная ДНК может переноситься в трансформируемую клетку. Непосредственная электропорация стадий жизненного цикла анаморфных аскомицетов, таких как конидии или споры различных типов, оказалась невозможна из-за особой структурой клеточной стенки у данных организмов, не позволяющей электрическому воздействию вызвать у данных организмов проницаемость мембраны для ДНК. Не результативной оказалась и попытка электропорации лишенных клеточной стенки протопластов, которые утрачивали жизнеспособность после этой процедуры (Ruiz-Díez, 2002). Эффективным

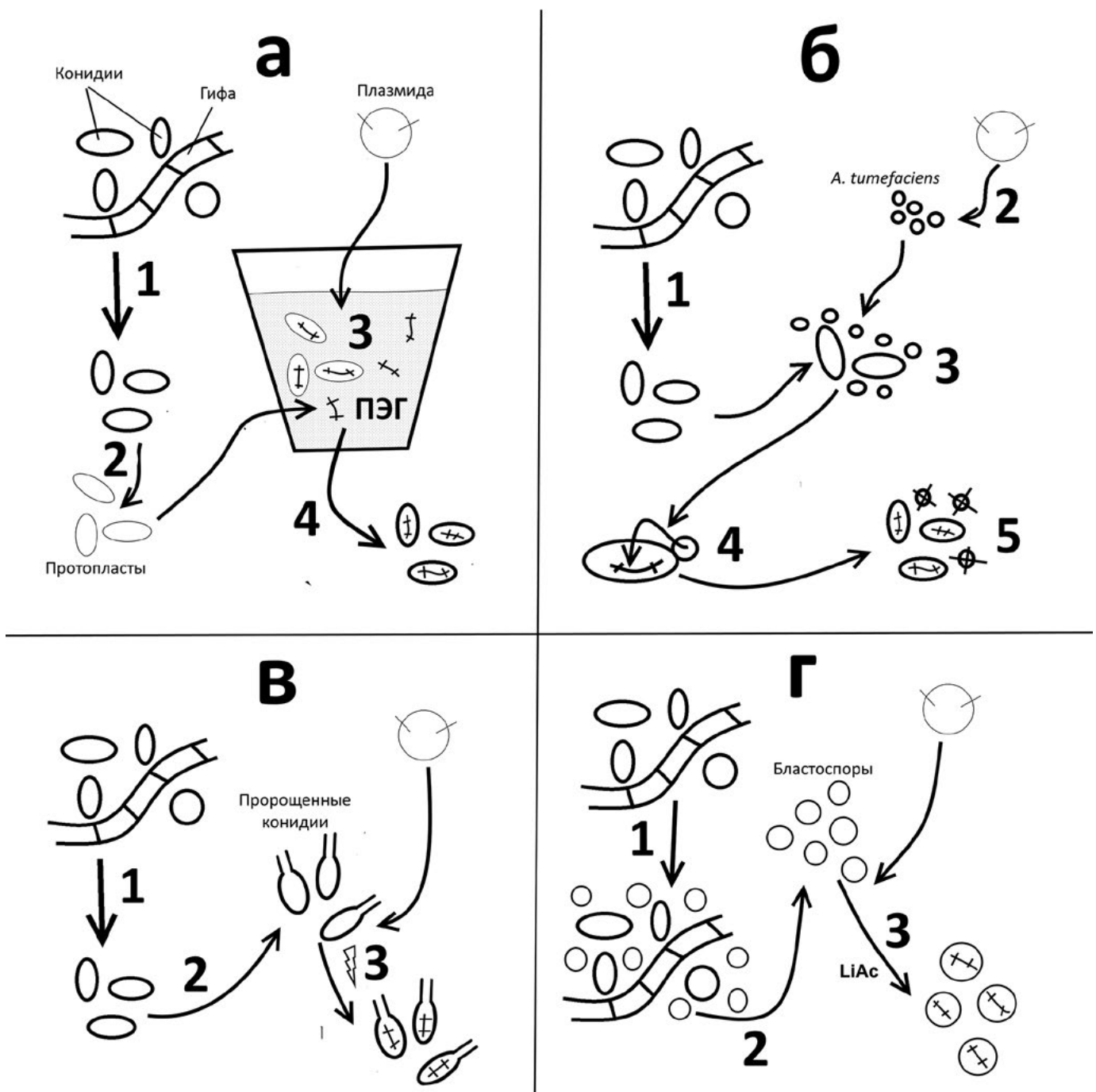


Рисунок. Схема методов трансформации энтомопатогенных мицелиальных грибов

- а – Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ). 1 – отбор конидий из культуры грибов; 2 – расщепление клеточной стенки конидий и получение протопластов; 3 – инкубация протопластов и генетической конструкции, содержащей встраиваемую последовательность, в растворе с ПЭГ и ее проникновение в клетки грибов; 4 – регенерация клеточной стенки протопластов.
- б – Агробактериальная трансформация. 1 – отбор конидий из культуры грибов; 2 – трансформация бактерии *Agrobacterium tumefaciens* конструкцией на основе Ti-плазмиды, содержащей встраиваемую последовательность, а также *vir* гены *A. tumefaciens*; 3 – объединение и начало совместного культивирования клеток грибов и бактерий; 4 – активация *vir* генов и перенос встраиваемой последовательности в клетки грибов; 5 – элиминация бактерий с помощью антибиотиков.
- в – Электропорация пророщенных конидий. 1 – отбор конидий из культуры грибов; 2 – проращивание конидий; 3 – трансформация пророщенных конидий конструкцией, содержащей встраиваемую последовательность с помощью электропорации.
- г – Химическая трансформация бластоспор с помощью ацетата лития. 1 – индукция образования бластоспор грибов в культуре; 2 – отбор бластоспор; 3 – трансформация бластоспор конструкцией, содержащей встраиваемую последовательность с помощью ацетата лития.

