QO‘QON DAVLAT PEDAGOGIKA INSTITUTI ILMIY XABARLARI
(2026-yil 1-son)

TABIIY FANLAR

NATURAL SCIENCES

579.26:577.21:66.081.6

МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТОКОЛОВ И ФАКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ.

https://doi.org/10.70728/qdpi.v08.i01.023

Шамухутдинова У.Х.[1,2], Усманов Д.Э.[1],
Хусанбаева Ш.Р.[1], Тоштемирова М.Ж.[2], Абдугаффоров А.Т.[1]
[1]Центр геномики и биоинформатики АН РУз
[2] Ташкентский государственный технический университет имени Ислама Каримова
u.shamukhutdinova@tdtu.uz

Аннотация.В обзоре представлен сравнительный анализ протоколов электропорации, применяемых для генетической трансформации микромицетов. Особое внимание уделяется факторам, определяющим эффективность метода: физиологическому состоянию клеток, способам ослабления клеточной стенки, составу буфера и параметрам электрического импульса. На основе анализа литературы выделены как универсальные принципы, так и видоспецифичные этапы, требующие оптимизации. Рассмотрены перспективы применения электропорации для доставки компонентов систем редактирования генома (CRISPR-Cas9) и даны практические рекомендации по разработке и оптимизации протоколов для новых видов грибов.

Ключевые слова:электропорация, трансформация, микромицеты, филаментные грибы, оптимизация, клеточная стенка, CRISPR-Cas9.

Annotatsiya. Ushbu maqolada mikromisetlarning genetik transformatsiyasi uchun qo‘llaniladigan elektroporatsiya protokollarining qiyosiy tahili taqdim qilingan. Usulning samaradorligini belgilovchi quyidagi omillarga alohida e’tibor qaratilgan: hujayralarning fiziologik holati, hujayra devorining o‘tkazuvchanligini oshirish usullari, bufer tarkibi va elektr impulsi parametrlari. Adabiyotlar tahili asosida ham universal tamoyillar, ham optimallashtirishni talab qiladigan turlarga xos bosqichlar ajratib ko‘rsatilgan. Elektroporatsiyaning genomni tahrirlash tizimi komponentlarini (CRISPR-Cas9) yetkazib

berish uchun qo‘llanilishi istiqbollari ko‘rib chiqilgan va yangi zamburug‘ turlari uchun protokollarni ishlab chiqish va optimallashtirish bo‘yicha amaliy tavsiyalar berilgan.

Kalit so‘zlar: elektroporatsiya, transformatsiya, mikromisetlar, filamentli zamburug‘lar, optimallashtirish, hujayra devori, CRISPR-Cas9.

Abstract. This review provides a comparative analysis of electroporation protocols used for the genetic transformation of micromycetes. Special attention is paid to the factors determining the method's efficiency: the physiological state of cells, methods of cell wall modification, buffer composition, and electrical pulse parameters. Based on literature analysis, both universal principles and species-specific steps requiring optimization are highlighted. The prospects of using electroporation for the delivery of genome editing system components (CRISPR-Cas9) are considered, and practical recommendations are provided for the development and optimization of protocols for new fungal species.

Keywords: electroporation, transformation, micromycetes, filamentous fungi, optimization, cell wall, CRISPR-Cas9.

Введение. Микромицеты, такие как филаментные грибы и дрожжи, занимают центральное место в биотехнологии, выступая продуцентами широкого спектра промышленно значимых соединений от гидролитических ферментов и органических кислот до фармакологически активных вторичных метаболитов(Kück & Hoff, 2010). Микромицеты так же служат важными модельными объектами в фундаментальных исследованиях клеточной биологии, метаболизма и патогенеза. Исторически, первые успешные протоколы основывались на использовании протопластов, однако их получение часто сопряжено с трудоёмкостью и низкой воспроизводимостью. Прорывом стал метод трансформации, опосредованный *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), обеспечивший высокую эффективность для многих видов (de Groot и др., 1998). В этом ряду электропорация, метод физической доставки ДНК в клетки под действием высоковольтного электрического импульса занимает особое положение. Она представляет собой относительно простой, быстрый и не требующий сложных биохимических реагентов подход, что делает её привлекательной для лабораторий, работающих с разнообразными грибными объектами (Haberl Meglič & Kotnik, 2016).

