

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**METODOLOGIAS PARA A GERAÇÃO DE MUTANTES FUNCIONAIS EM
Metarhizium anisopliae: CRISPR/Cas9 e RNAi**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

THAIS CAMPOS DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**METODOLOGIAS PARA A GERAÇÃO DE MUTANTES FUNCIONAIS EM
Metarhizium anisopliae: CRISPR/Cas9 e RNAi**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

THAIS CAMPOS DE OLIVEIRA

DR. AUGUSTO SCHRANK, orientador

DR. CHARLEY CHRISTIAN STAATS, co-orientador

Porto Alegre, novembro de 2016.

Este trabalho foi desenvolvido no LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE FUNGOS FILAMENTOSOS, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O auxílio financeiro foi obtido da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato de Oliveira Resende

Departamento de Biologia Celular

UnB

Dra. Franceli Rodrigues Kulcheski

Laboratório de Genomas e Populações de Plantas

UFRGS

Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

UFRGS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Hilda Macedo Ferraz de Campos (*in memoriam*) com todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À banca examinadora, Dr. Renato de Oliveira Resende, Dra. Franceli Rodrigues Kulcheski e Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva pela disponibilidade de analisar este trabalho e pela oportunidade de realizar uma discussão científica.

À Dra. Ângela Junges pelos conhecimentos transmitidos que contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho e desenvolvimento acadêmico, por me ensinar a fazer uma pesquisa científica e pela amizade e paciência que foram muito importantes durante todo meu período na pós-graduação.

Ao meu orientador Dr. Augusto Schrank pela oportunidade de trabalhar no laboratório e a confiança depositada em mim, por incentivar o desenvolvimento do meu trabalho, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador, Dr. Charley C. Staats pelos ensinamentos durante todo o período e por me ensinar a buscar sempre a excelência durante o desenvolvimento de um trabalho científico.

À Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva pelo apoio, questionamentos, incentivo e ensinamentos que tanto contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Dra. Marilene Henning Vainstein por todo o incentivo e por ter acreditado e apoiado meu trabalho.

Aos colegas do laboratório 217 Alexia, Ângela, Nicolau e Paola pelo companheirismo, apoio e discussões científicas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 220 Alicia, Amanda, Ane, Eamim, Evandro, Francine, Julia, Nicole, Rafael, Solon, Vanessa e William pela amizade, apoio e por tornarem os dias mais alegres.

Aos secretários Sílvia e Luciano pelo trabalho dedicado ao bom funcionamento do programa de pós-graduação.

Aos meus pais Edson e Rosita por todo apoio e amor que sempre me deram.

À Aline por todo amor, companheirismo e por estar ao meu lado sempre. Obrigada por acreditar em mim e ter me abraçado junto com meus sonhos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> e biocontrole	15
1.2. Ciclo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
1.3. A importância das quitinases no processo de infecção de <i>M. anisopliae</i>	20
1.4. Avanços nos estudos dos genomas de <i>Metarhizium</i>	22
1.5. Sistema CRISPR/Cas9.....	26
1.5.1 CRISPR	26
1.5.2 A enzima Endonuclease Cas9	31
1.6. Formação complexo ternário Cas9-sgRNA-DNA	34
1.7. Mecanismos de Reparo do DNA	37
1.8. Desenvolvimento da metodologia CRISPR/Cas9 em fungos.....	40
1.9. Construção de organismos eucariotos transgênicos estáveis que expressam a endonuclease Cas9.....	44
2. OBJETIVOS.....	46
2.1. Objetivo Geral	46
2.2. Objetivos Específicos.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Material Biológico	47
3.2. Meios de Cultivo e Manutenção dos organismos	47
3.2.1. Meios de cultivo e manipulação para <i>M. anisopliae</i>	47
3.2.2. Meios de Cultivo e Manipulação para <i>E.coli</i>	48
3.3. Manipulação de Ácidos Nucléicos.....	48
3.4. Soluções e Enzimas Utilizadas	49

3.5. Suspensão de Conídios.....	49
3.6. Preparação e transformação de células quimiocompetentes	50
3.6.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
3.6.2. <i>E. coli</i>	50
3.7 Meios de cultivo e soluções utilizados para Agrotransformação	51
3.7.1 Meio de Indução – IM (Covert, 2000)	51
3.7.2 Sais MM 2,5 x	52
3.7.3 Solução MES 1 M.....	52
3.7.4 Solução de Acetoseríngona 10mM – AS.....	52
3.7.5 Meio top MM	52
3.7.6 Solução de Glifosinato de Amônio 40 mg. mL ⁻¹	53
3.8 Agrotransformação	53
3.9 Construção do vetor binário pPZP::NAT	54
3.11 Construção de <i>M. anisopliae</i> expressando Cas9.....	54
3.12 Construção do vetor binário pPZP::NAT::GFP	55
3.13 Construção do vetor binário pPZP::BAR::chiB1.....	56
3.14 Preparação dos oligonucleotídeos	57
3.16 Construções de vetores para realização da técnica de RNAi (Dual Promoter).....	59
3.16.1 Construção do dual-promoter.....	59
4. RESULTADOS	62
4.1. Construção dos RNAs guias (sgRNAs).....	62
4.2. Construção de transformantes em <i>M. anisopliae</i> que expressam constitutivamente a endonuclease Cas9.....	67
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES.....	76
7. PERSPECTIVAS	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Δ (gene)	Linhagem com Deleção do Gene Subsequente
Aa	Aminoácido
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation</i> (Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
BD	Borda Direita do Vetor pPZP
BE	Borda Esquerda do Vetor pPZP
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool (protein)
Cas	<i>CRISPR associated protein</i> (Proteína Associada a CRISPR)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)
crRNAs	CRISPR RNAs
C-terminal	Carboxi-terminal
dNTP	Dideoxynucleotídeo
EDTA	Sal Dissódico do Ácido Etilenodiaminotetracético
g	Grama, força gravitacional
GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
gRNA	<i>guide RNA</i> (RNA guia)
IPTG	Isopropil α -D-tiogalactosídeo
L	Litro

LB	Meio Luria-Bertani
mg	Miligrama
h	hora
kb	quilobase
Kda	quilodáton
M	Molar
MC	Meio Cove
MCC	Meio Cove Completo
MES	Ácido-N-morfolino-etanosulfônico
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
N-terminal	Amino-terminal
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i> (Motivo Adjacente Protoespaçador)
Pb	Par de base
pH	Potencial Hidrogeniônico
p/v	Peso por volume
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RNA _m	RNA mensageiro