решением, позволяющим электропорировать энтомопатогенные грибы, является использование пророщенных конидий, клеточная стенка которых истончается в зоне проростка (рис., в). Первые данные об успешной электропорации пророщенных конидий *N. crassa* были опубликованы в 1990 году (Chakraborty, Karoor, 1990). Для энтомопатогенных грибов метод впервые был применен для *B. bassiana* (Jin et al., 2008), а в 2019 году мы адаптировали данную методику для *L. muscarium* (Timofeev et al., 2019). Метод включает в себя отбор конидий из культуры грибов и их культивирование в определенных условиях для формирования проростков. Пророщенные конидии, при условии остановки роста проростка на определенной стадии, могут быть непосредственно использованы для электропорации. Важным преимуществом данной методики является возможность заморозки электрокомпетентных конидий для их использования по мере необходимости.

#### **Химическая трансформация бластоспор с помощью ацетата лития**

Некоторые мицелиальные грибы в определенных условиях могут образовывать бластоспоры – одноклеточные тела, морфологически схожие с дрожжами, обладающие крайне тонкими стенками и меньшими по сравнению с другими видами спор и конидий размерами (Bidochka et al., 1987). Было показано, что данные стадии жизненного цикла анаморфных аскомицетов могут быть трансформированы с помощью ацетата лития, что повсеместно применяется для трансформации дрожжей (Ying, Feng, 2006). На первом этапе (рис., г) осуществляется культивация грибов в среде с определенным рН и содержанием азота для стимуляции образования бластоспор (Ypsilos, Magan, 2005). Затем осуществляется отбор данных стадий из культуры, которые могут быть заморожены и использованы по мере необходимости. Трансформация осуществляется за счет добавления к клеткам раствора, содержащего ацетат лития, который воздействует на клеточную мембрану спор, увеличивая ее пористость, а также процедуры теплового шока. Несмотря на то, что все энтомопатогены родов *Metarhizium*, *Beauveria* и *Lecanicillium* могут продуцировать бластоспоры в культуре, на сегодняшний день метод был успешно адаптирован только для *B. bassiana* (Ying, Feng, 2006; Chen et al., 2017).