Особую актуальность электропорация и родственные ей методы доставки приобретают в контексте развития технологий прецизионного редактирования генома, таких как система CRISPR-Cas9 (Nødvig и др., 2015). Эта технология революционизировала генетическую инженерию, позволив вводить направленные мутации и осуществлять эффективную трансформацию даже у немодельных филаментных грибов. Однако успешное применение CRISPR-Cas9 напрямую зависит от эффективной и надёжной доставки её компонентов, таких как плазмиды, рибонуклеопротеиновые комплексы в клетку-мишень(Nødvig и др., 2015). Таким

образом, совершенствование методов трансформации, включая электропорацию, является критически важным для реализации полного потенциала современных инструментов геномного редактирования в микологии.

Несмотря на кажущуюся простоту, электропорация является крайне чувствительным и вариабельным методом. Её эффективность в значительной степени зависит от совокупности факторов, среди которых можно выделить: видовую и даже штаммовую специфичность реципиента, физиологическое состояние клеток, то есть, зрелые или пророщенные конидии, протопласты, параметры электрического импульса, такие как форма волны, напряжённость поля, длительность, число импульсов и состав буферной системы (Meyer и др., 2003) (Chakraborty и др., 1991). Например, электропорация оказалась малопригодной для трансформации *Aspergillus giganteus* в исследовании (Meyer и др., 2003), в то время как для *A. nidulans* были разработаны эффективные протоколы(Sánchez & Aguirre, 1996). Критическим фактором успеха часто является предобработка клеток ферментами, ослабляющими клеточную стенку, например, β-глюкуронидазой, что подчёркивает важность преодоления этого структурного барьера (Chakraborty и др., 1991). В результате существует множество разрозненных, зачастую эмпирически подобранных протоколов, что создаёт трудности при адаптации метода к новым объектам и снижает воспроизводимость результатов между лабораториями. Отсутствие систематизированных знаний о сравнительной эффективности различных подходов и универсальных принципах оптимизации тормозит широкое применение электропорации, особенно в контексте современных высокоточных методов редактирования генома, таких как CRISPR-Cas9(Nødvig и др., 2015).

Целью данной обзорной статьи является сравнительный анализ опубликованных протоколов электропорации для генетической трансформации различных микромицетов. В задачи работы входит: выявление универсальных принципов и ключевых этапов метода, общих для большинства объектов, включая соображения, изложенные в обзоре по биотехнологическим применениям электропорации(Haberl Meglič & Kotnik, 2016).

Основные этапы и параметры электропорации. Определение видов-специфичных критических шагов, требующих индивидуальной оптимизации, например, стадия сбора клеток, состав буфера, или параметры импульса. Сравнительный анализ эффективности электропорации с альтернативными методами трансформации, такими как АТМТ и метод с использованием протопластов, с точки зрения выхода трансформантов, частоты гомологичной рекомбинации и простоты исполнения. Разработка практических рекомендаций и стратегий для рациональной оптимизации протоколов электропорации для новых видов микромицетов, в том числе для доставки компонентов систем редактирования генома, подобных CRISPR-

Cas9(Nødvig и др., 2015). Такой анализ представляет собой насущную необходимость для консолидации методологического опыта, преодоления существующей разобщённости и, как следствие, ускорения фундаментальных и прикладных исследований. Это особенно актуально в эпоху развития технологий редактирования генома, например, CRISPR-Cas9, эффективность которых напрямую зависит от надёжности и эффективности базовых методов доставки генетического материала в клетку.

Критические этапы электропорации: Эффективность электропорации, как метода генетической трансформации, определяется серией последовательных и взаимосвязанных этапов. Каждый из них требует тщательной оптимизации, параметры которой могут существенно различаться в зависимости от вида гриба-реципиента. Сравнительный анализ опубликованных протоколов позволяет выделить как универсальные принципы, так и критические видовоспецифичные шаги, определяющие успех трансформации.