SDS	Dodecilsulfato de Sódio
tracRNA	RNA transativador
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo Selvagem)
µg	Micrograma
µg/µL	Micrograma por Microlitro
µg/ml	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil-α-D-galactosideo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de aplicações da metodologia de edição genômica CRISPR.....	30
Tabela 2. Eficiência das construções com diferentes promotores desenvolvidas no fungo <i>Pyricularia oryzae</i>	43
Tabela 3. Oligonucleotídeos para construção do RNA guia para nocaute do gene <i>gfp</i> e <i>ChiMaB1</i>	60
Tabela 4. <i>Primers</i> para amplificar gene <i>sur</i> , <i>cassete</i> de <i>nat</i> , <i>Cas9</i> e GFP.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	19
Figura 2. Relação entre diferentes espécies de <i>Metarhizium</i> e a sua amplitude de hospedeiros.....	25
Figura 3. Representação esquemática das sequências polipeptídicas e da organização dos domínios da endonuclease Cas9 de <i>S. pyogenes</i>	32
Figura 4. Estrutura Cristalina de Cas9.....	33
Figura 5. Fases que compõem o sistema CRISPR/Cas9.....	36
Figura 6. Via "clássica" de Recombinação não Homóloga.....	39
Figura 7. Recombinação Homóloga.....	40
Figura 8. Sequências alvos do gene <i>gfp</i>	62
Figura 9. Construção do plasmídeo pPZP::NAT.....	63
Figura 10. Representação esquemática da construção do RNA guia.....	64
Figura 11. Confirmação da obtenção de RNA guia.....	65
Figura 12. Sequências alvo do gene <i>chimaB1</i>	66
Figura 13. Representação esquemática do plasmídeo pPZP::SUR::Cas9.....	68
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose indicando a confirmação da inserção de pPZP::SUR::Cas9 no genoma de <i>M. anisopliae</i>	69
Figura 15. Representação esquemática do plasmídeo pPZP::SUR::DP::GFP.....	70
Figura 16. Silenciamento de <i>gfp</i> em <i>M. anisopliae</i> utilizando RNAi.....	71

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico usado como agente de controle biológico devido a sua capacidade de infectar mais de 300 espécies de artrópodes. É um organismo muito utilizado como modelo de estudo de interação patógeno-hospedeiro sendo um dos focos de estudo a descrição de genes envolvidos no processo de infecção pela construção de mutantes funcionais. Esse processo pode ser facilitado pelo uso da metodologia do sistema CRISPR/Cas9 para manipulação genômica, que foi derivada do sistema imune adaptativo de procariotos que vem demonstrando potencial tecnológico em edição genética de eucariotos pela incorporação de protoespaçadores (sequências oriundas de bacteriófagos ou plasmídeos invasores) em seus *loci*. CRISPR e a proteína associada à CRISPR (Cas) formam uma endonuclease guiada (Cas9) a qual tem como alvo o sítio específico do DNA invasor, provocando a clivagem da dupla fita do DNA alvo em uma sequência específica. Muitos estudos realizados pela edição gênica têm sido desenvolvidos em diferentes organismos por meio da sua adaptação em eucariotos. Com o objetivo de melhorar a eficiência na geração de mutantes em *M. anisopliae*, o sistema CRISPR/Cas9 e um sistema de RNAi foram usados a fim de desenvolver novas ferramentas. As metodologias CRISPR/Cas9 e RNAi foram desenvolvidas para ter como alvo o gene reporter *gfp* da linhagem *M. anisopliae* E6 GFP+. Para realizar a edição genômica em *M. anisopliae*, foram gerados, por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, fungos transgênicos estáveis que expressam a endonuclease Cas9 códon-otimizada para fungos filamentosos. Oligonucleotídeos foram projetados para ter como alvo quatro regiões diferentes na sequência do gene *gfp* com o auxílio da ferramenta *CRISPR RGEN tool* com o objetivo de evitar o pareamento aleatório. O vetor binário utilizado foi o plasmídeo pPZP com o promotor U6-1 para a expressão do RNA guia. Para a metodologia de RNA interferente foi reproduzido o *knockdown* do gene repórter *gfp* por meio de agrotransformação do vetor pPZP::SUR::DP que contém um sistema de dois promotores em direções opostas (*dual promoter* Pdgp e Ptrpc) e um *cassette* de expressão com o gene marcador *sur* (resistência a sulfoniluréia) para a seleção dos transformantes. Foram

clonados 420 pares de bases do gene *gfp* entre os promotores gerando o plasmídeo pPZP::SUR::DP::GFP. O desenvolvimento dessas duas metodologias se mostra viável para análise funcional de genes de *M. anisopliae*.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is an entomopathogenic fungus used as a biological control agent due to its capacity to infect more than three hundred species of arthropods. It is broadly used as a model to the development of host-pathogen interaction studies, including the study of the description of the involved genes in the infection process by the construction of functional mutants. This process may be facilitated by the use of the CRISPR/Cas9 methodology to genomic manipulation, which was derived from the immune adaptive system in prokaryotes and has demonstrated technological potential in genetic of eukaryotes edition through the activity of incorporation of protospacers (sequences arising from bacteriophages or plasmids invaders) in their *loci*. CRISPR and CRISPR associated protein (Cas) code a guided nuclease (Cas9) that targets a specific site of the invading DNA leading to breakage of double-stranded target DNA in a specific sequence. Multiple gene editing studies have been developed in different organisms including its adaptation to eukaryotes. In order to improve the efficiency of the generation of mutants in *M. anisopliae*, CRISPR/Cas9 system and a RNAi system were used in order to develop new tools. Both CRISPR/Cas9 and RNAi methodologies were developed having as a target the *gfp* gene from *M. anisopliae* E6 GFP+ strain. To perform genome editing in *M. anisopliae*, stable transgenic fungi that express fungal codon-optimized Cas9 were generated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Oligonucleotides were designed to target four different regions along the *gfp* gene by using the CRISPR RGEN tool in order to avoid off-targets. The binary vector was the pPZP plasmid with the U6-1 to RNAi expression. For RNAi analysis, gene knockdown were developed by agrotransformation with a suitable plasmid (pPZP::SUR::DP) containing dual promoters with opposite directions (Pdgp and Ptrpc) and a cassette for the expression of the selective marker (gene *sur*, conferring sulfonyleurea resistance) for the selection of transformants. The 420 bp *gfp* sequence was cloned between promoters, obtaining thus the plasmid pPZP::SUR::DP::GFP. The development of these two techniques proves itself viable for functional analysis of *M. anisopliae* genes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Metarhizium anisopliae* e biocontrole

O controle de pragas na agricultura e na pecuária atualmente depende principalmente da aplicação de compostos químicos. Tais compostos representam riscos à saúde humana e causam impacto ambiental indesejável, além de induzirem o surgimento de pragas resistentes. Recentemente, esforços têm sido realizados no sentido de apresentar alternativas ao controle químico dessas pragas, sendo a principal a utilização do controle biológico baseado no uso de microrganismos controladores. Os fungos apresentam um grande potencial e eficácia comprovados na sua aplicação como um dos principais microrganismos para uso em controle biológico (Quesada-Moraga *et al.*, 2004).

Metarhizium é um fungo ascomiceto que foi isolado de insetos mortos (*Anisopliae austriaca*) na Ucrânia em 1879 por Metschnikoff e foi o primeiro fungo produzido em larga escala e utilizado no combate de insetos pragas (controle biológico) (Steinhaus, 1975). É um fungo filamentosso entomopatogênico cosmopolita utilizado como agente de controle biológico devido à sua capacidade de infectar mais de trezentas de espécies de artrópodes. Por esta razão, *M. anisopliae* tem importância econômica como uma alternativa de biopesticida ambientalmente favorável e se assemelha a outros fungos entomopatogênicos por invadir seu hospedeiro diretamente através do exoesqueleto ou cutícula de artrópodes (Clarkson *et al.*, 1996).