#### **Сравнительный анализ методов трансформации анаморфных аскомицетов**

Субъективно оценивая трудоемкость и времязатратность описываемых методов, нам представляется, что наиболее простой в исполнении является химическая трансформация бластоспор. Для этой методики не требуется специального оборудования и большого количества разнообразных реактивов. Трансформация осуществляется в один этап, а кроме того, имеется возможность хранить компетентные клетки грибов в замороженном состоянии и использовать их по мере необходимости. Это также возможно и при подготовке материала для электропорации, которая при этом представляется нам чуть более трудоемкой, так как для этой методики необходимо, помимо отбора конидий из культуры, также осуществить их проращивание. Кроме того, необходимо наличие соответствующего оборудования для самого процесса электропорации. На третье место по трудозатратности мы поместили трансформацию протопластов с помощью ПЭГ, которая

осуществляется уже в несколько этапов: отбор материала, создание протопластов, трансформация протопластов и их регенерация. И наконец, наиболее сложной и длительной методикой, по нашему мнению, является агробактериальная трансформация, для которой необходимо предварительно получить трансформированный штамм бактерии, осуществить его совместную культивацию с отобранным материалом грибов, а затем освободить трансформированные клетки от бактерий.

Несмотря на это, анализируя встречаемость описываемых методов в литературе, можно сделать вывод, что наиболее универсальной и часто используемой методикой для энтомопатогенных аскомицетов является агробактериальная трансформация (таблица). Только этот метод успешно применялся к представителям родов как *Beauveria* и *Lecanicillium* так и *Metarhizium*, тогда как другие методы были описаны только для родов *Beauveria* и *Lecanicillium* (Трансформация с помощью ПЭГ и электропорация) или только для рода *Beauveria* (химическая трансформация бластоспор).

Еще одним критерием качественной оценки, является эффективность метода, измеряемая в количестве получаемых трансформантов на объем использованной экзогенной ДНК. К сожалению, в подавляющем большинстве случаев, этот параметр указывался в проанализированной литературе только в работах, посвященных первоописанию методов, но не в публикациях, связанных с его применением, что не позволяет выявить какие-либо статистически достоверные различия. Используя имеющиеся данные можно предположить, что эффективность всех методик является примерно одинаковой, так как во всех описанных случаях авторы получали от двух до нескольких десятков трансформантов на 1 мкг экзогенной ДНК (Ying, Feng, 2006; Jin et al., 2008; Hasan et al., 2011; Zhang et al., 2016; Timofeev et al., 2019) Для агробактериальной трансформации этот параметр не применим, так как невозможно подсчитать точно количество встраиваемой ДНК, находящийся в клетках бактерий. Можно предположить, что эффективность данной методики находится примерно на одном уровне с другими, так как количество получаемых трансформантов за один условный «раунд» трансформации, с использованием стандартной аликвоты ДНК или агробактерий, во всех случаях колеблется в пределах нескольких сотен (Fang et al., 2004, 2006; Zhang et al., 2014).

Анализируя все вышесказанное трудно однозначно порекомендовать к использованию какой-либо конкретный метод. Ни один из них не демонстрирует выраженного преимущества в количестве получаемых трансформантов. Наиболее универсальной и применимой во всех случаях оказывается агробактериальная трансформация, являясь при этом наиболее самой затратной по времени и трудоемкой. Чрезвычайно простая и удобная методика химической трансформации бластоспор описана только для *B. bassiana*, и пока у нас нет возможности утверждать о ее применимости для других энтомопатогенных аскомицетов. На сегодняшний день область генетической модификации энтомопатогенных грибов еще только развивается и для некоторых описанных методов существуют лишь единичные примеры их применения, что говорит о том, что многие методики еще должны быть разработаны и оптимизированы для разных видов анаморфных аскомицетов в будущем.