Физиологическое состояние клеток-реципиентов

Физиологическое состояние клеток в момент нанесения электрического импульса является одним из наиболее значимых факторов. В различных протоколах используются зрелые, набухшие или проросшие конидии, а также протопласты. Сравнение данных указывает на отсутствие универсальной оптимальной стадии, однако выявляет ключевые закономерности. Проросшие конидии с короткой ростковой трубкой широко применяются для многих видов, таких как *Neurospora crassa*, *Penicillium urticae* и *Aspergillus oryzae* (Chakraborty и др., 1991). В этой стадии клеточная стенка активно ремоделируется, что повышает её проницаемость для макромолекул. Однако перерастание более 4-6 часов резко снижает жизнеспособность клеток после электрошока. Стадия набухания, включающая 2-4 часа инкубации в питательной среде без образования ростковой трубки, оказалась критически важной для *A. nidulans* (Sánchez & Aguirre, 1996). Авторы показали, что использование набухших конидий даёт примерно в 18 раз больший выход трансформантов по сравнению с необработанными клетками. Этот этап, вероятно, соответствует периоду максимальной метаболической активности и компетентности у данного вида. Зрелые конидии без проращивания успешно использовались для трансформации термофильных грибов (Balabanova и др., 2019), что упрощает протокол, но может потребовать более жёстких параметров импульса для преодоления неповреждённой клеточной стенки. Протопласты, полностью лишённые клеточной стенки, традиционно считаются наиболее компетентными для поглощения ДНК. Протоколы для *A. niger* и *A. awamori* демонстрируют повышенную эффективность трансформации при использовании протопластов по сравнению с интактными конидиями(Ozeki и др., 1994) (Ward и др., 1989). Однако трудоёмкость и

низкая воспроизводимость их получения остаются серьёзными ограничениями(Ruiz-Diez, 2002). Таким образом, выбор стадии клеток представляет собой первый и, возможно, наиболее важный видоспецифичный параметр, требующий эмпирического подбора.

Модификация клеточной стенки: ферментативные и химические методы

Клеточная стенка грибов, состоящая из хитина, глюканов и других полимеров, представляет собой основной барьер для проникновения ДНК(Bowman & Free, 2006). Для повышения её проницаемости применяются ферментативные и химические методы предобработки. Ферментативная обработка продемонстрировала выдающуюся эффективность. Обработка пророщенных конидий β-глюкуронидазой (1 мг/мл) повышала частоту трансформации *N. crassa, P. urticae, A. oryzae* и *Leptosphaeria maculans* примерно в 10 раз (Chakraborty и др., 1991). Для *L. maculans* дополнительное применение хитиназы также оказалось полезным. Этот подход напрямую нацелен на ослабление структурных компонентов клеточной стенки. Химическая предобработка, такая как использование DTT (дитиотреитола) и ацетата лития (LiAc), широко применяется в протоколах для дрожжей(Gietz & Woods, 2001) и была протестирована для филаментных грибов. Однако для *A. nidulans* обработка DTT не дала значимого эффекта(Sánchez & Aguirre, 1996), а для *A. giganteus* предобработка LiAc/DTT оказалась полностью неэффективной (Meyer и др., 2003). Это подчёркивает, что эффективность химических методов сильно зависит от биохимического состава клеточной стенки конкретного вида. Отсутствие предобработки возможно для некоторых объектов, как в случае с термофильными грибами(Balabanova и др., 2019), но, как правило, приводит к снижению эффективности трансформации. Можно заключить, что ферментативное ослабление клеточной стенки является мощным и часто необходимым инструментом, в то время как универсальность химических методов ограничена.

Состав буфера для электропорации критически важен, так как определяет ионную силу среды, осмотическую поддержку и условия прохождения электрического импульса(Kotnik и др., 2015). Буферы на основе сахарозы и ацетата лития, например, 10 мМ Tris-HCl, 270 мМ сахароза, 1 мМ LiAc, являются стандартными для многих протоколов, включая методы для *A. nidulans* (Sánchez & Aguirre, 1996), *A. giganteus* (Meyer и др., 2003) и термофильных грибов(Balabanova и др., 2019). Сахароза обеспечивает осмотическую стабилизацию, а низкая ионная сила минимизирует ток и джоулев нагрев, позволяя прикладывать более высокие напряжения. Буферы на основе маннитола и HEPES (например, 1 мМ HEPES, 50 мМ маннитол) с ещё более низкой ионной силой успешно применялись для *N. crassa* и родственных видов (Chakraborty и др., 1991) (Balabanova и др., 2019). Такой состав оптимален для генерации сильного электрического поля.

Состав буфера и влияние ионной силы

Высокая концентрация ионов, например, в фосфатных буферах, увеличивает электрическую проводимость суспензии, что приводит к чрезмерному нагреву и необходимости снижения напряжения импульса, тем самым снижая эффективность электропорации (Weaver, 1995). Поэтому во всех сравниваемых протоколах используются буферы с низкой ионной силой.