Morfologicamente, apresenta-se na forma filamentososa com micélio hialino e septado, possuindo conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas. São conhecidas duas formas de reprodução: a reprodução assexuada, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexual, que envolve os fenômenos de heterocariose e de recombinação mitótica (Driver *et al.*, 2000; Arruda, 2005). O desenvolvimento

vegetativo de *Metarhizium* ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura ideal entre 24 e 30°C e pH ótimo de 6,9 (Driver *et al.*, 2000; Arruda, 2005). No entanto, existe tolerância a um intervalo de pH relativamente amplo (2,0 a 8,5). Os requisitos nutricionais do fungo são poucos, podendo utilizar como fonte de carbono o amido, a glicose, o glicerol, a maltose, a sacarose e a quitina (Alves, 1998).

Os principais programas de controle de pragas envolvendo *M. anisopliae* no Brasil são o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva frimbriolata*); das cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), do cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*), do cupim da cana-de-açúcar (*Heterotermes sp.*), da broca da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e da broca dos citros (*Diploschema rotundicolle*). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas, como os vetores da doença de Chagas (*Triatoma infestans*), da malária (*Anopheles gambiae*) e da filariose (*Culex quinquefasciatus*) (Juaréz *et al.*, 2000; Scholte *et al.*, 2003; Blaford *et al.*, 2005).

Diversos autores têm relatado a eficácia da utilização de *M. anisopliae* no controle de ácaros, principalmente para carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* (Samish & Rehacek, 1999; Frazzon *et al.*, 2000; Onofre *et al.*, 2001; Da Costa *et al.*, 2001;; Webster *et al.*, 2015) e *Ixodes* (Benjamin *et al.*, 2002), e para ácaros causadores de sarnas dos gêneros *Psoroptes* (Smith *et al.*, 2000; Brooks & Wall, 2001) e *Varroa* (Kanga *et al.*, 2002; Kanga *et al.*, 2003).

M. anisopliae é mundialmente utilizado como micoinseticida, principalmente como agente de controle inundativo (Zimmermann, 2007) e sua capacidade de infectar uma ampla diversidade de hospedeiros artrópodes dá-se por um mecanismo de infecção complexo e eficiente (Clarkson & Charnley, 1996; Arruda *et al.*, 2005; Schrank & Vainstein, 2010).

Uma estratégia comum utilizada por *M. anisopliae* para a infecção de seus hospedeiros é a transposição da cutícula, que é direta e iniciada pela deposição de

partículas infectivas na cutícula dos hospedeiros. Um dos pontos cruciais no sucesso da infecção é a secreção de uma série de enzimas para a hidrólise dos componentes majoritários da cutícula dos artrópodes, como ceras, proteínas e quitina (Santi *et al.*, 2010).

A cutícula dos artrópodes é a principal barreira contra infecção dos artrópodes por apresenta um conteúdo químico heterogêneo, sendo formada por duas camadas: a procutícula que compreende a maior parte da cutícula tendo sua composição basicamente formada por proteínas e quitina, ou seja, parte onde estão localizados os sítios específicos onde operam as proteases e as quitinases dos fungos entomopatogênicos (Clarkson & Chanrley, 1996) e a camada externa denominada epicutícula, que formam os substratos próprios para ação das lipases por ter como composição principal os lipídios. Esta camada é composta por duas camadas diferentes: a camada mais externa, orientada de ceras formada exclusivamente por lipídios e a camada denominada cuticulina que é composta por polifenóis, lipídios polimerizados e lipoproteínas (Hutchinson, 2005; Meyer, 2005).

1.2. Ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae*

Devido à presença de conídios que possuem coloração verde sobre o cadáver dos insetos, o nome dado pela infecção fúngica em artrópodes induzida por *Metarhizium* é “*Green Muscardine*” (Roberts & St. Leger, 2004). Esse fungo infecta seu hospedeiro via penetração direta através da cutícula, e durante o processo infeccioso tem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares durante seu ciclo de vida, e por isso é um organismo que apresenta polimorfismo o que provavelmente denota grande importância para superar o mecanismo de defesa do hospedeiro durante a fase de colonização (Bechara *et al.*, 2011).

O processo de infecção (Figura 1) pode ser didaticamente dividido nas seguintes fases: aderência de conídios na cutícula do hospedeiro por interações

hidrofóbicas; germinação e desenvolvimento do conídio; diferenciação do tubo germinativo em apressório (estrutura de penetração que utiliza força mecânica gerada a partir da pressão de turgor e também a secreção de enzimas hidrolíticas para permitir a dissolução da carapaça do hospedeiro); penetração da cutícula; diferenciação das hifas em blastosporos (células unicelulares leveduriformes) na hemolinfa, colonização e disseminação (Callejas-Negrete *et al.*, 2014); Após exaurir as fontes de carbono disponíveis, ocorre a extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro e finalmente a formação de conidióforos e produção de conídios (Schrank & Vainstein, 2010).

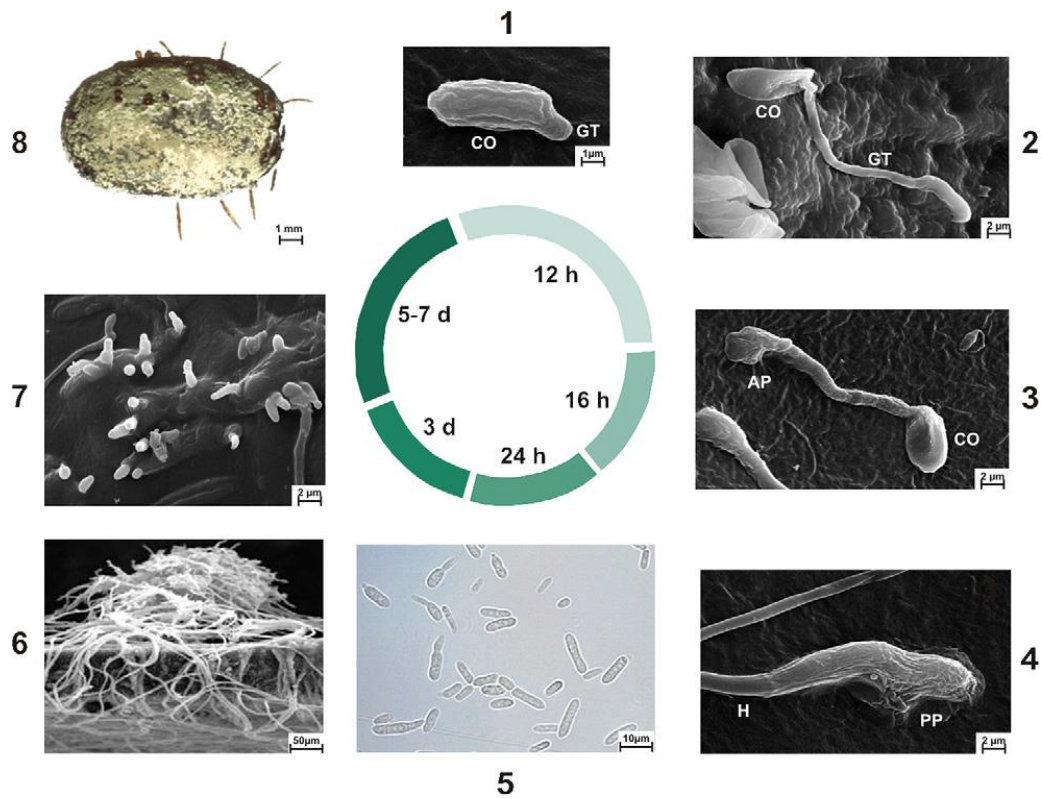


Figura 1. Estágios de infecção de *Metarhizium anisopliae*. O evento do processo de infecção foi realizado utilizando carrapato como hospedeiro. (1) Conídio adere à cutícula do hospedeiro; (2) Germinação do conídio; (3) Tubo germinativo e a diferenciação em apressório; (4) Penetração da cutícula; (5) Diferenciação hifas em blastosporos (Microscopia óptica); (6) A colonização no hospedeiro; (7) Extrusão de hifas (8) Foto de conidióforos e produção de conídios no cadáver de carrapato. CO (conídio); GT (*germ tube* ou tubo germinativo); AP (apressório); H (hifas); h (horas); d (dias); (SEM) *scanning electron microscopy*. (Adaptado de Schrank A, Vainstein MH, 2010)