Таблица. Сводка опубликованных работ по трансформации энтомопатогенных грибов родов *Metarhizium*, *Beauveria* и *Lecanicillium*

Метод	Организм	Используемый материал	Продукт, кодируемый встраиваемым геном	Источник
Агробактериальная трансформация	<i>B. bassiana</i>	Конидии	β-глюкозидаза	Fang et al., 2004
	<i>B. bassiana</i>	Конидии	Хитиназа <i>B. bassiana</i>	Fang et al., 2005
	<i>M. anisopliae</i>	Конидии	eGFP	Fang et al., 2006
	<i>B. bassiana</i>	Конидии	GFP	Wu et al., 2008
	<i>B. bassiana</i>	Конидии	Хитиназа и протеаза <i>B. bassiana</i>	Fang et al., 2009
	<i>M. acridum</i>	Конидии	β-глюкозидаза	Cao et al., 2012
	<i>M. robertsii</i>	Конидии	Фототиаза <i>Halobacterium salinarum</i>	Fang, leger, 2012
	<i>B. bassiana</i>	Конидии	β-тубулин <i>Botrytis cinerea</i>	Zhang et al., 2014
	<i>B. bassiana</i>	Конидии	eGFP	Nai et al., 2015
	<i>L. lecanii</i>	Конидии	Токсин скорпиона <i>Buthus martensi</i>	Xie et al., 2015
	<i>M. robertsii</i>	Конидии	eGFP и mCherry	Padilla-Guerrero, Bidochka, 2017
<i>M. acridum</i>	Конидии	Двучепочечная РНК комплементарная гену АТФ синтазы <i>Locusta migratoria</i>	Hu, Xia, 2019	
<i>L. attenuatum</i>	Конидии	Двучепочечная РНК комплементарная генам иммунного ответа <i>Dialeurodes citri</i>	Yu et al., 2019	
Химическая трансформация бластоспор с помощью ацетата лития.	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	GFP	Ying, Feng, 2006
	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	Токсин скорпиона и протеаза <i>M. anisopliae</i>	Lu et al., 2008
	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	Белок клеточной стенки <i>M. anisopliae</i>	Li et al., 2010
	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	Супероксиддисмутаза <i>B. bassiana</i>	Xie et al., 2010
	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	Тиоредоксин <i>E coli</i>	Ying, Feng, 2011
	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	eGFP	Kim et al., 2013
	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	Комплекс Cas9/gRNA для редактирования генома <i>B. bassiana</i>	Chen et al., 2017
Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ)	<i>L. lecanii</i>	Мицелий	Нитратредуктаза <i>Aspergillus nidulans</i>	Hasan et al. 2011
	<i>B. bassiana</i>	Бластоспоры	Оротидин 5'-фосфат декарбоксилаза <i>B. bassiana</i>	Ying et al., 2013
	<i>L. lecanii</i>	Конидии	Оротидин 5'-фосфат декарбоксилаза <i>L. lecanii</i>	Ishidoh et al. 2014
	<i>L. lecanii</i>	Конидии	Протеаза <i>B. bassiana</i>	Zhang et al., 2016
	<i>L. attenuatum</i>	Конидии	Протеаза <i>B. bassiana</i>	Xie et al., 2016
Электропорация прощепленных конидий	<i>B. bassiana</i>	Конидии	GFP	Jin et al., 2008
	<i>B. bassiana</i>	Конидии	Синтетическая хитиназа	Fan et al., 2007
	<i>B. bassiana</i>	Конидии	Хитиназа и протеаза <i>B. bassiana</i>	Fan et al., 2010
	<i>L. muscarium</i>	Конидии	eGFP	Timofeev et al., 2019

Работа выполнена в рамках госзадания № 0483-2019-0001.