Выбор между буферами на основе сахарозы или маннитола часто является эмпирическим и может зависеть от устойчивости конкретного вида к осмотическому шоку. Успешным примером такой эмпирической оптимизации является протокол для термофильных грибов, где наравне с буфером на основе маннитола (1 мМ HEPES, 50 мМ маннитол) эффективно применялся буфер, содержащий сахарозу и ацетат лития (10 мМ Tris-HCl, 270 мМ сахароза, 1 мМ LiAc)(Balabanova и др., 2019). И этап восстановления клеток после электропорации в данном протоколе проводили не в питательной среде, а в осмотическом стабилизаторе (50 мМ маннитол), что, вероятно, способствует выживанию клеток в условиях термического и осмотического стресса, характерного для данных объектов.

Параметры электрического импульса

Параметры импульса непосредственно определяют степень обратимой пермеабилизации мембраны и должны находиться в балансе с выживаемостью клеток (Haberl Meglič & Kotnik, 2016b). Напряжённость поля варьирует в широких пределах: от 5.0 кВ/см для *A. Nidulans* (Sánchez & Aguirre, 1996) до 12.5 кВ/см для *N. crassa* (Chakraborty и др., 1991). Более высокие значения (8.5 кВ/см) также использовались для термофильных грибов (Balabanova и др., 2019). Оптимальное значение зависит от размера клеток, толщины клеточной стенки и расстояния между электродами.

Большинство протоколов используют импульсы с экспоненциальным спадом. Однако в работе (Balabanova и др., 2019) для термофильных грибов было показано преимущество прямоугольных импульсов, которые обеспечивают более точный контроль длительности воздействия и могут быть менее повреждающими, что наглядно демонстрирует, что для некоторых объектов, в частности термофильных грибов, использование прямоугольных импульсов (8.5 кВ/см, 1 мс, 2 импульса) может обеспечивать сравнимую или даже более высокую эффективность трансформации по сравнению со стандартными экспоненциальными, подчёркивая важность тестирования различных форм волны в процессе оптимизации протокола(Balabanova и др., 2019). Это указывает на перспективность тестирования различных форм импульсов при оптимизации. Постоянная времени (τ), определяемая сопротивлением и ёмкостью контура, является ключевым индикатором. В оптимальных условиях для *N. crassa* она составляла ~5 мс (Chakraborty и др., 1991). Слишком короткое τ может указывать на неполную зарядку конденсатора и слабый

импульс, слишком длинное на чрезмерный нагрев. Ёмкость и сопротивление. Типичные значения ёмкости составляют 25 мкФ, а сопротивление варьирует от 200 Ом до 400 Ом или бесконечности (∞), что также влияет на форму и длительность импульса. Общей закономерностью является то, что увеличение напряжённости поля или длительности импульса сверх оптимальных значений ведёт к резкому падению жизнеспособности клеток без повышения эффективности трансформации.

Процедуры, следующие непосредственно за электропорацией, направлены на восстановление изначальной структуры мембраны и обеспечение экспрессии селективного маркера до контакта клеток с антибиотиком. Практикуются два основных подхода: инкубация в питательной среде, например, минимальной среде Фогеля, в течение 2-3 часов (Chakraborty и др., 1991) или в осмотическом стабилизаторе (маннитол, сорбитол)(Meyer и др., 2003) (Balabanova и др., 2019). Первый подход обеспечивает клетки ресурсами для быстрого метаболизма и репарации, второй, более щадящие осмотические условия для повреждённых клеток. Для усиления селективного давления и подавления фона медленно растущих нетрансформированных клеток эффективным приёмом является заливка поверхности агара тонким слоем селективного агара после начальной инкубации (Meyer и др., 2003) Это стандартный метод для работы с грибами, образующими ползучий мицелий.

Контрольные эксперименты являются неотъемлемой частью процедуры и включают: контроль жизнеспособности, то есть, электропорация без ДНК, контроль самоустойчивости, используется дикий тип на селективной среде, и положительный контроль трансформации, уже известная эффективная плазмида. Их проведение критически важно для корректной интерпретации результатов.