1.3. A importância das quitinases no processo de infecção de *M. anisopliae*

O principal constituinte do exoesqueleto dos invertebrados e da parede celular dos fungos são as quitinas que são constituídas de um homodímero linear insolúvel composto de subunidades do amino açúcar acetilado *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos por ligações β -1,4. (Adams, 2004; Duo-Chuan, 2006).

A quitina está dividida em três tipos: α -quitina, β -quitina e γ -quitina que são definidas pelo arranjo das cadeias de *N*-acetilglicosamina a qual α -quitina apresenta configuração antiparalela, β -quitina contém um arranjo paralelo e a γ -quitina que organiza-se como duas cadeias paralelas sendo intercaladas por uma cadeia em direção oposta (Dahiya *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2009). Este polímero constitui uma barreira primordial frente a patógenos e a fatores de estresse incluindo dessecação e alta pressão osmótica (Bowman & Free, 2006).

Para a liberação de oligômeros e monômeros de *N*-acetilglicosamina é necessária a hidrólise desse polímero que ocorre através da ação sinérgica e consecutiva do sistema quitinolítico (Patil *et al.*, 2000). As enzimas responsáveis por hidrolisar as ligações β -1,4 presentes nos polímeros de quitina são as quitinases que atuam promovendo a formação de oligômeros e monômeros de (GlcNAc) os quais são utilizados como fonte de nutrição ou para o remodelamento de parede e síntese de quitina.

As quitinases podem ser classificadas como exoquitinases as quais clivam os polímeros partir de sua extremidade não redutora, tendo como produto dímeros de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc)₂ e as endoquitinases que por sua vez, clivam os polímeros em sítios aleatórios no interior da cadeia liberando dessa maneira os quito-oligômeros (Duo-Chuan, 2006; Van Aalten *et al.*, 2001).

Junges *et al.* (2014) identificaram 23 quitinases putativas no genoma de *M. anisopliae* linhagem E6. Posteriormente, Gao *et al.* (2011) demonstraram a

identificação de 30 quitinases de *M. anisopliae* linhagem ASERF23 e 21 quitinases putativas no genoma de *M. acridum*.

Antes do sequenciamento do genoma de *M. anisopliae*, a atividade de quitinase de *M. anisopliae* em sobrenadantes de cultura que mimetizam infecção já tinha sido descrita pelo grupo por ST Leger *et al.* (1986). O mesmo grupo, em 1991 purificou duas quitinases que continham quitina como único substrato: uma com massa molecular de 33 kDa que possui atividade de endoquitinase e outra de 110 kDa que por sua vez apresentava atividade de quitobiase (ST Leger *et al.*, 1991).

Dando seguimento aos trabalhos sobre as quitinases, foram identificadas isoformas em *M. anisopliae*. Uma dessas proteínas apresenta massa molecular de 43,5 kDa que, além de ser imunolocalizada em estágio tardio de penetração, ou seja, posterior à secreção de protease, demonstrou também alta identidade com a proteína de 42kDa de *Trichoderma harzianum* (ST Leger *et al.*, 1996). Este gene referente a uma quitinase de 42 kDa foi clonado e caracterizado por Bogo *et al.* (1998) sendo nomeado como *chit1* por de análises de proteínas recombinantes. A CHIT1 apresentou atividade de endoquitinase (Baratto *et al.*, 2003)

Nosso grupo purificou uma proteína de 30 kDa que possui capacidade de atuar como endo e exoquitinase. Essa proteína codificada pelo gene *chi3* foi denominada de CHIT30 (Pinto *et al.*, 1997; da Silva *et al.*, 2004).

Posteriormente, foi realizada a caracterização do gene *chi2* (*chimaB1*), que codifica uma endoquitinase de 42kDa. Neste trabalho, foi proposto que a quitinase CHI2 está envolvida no processo de infecção de artrópodes. Também foi avaliada a expressão de CHI2 em diferentes meios de cultivo e identificou-se a ocorrência de um processo diferencial de *splicing* deste gene, o gene produziria duas espécies de mRNA. Para comprovar o processamento diferencial de *chi2*, foi demonstrado a síntese de duas proteínas a partir deste transcrito. Ambas possuíam domínio de ligação à quitina. A CHI2(1) apresenta região altamente hidrofóbica, podendo estar relacionada com GPI e, portanto, interagir com a membrana ou parede celular e a

CHI2(2) apresenta domínio de ligação à celulose, comum a hidrolases da família 18 (Boldo *et al.*, 2009).

A caracterização de genes de quitinases bem como genes de outras enzimas hidrolíticas é um importante passo para o entendimento global do sistema quitinolítico dos fungos entomopatogênicos.

1.4. Avanços nos estudos dos genomas de *Metarhizium*

Com o rápido avanço da tecnologia genômica, houve uma grande evolução na compreensão da biologia de *Metarhizium* spp. com base no sequenciamento de várias espécies (Gao *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2014; Pattemore *et al.*, 2014; Staats *et al.*, 2014; Shang *et al.*, 2016), bem como de outros fungos como *Beauveria bassiana* (Xiao *et al.*, 2012), *Cordyceps militaris* (Zheng *et al.*, 2011) e *Ophiocordyceps sinensis* (Li *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Análises filogenéticas a partir da disponibilização desses genomas sugerem que os ancestrais de muitos desses fungos eram organismos endofíticos (Spatafora *et al.*, 2007) ou patógenos de plantas (Gao *et al.*, 2011), sendo que a entomopatogenicidade foi uma característica adquirida (Wang *et al.*, 2016). Esses fungos ocupam uma ampla gama de habitats e hospedeiros e seus genomas têm fornecido informações importantes sobre a evolução das características relacionadas com a virulência. Por exemplo, foram identificados genes específicos que codificam lipases que apresentam homologia com fatores de virulência envolvidos na aquisição de nutrientes e no rompimento da membrana do hospedeiro em fungos fitopatogênicos (Malagočka *et al.*, 2015).