**Библиографический список (References)**

- Борисов БА, Серебров ВВ, Новикова ИИ, Бойкова ИВ (2001) Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты. В кн.: Глухов ВВ (ред) Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год. 76–188
- Ansari MA, Pope EC, Carpenter S, Scholte EJ et al (2011) Entomopathogenic fungus as a biological control for an important vector of livestock disease: the *Culicoides* biting midge. *PLoS One* 6:e16108. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0016108>
- Beijersbergen A, Den Dulk-Ras A, Schilperoort RA, Hooykaas PJJ (1992) Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 256(5061):1324–1327 <https://www.doi.org/10.1126/science.256.5061.1324>
- Bernardo CC, Barreto LP, E Silva CSR, Luz C1 et al (2018) Conidia and blastospores of *Metarhizium spp.* and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Borne Dis* 9(5):1334–1342. <https://www.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.001>
- Bidochka MJ, Pfeifer TA, Khachatourians GG (1987) Development of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid culture. *Mycopathologia* 99:77–83
- Bundock P, Dulk-Ras A, Beijersbergen AGM, Hooykaas PJJ (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14:3206–3214
- Cao Y, Jiao R, Xia Y (2012) A strong promoter, PMagpd, provides a tool for high gene expression in entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *Biotechnol Lett* 34:557–562
- Case ME, Schweizer M, Kushner SR, Giles NH (1979) Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5259–5263
- Chakraborty BN, Kapoor M (1990) Transformation of filamentous fungi by electroporation. *Nucleic Acids Res* 18:6737
- Chen J, Lai Y, Wang L, Zhai S, Zou G, Zhou Z, et al (2017) CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Sci Rep* 7:45763 <https://www.doi.org/10.1038/srep45763>

- De Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43(3):237–256. <http://www.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- De Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 16: 839–842
- Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X et al (2007) Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* overexpressing an engineered chitinase with the chitin binding domain from *Bombyx mori*. *Appl Environ Microbiol* 73(1):295–302. <https://www.doi.org/10.1128/AEM.01974-06>
- Fan Y, Pei X, Guo S, Zhang Y et al (2010) Increased virulence using engineered protease-chitin binding domain hybrid expressed in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microb Pathog* 49(6):376–380. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.06.013>
- Fang W, Zhang Y, Yang X, Zheng X et al (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *J Invertebr Pathol* 85(1):18–24. <https://www.doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.003>
- Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K et al (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl Environ Microbiol* 71(1):363–370. <https://www.doi.org/10.1128/AEM.71.1.363-370.2005>
- Fang W, Pei Y, Bidochka MJ (2006) Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Can J Microbiol* 52(7):623–626. <https://www.doi.org/10.1139/w06-014>
- Fang W, Feng J, Fan Y, Zhang Y et al. (2009) Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* 102(2):155–159. <https://www.doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.013>
- Fang W, St. Leger RJ (2012) Enhanced UV Resistance and Improved Killing of Malaria Mosquitoes by Photolyase Transgenic Entomopathogenic Fungi. *PLoS ONE* 7(8):e43069. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0043069>
- Goettel MS, Koike M, Kim JJ, Aiuchi D et al (2008). Potential of *Lecanicillium spp.* for management of insects, nematodes and plant diseases. *J Invertebr Pathol* 98(3):256–261. <https://www.doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.009>
- Gressel J (2007) Failsafe mechanisms for preventing gene flow and organism dispersal of enhanced microbial biocontrol agents. In: Vurro M, Gressel J. *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Dordrecht: Springer. 353–362
- Hasan S, Singh RI, Singh SS (2011) Development of Transformation System of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium spp.*) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Based on Nitrate Reductase Gene of *Aspergillus nidulans*. *Indian J Microbiol* 51(3):390–395
- Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* 19:15–38
- Hu J, Xia Y (2019) Increased virulence in the locust-specific fungal pathogen *Metarhizium acridum* expressing dsRNAs targeting the host F1F0 -ATPase subunit genes. *Pest Manag Sci* 75:180–186. <https://www.doi.org/10.1002/ps.5085>
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. New York: CABI Publishing. 23–69
- Ishidoh K, Kinoshita H, Ihara F, Nihira T (2014) Efficient and versatile transformation systems in entomopathogenic fungus *Lecanicillium* species. *Current Genetics* 60(2):99–108. <https://www.doi.org/10.1007/s00294-013-0399-5>
- Jin K, Zhang Y, Luo Z, Xiao Y et al (2008) An improved method for *Beauveria bassiana* transformation using phosphinothricin acetyltransferase and green fluorescent protein fusion gene as a selectable and visible marker. *Biotechnol Lett* 30(8):1379–1383
- Kim JS, Choi JY, Lee SJ, Lee JH et al (2013) Transformation of *Beauveria bassiana* to produce EGFP in *Tenebrio molitor* for use as animal feed additives. *FEMS Microbiol Lett* 344:173–178. <https://www.doi.org/10.1111/1574-6968.12173>
- Koukaki M, Giannoutsou E, Karagouni A, Diallinas GA (2003) A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J Microbiol Meth* 55(3):687–695. [https://www.doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00208-2](https://www.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00208-2)
- Krappmann S, Sasse C, Braus GH (2006) Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Euk Cell* 5(1):212–215. <https://www.doi.org/10.1128/EC.5.1.212-215.2006>
- Kuwano T, Shirataki C, Itoh Y (2008) Comparison between polyethylene glycol- and polyethylenimine-mediated transformation of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 54(2):95–103
- Li J, Ying SH, Shan LT, Feng MG (2010) A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(4):975–984
- Liu Z, Friesen TL (2012) Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation in filamentous fungal pathogens. *Meth Mol Biol* 835:365–375. [https://www.doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5\\_21](https://www.doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_21)
- Lovett B, St Leger RJ (2018) Genetically engineering better fungal biopesticides. *Pest Manag Sci* 74(4):781–789. <https://www.doi.org/10.1002/ps.4734>
- Lu D, Pava-Ripoll M, Li Z, Wang C (2008) Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(3):515–522. <https://www.doi.org/10.1007/s00253-008-1695-8>
- Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(33):12248–12253. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.0402780101>
- Padilla-Guerrero IE, Bidochka MJ (2017) *Agrobacterium*-mediated co-transformation of multiple genes in *Metarhizium robertsii*. *Mycobiology* 45(2):84–89. <https://www.doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.2.84>
- Rangel DE, Anderson AJ, Roberts DW (2008) Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol Res* 112(11):1362–1372. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.04.013>
- Ruiz-Díez B. (2002) Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J App Microbiol* 92(2):189–195. <https://www.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01516.x>
- Timofeev S, Tsarev A, Senderskiy I, Rogozhin E et al (2019) Efficient transformation of the entomopathogenic fungus