Сравнительный анализ протоколов электропорации

Сравнительный анализ выявляет, что, несмотря на видовую вариабельность, существуют универсальные принципы успешной электропорации грибов: 1) использование клеток в состоянии максимальной метаболической активности и ослабленной клеточной стенки; 2) применение буферов с низкой ионной силой для эффективной генерации электрического поля; 3) эмпирический подбор баланса между параметрами импульса (напряжённость, длительность) и выживаемостью клеток; 4) обязательное включение этапа восстановления после импульса. Критически видоспецифичными этапами, требующими индивидуальной оптимизации, являются выбор стадии клеток, набухшие или пророщенные конидии, и метод ослабления клеточной стенки, ферментативный, химический или отсутствие обработки. Неудачи в трансформации некоторых видов, таких как *A. giganteus*, методами электропорации и биолистики (Meyer et al., 2003) при высокой

эффективности АТМТ, подчёркивают, что для ряда объектов электропорация может быть неприменима, и необходимо рассматривать альтернативные методы.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на систематизацию взаимосвязи между структурой клеточной стенки, физиологией вида и оптимальными параметрами электропорации, что особенно актуально для разработки методов доставки сложных конструкций, таких как CRISPR-Cas9 рибонуклеопротеиновые комплексы.

Заключение

Проведенный сравнительный анализ позволяет констатировать, что электропорация, являясь технически простым и воспроизводимым методом, сохраняет свою значимость для генетической трансформации микромицетов. Её эффективность, однако, в решающей степени определяется комплексом взаимосвязанных параметров, подлежащих оптимизации для каждого конкретного объекта. В ходе анализа были систематизированы ключевые факторы успеха. Установлено, что базовыми принципами, универсальными для большинства видов, являются: использование клеток в состоянии высокой физиологической активности, применение буферов с низкой ионной силой для минимизации нагрева и обязательный этап восстановления клеток после воздействия импульса.

Таблица 1.

Параметр / Статья	Chakraborty et al., 1991	Balabanova et al., 2019	Meyer et al., 2003 (A. giganteus)	Sánchez & Aguirre, 1996 (A. nidulans)
Объект	H. crassa, P. urticae, A. oryzae, L. maculans	Термофильные грибы (Th., Thermomyces)	A. giganteus	A. nidulans
Стадия клеток	Проросшие конидии (ростковая трубка)	Зрелые конидии	Проросшие конидии (до 22 ч)	Набухшие конидии (2 ч, без ростковой трубки)
Предобработка	β-глюкуронидаза (1 мг/мл, 2 ч). Критически важно.	Без ферментной обработки	Тестировали LiAc/DTT (неэффективно)	DTT (необязателен). Основа — набухание.
Буфер для э/п	1 мМ HEPES, 50 мМ маннитол	A) 10 мМ Tris, 270 мМ сахароза, 1 мМ LiAc B) 1 мМ HEPES, 50 мМ маннитол, 0.01% Tween-20	10 мМ Tris, 270 мМ сахароза, 1 мМ LiAc	10 мМ Tris, 270 мМ сахароза, 1 мМ LiAc
Напряжение	12.5 кВ/см (2500 В)	8.5 кВ/см (1.7 кВ) или 5.0 кВ/см (1.0 кВ)	3.0 – 8.0 кВ/см (0.6 – 1.6 кВ)	5.0 кВ/см (1000 В)
Ёмкость	25 мкФ	25 мкФ	25 мкФ	25 мкФ
Сопротивление	200 Ом	∞ (прямоуг.) или 400 Ом (экспон.)	400 Ом	400 Ом
Форма импульса	Экспоненциальный спад	Прямоугольный (лучше) или	Экспоненциальный спад	Экспоненциальный спад

		экспоненциальный		
Кол-во ДНК	1–5 мкг	10 мкг	0.2–2.0 мкг	1 мкг
Восстановление	2-3 ч в питат. среде	90 мин в 50 мМ маннитоле	90 мин в 1 М сорбитоле	90 мин в богатой среде (YED)
Эффективность	Высокая (10^2–10^3/мкг)	Средняя (десятки/10^5 конидий)	Крайне низкая (0-2)	Высокая для ARS-плазмид (сотни/мкг)
Ключевой вывод	Ферментная обработка критична. Высокие параметры.	Прямоугольный импульс может быть лучше. Буфер с сахарозой и LiAc стандартен.	Метод непригоден для данного вида. Нужен ATMT или протопласты.	Стадия набухания критична. Автореплицирующиеся векторы резко повышают выход.