As análises genômicas também contribuíram para o estudo de famílias de proteínas e estruturas genômicas associadas à heterogeneidade ecológica e nutricional, para a evolução do genoma e para a diversificação da gama de hospedeiros (Wang *et al.*, 2016). Recentemente, estudos genéticos vêm elucidando os mecanismos e a importância de uma porção destes metabólitos para a virulência, por

exemplo o peptídeo não ribossomal M-NPL12 de *Metarhizium* que é ortólogo do peptídeo ChNPS12 de *C. heterostrophus* e também do peptídeo tmpL de *A. fumigatus* (Kim *et al.*, 2009; Bushley & Turgeon, 2010) os quais são caracterizados pela presença de domínios A e T seguidos de domínio transmembrana da enzima ferredoxina redutase. Essa proteína foi caracterizada em *A. fumigatus* e *Alternaria brassicicola* pela deleção gênica dessa região, a qual apresentou conidiogênese anormal, envelhecimento acelerado, hipersensibilidade ao estresse oxidativo e virulência reduzida (Kim *et al.*, 2009). Além disso, estudos sobre o metabolismo secundário em *Metarhizium* tem sugerido a participação de metabólitos menos estudados (Sbaraini *et al.*, 2016)

Recursos genômicos vêm auxiliando também na investigação sobre a transição evolutiva, por exemplo, a transição de patógenos de plantas ou endofíticos a patógenos de insetos. Considera-se que a proximidade física do ancestral de *Metarhizium majus* para com insetos hemípteros sugadores provavelmente facilitou a transição deste hospedeiro particular para a entomopatogenicidade (Hu *et al.*, 2014). No entanto, estudos genômicos sobre a especialização e a generalização de hospedeiros, demonstraram que a generalização está associada com a expansão das famílias proteicas, a perda de mecanismo de defesa, reestruturação do genoma, transferência horizontal e perda de sexualidade (Hu *et al.*, 2014). O aumento da plasticidade fenotípica de fungos mais generalistas como *M. robertsii* e *M. anisopliae* estão relacionadas com mudanças climáticas que também foram fundamentais para a diversificação maciça de plantas com flores, árvores e insetos associados ao longo da evolução (Hay, Soeding, Deconto, & Wold, 2002; Hu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016) (Figura 2).

Portanto, o sequenciamento de espécies de fungos entomopatogênicos favoreceu a compreensão sobre evolução e patogenicidade por meio da análise comparativa de espécies identificando mecanismos de virulência especializados permitindo a identificação mais rápida de genes que codificam moléculas

biologicamente ativas e genes responsáveis pela interação entre fungos, plantas e insetos (Wang *et al.*, 2016).

Pela análise comparativa do genoma de *M. anisopliae* E6 realizada por Staats *et al.* (2014) foi observado que *M. anisopliae* apresenta 10.817 genes que codificam proteínas sendo que 3.820 dessas são proteínas hipotéticas (35,3%), 690 genes codificam proteínas exclusivas (6,4%) e 2.396 (22,1%) apresentaram correspondência com proteínas do banco de dados PHI. Dentre as proteínas extracelulares previstas, foram identificadas 80 proteínas glicosilfosfatidilinositol-ancoradas (GPI-Ps) que apresentam um papel potencial no processo infeccioso. Foi observado também que *M. anisopliae* e *M. robertsii* apresentam número similar de proteínas exclusivas e como esperado, *M. anisopliae* compartilha mais genes com *M. robertsii* (1.878) que com *M. acridum* (352). Nesse mesmo trabalho, ensaios que reproduzem condições de infecção mostraram por meio de transcriptoma que *M. anisopliae* apresenta um padrão de expressão diferente em relação ao seu padrão de expressão durante o crescimento em condições laboratoriais. Assim sendo, estas pesquisas vêm direcionando o desenvolvimento de futuros estudos funcionais de genes específicos para futuras elucidações de seus papéis precisos.

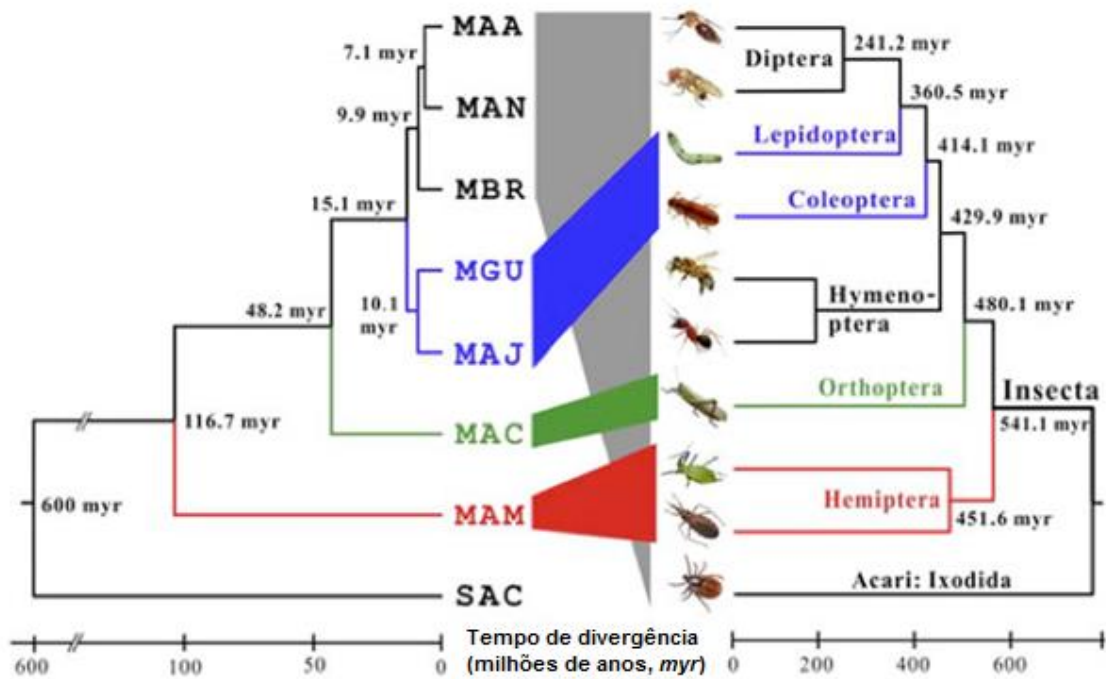


Figura 2. Relação entre diferentes espécies de *Metarhizium* e a sua amplitude de hospedeiros. A esquerda está representada árvore filogenética de diferentes espécies *Metarhizium*, sendo. MAA – *M. album*, MAN- *M. anisopliae*, MBR- *M. brunneum*, MGU – *M. guizhouense* , MAJ- *M. majus* , MAC – *M. acridum*, MAM – *M. album* , SAC – *Saccharomyces cerevisiae* . À direita estão representadas as diferentes famílias de hospedeiros artrópodes. Trajetória genômica de especialização fungo-patógena (Modificada a partir de Wang *et al.*, 2016).

1.5. Sistema CRISPR/Cas9

1.5.1 CRISPR

O sistema CRISPR/Cas9, originalmente identificado como um sistema imune adaptativo em bactérias (~40%) e archaea (~90%) contra fagos e plasmídeos (Barrangou *et al.*, 2007), é utilizado para a realização de edição genética em procariotos e eucariotos (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Doudna e Charpentier, 2014; Nissim *et al.*, 2014; Sander e Joung, 2014).