- Lecanicillium muscarium* by electroporation of germinated conidia. *Mycoscience* 60(3):197–200. <https://www.doi.org/10.1016/j.myc.2019.02.010>
- Tomas MB, Read AF (2007) Can fungal biopesticides control malaria? *Nat. Rev. Microbiol.* 5(5):377–383. <https://www.doi.org/10.1038/nrmicro1638>
- Wu J, Ridgway H, Carpenter M, Glare T (2008) Efficient transformation of *Beauveria bassiana* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated insertional mutagenesis. *Plant Pathol* 37:537–542
- Xie M, Zhang YJ, Zhai XM, Zhao JJ et al (2015) Expression of a scorpion toxin gene BmKit enhances the virulence of *Lecanicillium lecanii* against aphids. *J Pest Sci* 88(3):637–644. <https://www.doi.org/10.1007/s10340-015-0644-4>
- Xie XQ, Wang J, Huang BF, Ying SH, Feng MG (2010) A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal pathogen. *Appl Microb Biotech* 86(5):1543–1553.
- Xie M, Zhang YJ, Zhang XL, Peng DL (2016) Genetic improvement of the nematocidal fungus *Lecanicillium attenuatum* against *Heterodera glycines* by expression of the *Beauveria bassiana* Cdep1 protease gene. *J Invertebr Pathol* 138:86–88. <https://www.doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.008>
- Xu C, Zhang X, Qian Y, Chen X, Liu R, et al (2014) A High-Throughput Gene Disruption Methodology for the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium robertsii*. *PLoS ONE* 9(9): e107657. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0107657>
- Ying SH, Feng MG (2006) Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidia of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Lett Appl Microbiol* 43:331–335. <https://www.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01947.x>
- Ying SH, Feng MG (2011) Integration of *Escherichia coli* thioredoxin (trxA) into *Beauveria bassiana* enhances the fungal tolerance to the stresses of oxidation, heat and UV-B irradiation. *Biol Control* 59(2):255–260. <https://www.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.005>
- Ying SH, Feng MG, Keyhani NO (2013) Use of uridine auxotrophy (ura3) for markerless transformation of the mycoinsecticide *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(7):3017–3025
- Ypsilos IK, Magan N (2005) Characterisation of optimum cultural environmental conditions for the production of high numbers of *Metarhizium anisopliae* blastospores with enhanced ecological fitness. *Biocontrol Sci Technol* 15(7):683–699. <https://www.doi.org/10.1080/09583150500136774>
- Yu SJ, Pan Q, Luo R, Wang CL et al (2019) Expression of exogenous dsRNA by *Lecanicillium attenuatum* enhances its virulence to *Dialeurodes citri*. *Pest Manag Sci* 75: 1014–1023. <https://www.doi.org/10.1002/ps.5210>
- Zhang S, Fan Y, Xia YX, Keyhani NO (2010) Sulfonylurea resistance as a new selectable marker for the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(3):1151–1156
- Zhang Y-J, Zhao J-J, Xie M, Peng D-L (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in the entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* and development of benzimidazole fungicide resistant strains. *J Microbiol Methods* 105:168–173. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.033>
- Zhang Y-J, Xie M, Zhang XL, Peng D-L et al (2016) Establishment of polyethylene-glycol-mediated protoplast transformation for *Lecanicillium lecanii* and development of virulence-enhanced strains against *Aphis gossypii*. *Pest Manag Sci* 72:1951–1958. <https://www.doi.org/10.1002/ps.4236>