Центральной практической задачей является эмпирический поиск баланса между параметрами электрического импульса и жизнеспособностью клеточной суспензии. Было выявлено, что критически видоспецифичными этапами, требующими первоочередной экспериментальной оптимизации, являются: выбор оптимальной стадии клеток-реципиентов и выбор эффективного метода ослабления клеточной стенки. Как показано на примере различных протоколов, ферментативная обработка часто является наиболее действенным подходом, в то время как химические методы, на основе LiAc или DTT, демонстрируют непредсказуемую эффективность, зависящую от биохимического состава стенки. Сравнительная эффективность метода варьирует в широких пределах. Успешные протоколы для *Aspergillus nidulans* или *Neurospora crassa* контрастируют с их полной неработоспособностью для *A. giganteus*. Этот факт указывает на фундаментальные ограничения электропорации для некоторых объектов и подтверждает необходимость рассматривать альтернативные методы трансформации, такие как опосредованная *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), при неудачных попытках оптимизации.

В свете активного внедрения технологий прецизионного редактирования генома (CRISPR-Cas9) надежность базовых методов доставки становится особенно актуальной. В связи с чем представляется перспективным дальнейшее изучение корреляции между структурно-физиологическими особенностями клеток мицелиальных грибов и оптимальными параметрами электропорации. Такие исследования позволят перейти от сугубо эмпирического подбора к рациональному конструированию протоколов, что откроет возможности для эффективной трансформации широкого круга биотехнологически ценных и немодельных микромицетов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Balabanova, L. A., Shkryl, Y. N., Slepchenko, L. V., Yugay, Y. A., Gorpenchenko, T. Y., Kirichuk, N. N., Khudyakova, Y. V., Bakunina, I. Yu., Podvolotskaya, A. B., Bulgakov, V. P., Seitkalieva, A. V., Son, O. M., & Tekutyeva, L. A. (2019). Development of host strains and vector system for an efficient genetic transformation of filamentous fungi. Plasmid, 101, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.11.002

2. Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays, 28(8), 799–808. https://doi.org/10.1002/bies.20441

3. Chakraborty, B. N., Patterson, N. A., & Kapoor, M. (1991). An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. Canadian Journal of Microbiology, 37(11), 858–863. https://doi.org/10.1139/m91-147

4. de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J., & Beijersbergen, A. G. (1998). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology, 16(9), 839–842. https://doi.org/10.1038/nbt0998-839

5. Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2001). Genetic Transformation of Yeast. BioTechniques, 30(4), 816–831. https://doi.org/10.2144/01304rv02

6. Haberl Meglič, S., & Kotnik, T. (2016). Electroporation-Based Applications in Biotechnology. B D. Miklavcic (Ред.), Handbook of Electroporation (сс. 1–17). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-

7. Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Peterka, M., & Miklavčič, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. Trends in Biotechnology, 33(8), 480–488. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.002

8. Kück, U., & Hoff, B. (2010). New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 86(1), 51–62. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2416-7

9. Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T., & Stahl, U. (2003). Comparison of different transformation methods for Aspergillus giganteus. Current Genetics, 43(5), 371–377. https://doi.org/10.1007/s00294-003-0406-3

10. Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015a). A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. PLOS ONE, 10(7), e0133085. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085

11. Ozeki, K., Kyoya (Fujii), F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., & Nunokawa, Y. (1994). Transformation of Intact Aspergillus niger by Electroporation. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58(12), 2224–2227. https://doi.org/10.1271/bbb.58.2224

12. Ruiz-Diez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. Journal of Applied Microbiology, 92(2), 189–195. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01516.x

13. Sánchez, O., & Aguirre, J. (1996). Efficient Transformation of Aspergillus nidulans by Electroporation of Germinated Conidia. Fungal Genetics Reports, 43(1), 48–51. https://doi.org/10.4148/1941-4765.1317

14. Ward, M., Kodama, K. H., & Wilson, L. J. (1989). Transformation ofAspergillus awamori andA. niger by electroporation. Experimental Mycology, 13(3), 289–293. https://doi.org/10.1016/0147-5975(89)90050-9

15. Weaver, J. C. (1995). Electroporation Theory Concepts and Mechanisms. B Methods in Molecular Biology (Humana Press Inc).