O acrônimo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ou seja, Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas mostrou-se como uma eficiente ferramenta para edições gênicas específicas no genoma. Um RNA guia ligado à uma endonuclease Cas9 direciona a clivagem do DNA alvo por meio do pareamento de 20 nucleotídeos que compõem o RNA guia (Barrangou, 2012; Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013). Este sistema de edição gênica é uma ferramenta específica e simples de desenhar e construir, bem como sua aplicação em diferentes organismos e tipos celulares (Tabela 1). (Chang *et al.* 2013; Cong *et al.* 2013; Gratz *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2013; Jao *et al.* 2013; Mali *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013)

Os *loci* CRISPR consistem tipicamente em várias repetições diretas separadas por extensões de sequências variáveis chamadas espaçadores, que correspondem principalmente a segmentos de sequências virais e plasmídicas capturadas e são frequentemente adjacentes a genes *cas* (*CRISPR-associated*) (Horvath *et al.*, 2010) os quais codificam uma família de proteínas que apresentam domínios funcionais típicos de nucleases, helicases, polimerases e proteínas de ligação a polinucleotídeos (Hara *et al.*, 2015). A maioria das sequências repetidas são parcialmente palindrômicas, podendo formar estruturas secundárias estáveis e altamente conservadas (Kunin *et al.*, 2007).

Os espaçadores são sequências de DNA exógeno (Bolotan *et al.*, 2005) as quais são inseridas no genoma do hospedeiro pela ação das proteínas Cas 1 e 2 (Nuñez *et al.*, 2014). A aquisição dessas sequências atribui a atividade de imunidade contra DNA exógeno (Hsu *et al.*, 2014).

Embora a descoberta inicial da estrutura CRISPR tenha sido feita em *Escherichia coli* em 1987 como um *locus* distinto que apresentava sequências repetidas intercaladas por sequências espaçadoras diferentes (Ishino *et al.*, 1987) o acrônimo CRISPR foi utilizado pela primeira vez em 2002, quando essa estrutura foi observada no genoma de outras bactérias, como por exemplo *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus pyogenes* (Jansen *et al.*, 2002).

Após o sequenciamento de *Streptococcus thermophilus*, foi revelada a presença de um *locus* de CRISPR distinto, no entanto este segmento era similar ao sistema observado anteriormente em outros organismos. Foram identificados também quatro genes adjacentes aos *loci* CRISPR em diferentes bactérias, sugerindo uma relação funcional desta sequência. Estes genes foram designados de *cas1* a *cas4* (Bolotan *et al.*, 2005)

A primeira demonstração experimental do sistema CRISPR foi publicada em 2007 pelo grupo de Philippe Horvath, quando foi demonstrado que de fato o Sistema CRISPR está envolvido com o sistema adaptativo bacteriano. Durante uma pesquisa desenvolvida na empresa DuPont *Nutrition and Health*, onde é amplamente utilizada a bactéria *S. thermophilus* para a produção de iogurtes e queijos, foram integradas novas sequências de DNA de fagos específicos na sequência de CRISPR com o objetivo de criar uma barreira contra o ataque de fagos. Este trabalho definiu a organização do sistema CRISPR/Cas9, pois foi observada a interação das proteínas Cas no sistema, sendo identificadas como responsáveis pela aquisição dos espaçadores, bem como a atividade de nuclease (Barrangou *et al.*, 2007).

Brouns *et al.*, (2008) descreveram detalhadamente os mecanismos moleculares envolvidos na interação do sistema CRISPR/Cas como, por exemplo, a

incorporação do DNA exógeno. Por meio dessa pesquisa desenvolvida em *E. coli* descobriu-se que esses pequenos espaçadores derivados de fagos são transcritos em pequenos RNAs, os quais foram denominados como CRISPR RNAs (crRNAs), que posicionam a proteína Cas na sequência de DNA alvo (Brouns *et al.*, 2008).

Marraffini & Sontheimer, (2008), demonstraram que a função de CRISPR não estaria relacionada somente ao sistema imune de bactérias, mas também teria como função a prevenção de “transferência horizontal” de material genético, bem como a manutenção da identidade genética de alguns procaríotos como um sistema de restrição de modificação. À vista desse fato, iniciou-se uma pesquisa da utilização do sistema como uma ferramenta para bloqueio da disseminação de genes de resistência a antibióticos e fatores de virulência de agentes patogênicos bacterianos (Marraffini & Sontheimer, 2008).

Em 2010 verificou-se que o sistema CRISPR/Cas9 apresenta um mecanismo molecular que atua provocando uma dupla clivagem no DNA em uma posição precisa, ou seja, quatro nucleotídeos a montante da sequência PAM e confirmou-se que a proteína Cas9 seria a única proteína responsável pela clivagem do complexo quando ligada à sequência crRNAs (Garneau *et al.*, 2010).

Por meio do sequenciamento dos RNAs de *S. pyogenes* foi descoberta uma segunda sequência de RNA envolvida no complexo além de crRNA. Esta sequência foi designada *trans-activating CRISPR RNA* (tracrRNA). Foi evidenciado que tracrRNA forma um duplex com crRNA e este duplex quando complexado com Cas9, tem como atividade guiar a nucleasse ao DNA-alvo (Deltcheva *et al.*, 2011)

A caracterização bioquímica da clivagem do sistema deu-se em 2012. A sequência PAM e o local de clivagem foram investigados e, usando mutações pontuais, foi constatado que o domínio RuvC da nucleasse Cas9 cliva a sequência não-complementar e o domínio HNH seria responsável pela clivagem da sequência complementar, foi observado também que a sequência de 20 nucleotídeos de crRNA era suficiente para uma clivagem eficiente. Nesta pesquisa foi apurado que o sistema poderia ser direcionado a um alvo de escolha através de alterações na sequência

crRNA (Gasiunas *et al.*, 2012). Simultaneamente, na Universidade da Califórnia, Charpentier e Jennifer Doudna reportaram que tracrRNA poderia estar ligada à crRNA, as quais seriam responsáveis por guiar a endonuclease (Jinek *et al.*, 2012).

Em 2013 (Cong *et al.*, 2013) foi demonstrada pela primeira vez a adaptação do sistema CRISPR/Cas9 em eucariotos, quando a endonuclease Cas9 foi códon-otimizada para utilização em células de mamíferos. Foram desenvolvidos dois ortólogos da proteína Cas9 de *S. thermophiles* e *S. pyogenes*, pelos quais foi demonstrada a clivagem guiada pelo sistema tanto em células humanas quanto em células de camundongos.

A metodologia de silenciamento pós-transcricional por meio de RNAi é comumente utilizada para a realização de estudos funcionais de genes específicos (Kassner *et al.*, 2014; Mohr *et al.*, 2014). Esta metodologia é utilizada em muitos eucariotos, como por exemplo humanos (Dykxhoorn *et al.*, 2005), plantas e insetos (Merkling *et al.*, 2013).

A via de silenciamento mediada por RNAi é desencadeada pela presença de dsRNA ou pré-microRNA, que é clivado por *Dicer* (uma enzima RNase II) formando os MicroRNAs (miRNA) ou pequeno RNAs interferente (siRNA). A cadeia anti-senso do miRNA ou siRNA duplex é carregada no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que é utilizada como um guia para identificar os RNAs mensageiros alvo complementares (Rao *et al.*, 2009).

Uma das alternativas para empregar a metodologia de silenciamento pós transcricional mediada por RNAi é a metodologia baseada em *dual promoter*. Um sistema de promotor duplo oposto, neste sistema a fita senso e anti-senso são transcritas independentemente formando uma dupla fita de RNA (DsRNA) (Rappleye *et al.*, 2004).