#### Translation of Russian References

- Borisov BA, Serebrov VV, Novikova II, Boykova IV (2001) *Entomopatogennye askomitsety i deyteromitsety*. In: Glupov VV (ed) [Insect pathogens: structural and functional aspects] M.: Kruglyy god. 76–188 (In Russian)

Plant Protection News, 2019, 2(100), p. 7–14

OECD+WoS: 1.06+RQ

[http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-2\(100\)-7-14](http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-2(100)-7-14)

*Full-text review*

### TRANSFORMATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI: A METHODOLOGICAL REVIEW

S.A. Timofeev\*, V.S. Zhuravlev, V.V. Dolgikh

*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

\*corresponding author, e-mail: [ts-bio@ya.ru](mailto:ts-bio@ya.ru)

Entomopathogenic fungi are widely used as an environmentally friendly alternative to chemical pesticides against pests and vectors of human diseases. One of the promising ways to increase the efficiency of biopesticides based on filamentous fungi is their genetic modification. Genetic transformation allows increasing the virulence of the strains used, as well as their resistance to abiotic environmental factors. This review presents modern methods of transformation of entomopathogenic anamorph ascomycetes: polyethylene glycol-mediated transformation of protoplasts, agrobacteria-based transformation, electroporation of germinated conidia, and chemical transformation of blastospores. A comparative analysis of these methods has shown that agrobacterial transformation is the most universal method widely described for various types of mycelial pathogens of insects, including representatives of the genera *Beauveria*, *Metarhizium* and *Lecanicillium*. At the same time, the simplest and least time-consuming method of chemical transformation of blastospores is currently used only for *B. bassiana*. The review also describes the methods of inserted sequences recombination into the genome of fungi and the genetic markers for negative and positive selection of modified organisms.

**Key words:** entomopathogenic fungi, transformation, plant protection, protoplasts, agrobacteria, electroporation

Received: 03.02.2019

Accepted: 30.05.2019