

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И ВИРУСОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ

С.А. Тимофеев, А.Г. Шухалова, И.В. Сендерский, В.В. Долгих

ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

Биологическая борьба с вредителями в сельском хозяйстве представляет собой безопасную и экологически чистую альтернативу широко распространенному использованию синтетических пестицидов. Разнообразные естественные враги насекомых, хищники или паразитоиды, а также патогены, такие как бактерии, вирусы и грибы, как по отдельности, так и в комбинациях, могут быть использованы для этой цели [1]. Тем не менее, этот подход не лишен недостатков, включая относительно низкую скорость уничтожения вредителей и уязвимость биопестицидов к влиянию окружающей среды. Во многом эту проблему можно решить с помощью генетической модификации патогенов насекомых, направленной на повышение их вирулентности и/или устойчивости [2, 3]. В этой работе будут представлены результаты последних лет исследований нашей группы по получению штаммов энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* и *Lecanicillium muscarium*, а также вируса ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcMNPV) с повышенной вирулентностью. Этот эффект достигается за счет встраивания в их геномы последовательностей, кодирующих токсины из ядов хищных и паразитоидных членистоногих, а также рекомбинантные одноцепочечные антитела.

Общая схема эксперимента, для большинства изученных встраиваемых молекул заключалась в их бактериальной экспрессии, иммунизации мышей рекомбинантным продуктом и получении поликлональных антител. Затем с помощью системы bac-to-bac и вектора pFastBac™ Dual были получены рекомбинантные штаммы AcMNPV. Штаммы же генетически модифицированных грибов создавались за счет электропорации пророщенных конидий конструкциями на базе вектора pBarGPE по ранее разработанной нами методике [4]. Первичное тестирование рекомбинантных вирусов проводили за счет заражения клеточной культуры Sf9 и изучения локализации рекомбинантного продукта с помощью ранее полученных антител. Эти же антитела использовали для оценки синтеза рекомбинантных белков в *B. bassiana* и *L. muscarium* при их культивировании в жидкой среде. Целью этого этапа работы служил отбор молекул, которые будут секретироваться в активной форме зараженными вирусом клетками насекомых, или клетками энтомопатогенных грибов во внешнюю среду. Таким образом при заражении насекомых рекомбинантным штаммом, гетерогенный белок будет поступать в гемолимфу насекомого-вредителя, где он сможет оказать токсическое действие на его жизнедеятельность. Для создания биопестицидов на основе энтомопатогенных грибов и вирусов перспективными оказались 30кДа нейротоксин из яда осы наездника *Nabrobracon hebetor*, иммуносупрессорный белок rVPr1 из яда осы-наездника *Pimpla hypochondriaca*, токсин из яда паука *Agelena orientalis*. В то же время добиться экспрессии и секреции белка в активной форме не удалось для рекомбинантных одноцепочечных антител, 16кДа нейротоксина *H. hebetor*, а также δ-латроинсектотоксина из яда каракурта *Latrodectus tredecimguttatus*.

Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 23-26-00039.

Литература

1. Koller J, Sutter L, Gonthier J, Collatz J, Norgrove L (2023) Entomopathogens and Parasitoids Allied in Biocontrol: A Systematic Review. *Pathogens* 12:957. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070957>
2. Kroemer JA, Bonning BC, Harrison RL (2015) Expression, Delivery and Function of Insecticidal Proteins Expressed by Recombinant Baculoviruses. *Viruses* 7:422–455. <https://doi.org/10.3390/v7010422>
3. Lovett B, St. Leger RJ (2018) Genetically engineering better fungal biopesticides. *Pest Manag Sci* 74:781–789. <https://doi.org/10.1002/ps.4734>
4. Timofeev S, Tsarev A, Senderskiy I, Rogozhin E, Mitina G, Kozlov S, Dolgikh V (2019) Efficient transformation of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* by electroporation of germinated conidia. *Mycoscience* 60(3): 197–200 <https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.02.010>