Tabela 1. Exemplos de aplicações da metodologia de edição genômica CRISPR.

Organismo	Mutação	Publicação
Human	Knockin events and correction of the <i>F508</i> del allele (Intestinal stem cells of Cystic Fibrosis patients)	Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., ... & Nieuwenhuis, E. E. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. <i>Cell stem cell</i> , 13(6), 653-658.
	<i>AKR1B1</i> knockout (endometrial cells)	Tremblay, J. P., & Fortier, M. A. (2014). Generation of human endometrial knockout cell lines with the CRISPR/Cas9 system confirms the prostaglandin F2a synthase activity of aldoketoreductase 1B1.
	<i>NF1</i> , <i>MED12</i> , <i>NF2</i> , <i>CUL3</i> , <i>TADA2B</i> , and <i>TADA1</i> knockout (melanoma cells)	Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., ... & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. <i>Science</i> , 343(6166), 84-87.
<i>Mus musculus</i>	Simultaneous disruption of five genes (<i>Tet1</i> , <i>2</i> , <i>3</i> , <i>Sry</i> , <i>Uty</i> - 8 alleles)	Gasiunas, G., & Siksnys, V. (2013). RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing?. <i>Trends in microbiology</i> , 21(11), 562-567.
	Mutations of the <i>Crygc</i> gene	Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., ... & Li, J. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. <i>Cell stem cell</i> , 13(6), 659-662.
	<i>Prkdc</i> , <i>Foxn1</i> knockout	Sung, Y. H., Kim, J. M., Kim, H. T., Lee, J., Jeon, J., Jin, Y., ... & Lee, H. W. (2014). Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. <i>Genome research</i> , 24(1), 125-131.
<i>Rattus Rattus</i>	Disruption of four genes (<i>ApoE</i> , <i>B2m</i> , <i>Prf1</i> , and <i>Prkdc</i>)	Ma, Y., Shen, B., Zhang, X., Lu, Y., Chen, W., Ma, J., ... & Zhang, L. (2014). Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9. <i>PLoS One</i> , 9(3), e89413.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>LYP1</i> , <i>CAN1</i> knockout	DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using CRISPR-Cas systems. <i>Nucleic acids research</i> , gkt135.
<i>Oryza sativa</i> and <i>Triticum aestivum</i> (Plants)	Indels in the targeted <i>OsPDS</i> , <i>OsBADH2</i> , <i>Os02g23823</i> and <i>OsMPK2</i> rice genes and one wheat gene (TaMLO)	Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., ... & Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. <i>Nature biotechnology</i> , 31(8), 686-688.
<i>Drosophila</i>	Disruption of <i>yellow</i> gene	Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., ... & O'Connor-Giles, K. M. (2013). Genome engineering of <i>Drosophila</i> with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. <i>Genetics</i> , 194(4), 1029-1035.
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>rop18</i> knockout	Shen, B., Brown, K. M., Lee, T. D., & Sibley, L. D. (2014). Efficient gene disruption in diverse strains of <i>Toxoplasma gondii</i> using CRISPR/CAS9. <i>MBio</i> , 5(3), e01114-14.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Loss-of-function mutations in <i>ben-1</i>	Chen, C., Fenk, L. A., & de Bono, M. (2013). Efficient genome editing in <i>Caenorhabditis elegans</i> by CRISPR-targeted homologous recombination. <i>Nucleic acids research</i> , 41(20), e193-e193.
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	<i>tyr</i> , <i>gol</i> , <i>mitf</i> , <i>ddx19</i> knockout	Jao, L. E., Wente, S. R., & Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences</i> , 110(34), 13904-13909.
<i>Daphnia magna</i>	<i>Dma-ey</i> gene disruption	Nakanishi, T., Kato, Y., Matsuura, T., & Watanabe, H. (2014). CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in <i>Daphnia magna</i> . <i>PLoS One</i> , 9(5), e98363.
iPSCs from β -thalassemia patients	Correction of the HBB mutations	Xie, F., Ye, L., Chang, J. C., Beyer, A. I., Wang, J., Muench, M. O., & Kan, Y. W. (2014). Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. <i>Genome research</i> , 24(9), 1526-1533.
Provirus HIV-1	DNA breaks specifically at the HIV-1 TAR target site	Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., & Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. <i>Scientific reports</i> , 3.
SiHa HPV-16 cervical positive	Suppress HPV-16 E6 and E7 expression	Liu, Y. C., Cai, Z. M., & Zhang, X. J. (2016). Reprogrammed CRISPR-Cas9 targeting the conserved regions of HPV6/11 E7 genes inhibits proliferation and induces apoptosis in E7-transformed keratinocytes. <i>Asian journal of andrology</i> , 18(3), 475.

1.5.2 A enzima Endonuclease Cas9

A enzima endonuclease Cas9 contém um domínio denominado HNH o qual tem como função clivar a fita complementar à sequência do RNA guia (sequência alvo), e o domínio RuvC que é necessário para a clivagem da fita não complementar, ou seja, a sequência não-alvo (Figura 3). Esses dois domínios resultam na clivagem na cadeia dupla do DNA alvo. Adicionalmente, a enzima Cas9 contém uma região rica em arginina que é altamente conservada que teria como função mediar a ligação de ácidos nucleicos (Taylor *et al.*, 2014).

O domínio RuvC configura o núcleo estrutural do lobo da nuclease composto de uma folha β de seis cadeias e quatro α -hélices. Os domínios HNH e RuvC são justapostos na estrutura do Cas9, com seus sítios ativos localizados $\sim 25 \text{ \AA}$ de distância (Jinek *et al.*, 2013). O domínio do sítio ativo de HNH é pouco ordenado, sugerindo que pode ser submetido à ordenação conformacional após a ligação de ácido nucleico (Jinek *et al.*, 2013).

A clivagem direcionada de um determinado DNA definido pela construção do RNA guia, levou o sistema a ser adotado como uma plataforma versátil para a engenharia genômica (Mali *et al.*, 2014). A clivagem sitio-específica gerada por Cas9 é recuperada pelo sistema de reparo tanto de Recombinação Homóloga quanto Recombinação Não Homóloga, o que acarreta na modificação das sequências vizinhas ao local de clivagem (Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2014).

Cas9 apresenta uma arquitetura bilobada, por apresentar duas aberturas proeminentes sobre uma das faces da molécula, um sulco profundo e estreito localizado dentro do lobo da nuclease e uma ranhura um pouco mais larga entre o lobo α helicoidal (onde o RNA guia se abrigaria) (Figura 4). A superfície côncava do lobo helicoidal cria uma ranhura mais larga e mais rasa, que se estende ao longo de quase todo o seu comprimento. Essa fissura teria em média, mais de 25 \AA de largura no seu ponto mais largo, o que seria suficiente para acomodar um duplex de RNA-RNA ou DNA-RNA. Sua superfície é altamente carregada positivamente (Jinek *et al.*, 2013).

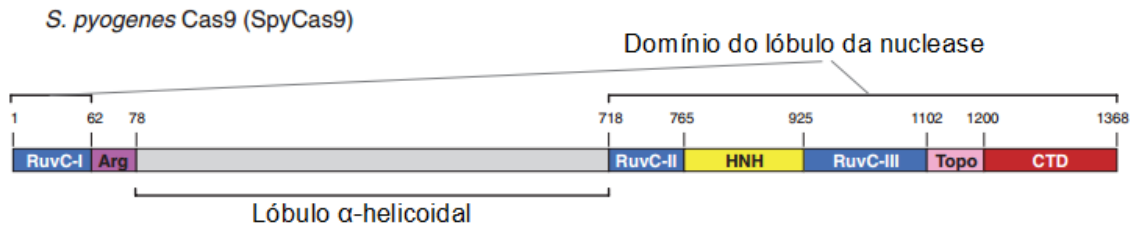


Figura 3. Representação esquemática das seqüências polipeptídicas e da organização dos domínios da endonuclease Cas9 de *S. pyogenes*. É observado a presença de um domínio HNH e um domínio RuvC. O domínio RuvC apresenta três segmentos descontínuos (RuvC-I a RuvC-III) onde a seqüência do lóbulo α -helicoidal está localizada entre o primeiro e o segundo segmento. O domínio HNH está contido entre o segundo e terceiro segmento. Podemos observar a região rica em arginina seguida da seqüência de RuvC-I. As regiões TOPO (domínio de Topoisomerase) seguida de CTC (domínio C-terminal) estão após a seqüência RuvC-III. Figura modificada a partir de Jinek *et al.* (2014).

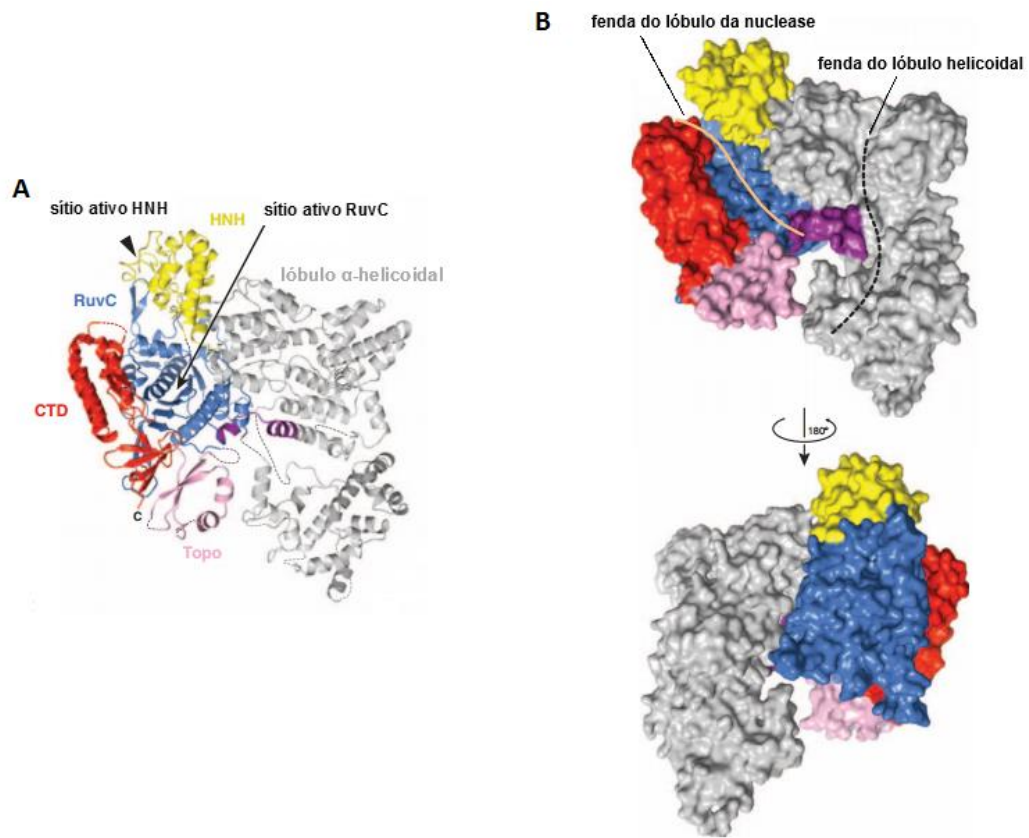


Figura 4. Estrutura Cristalina de Cas9. (A) Representação esquemática da estrutura global de Cas9 representada em fitas. Os domínios individuais Cas9 são coloridos de acordo com a ilustração da Figura 3. (B) Representação da superfície de Cas9 que apresenta as duas fendas de ligação de ácido nucleico na superfície molecular. A endonuclease Cas9 consiste de um domínio da nuclease em lobo e um outro domínio em lobo α -helicoidal. Figura modificada a partir de Jinek *et al.* (2014).

1.6. Formação complexo ternário Cas9-sgRNA-DNA

Para que o sistema CRISPR/Cas9 seja funcional e específico para um determinado gene alvo, a endonuclease requer a complementação de um RNA guia (gRNA), o qual possui especificidade de sequência ao alvo (Arakawa, 2016). O gRNA pode ser projetado como uma sequência de vinte pares de bases (pb) adjacente à uma sequência NGG, a qual é denominada como sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Estas sequências podem ser desenhadas utilizando como base a sequência codificadora do gene de interesse. Porém, deve-se ter atenção a informação genética mal anotada que pode alterar a especificidade (Arakawa, 2016).

No processo natural de resposta imune a um material exógeno, a seleção do proto-espaçador muito provavelmente está relacionada com a sequência PAM, mas o modo como o PAM ou o ácido nucléico são reconhecidos ainda é incerto (Marraffini *et al.*, 2008; Mojica *et al.*, 2009; Marraffini *et al.*, 2010). No entanto, existem evidências que corroboram a teoria de que a detecção do motivo PAM está envolvida na mudança conformacional de Cas9 entre sua estrutura durante a varredura do gene ou durante a clivagem (Sternberg *et al.*, 2014; Jinek *et al.*, 2014; Nishimasu *et al.*, 2014).

Após o reconhecimento inicial da sequência exógena, Cas1 e Cas2 incorporam os proto-espaçadores dentro do *locus* de CRISPR formando assim os espaçadores. Durante a fase de expressão, o CRISPR contendo os espaçadores produz um longo transcrito primário (o pré-crRNA). Após a transcrição de pré-crRNA, uma pequena sequência de RNA denominada transativadora (tracrRNA) emparelha-se com o fragmento pré-crRNA. Dando continuidade ao processo, ocorre uma clivagem do híbrido pré-crRNA ligado ao tracrRNA através do auxílio de uma RNase III liberando a sequência híbrida ligada à endonuclease Cas9 (Makarova *et al.*, 2011). Em seguida, Cas9 carregado com o híbrido crRNA:tracrRNA envolve o DNA, e assim, a varredura do DNA é realizada por este complexo até o reconhecimento do domínio PAM.

Como apresentado na Figura 5, o complexo Cas9-crRNA-tracrRNA primeiro se associa à sequência PAM permitindo que desta maneira o Cas9 inicie a clivagem da cadeia de DNA. A formação do heteroduplex RNA-DNA é iniciada no local por pareamento e complementaridade (Sternberg *et al.*, 2014). A partir da ligação desse complexo ao PAM e a sequência alvo correspondente é desencadeada a atividade de nuclease de Cas9 pela ativação dos domínios HNH e RuvC dentro do complexo ternário Cas9-sgRNA-DNA (Nishimasu *et al.*, 2014).

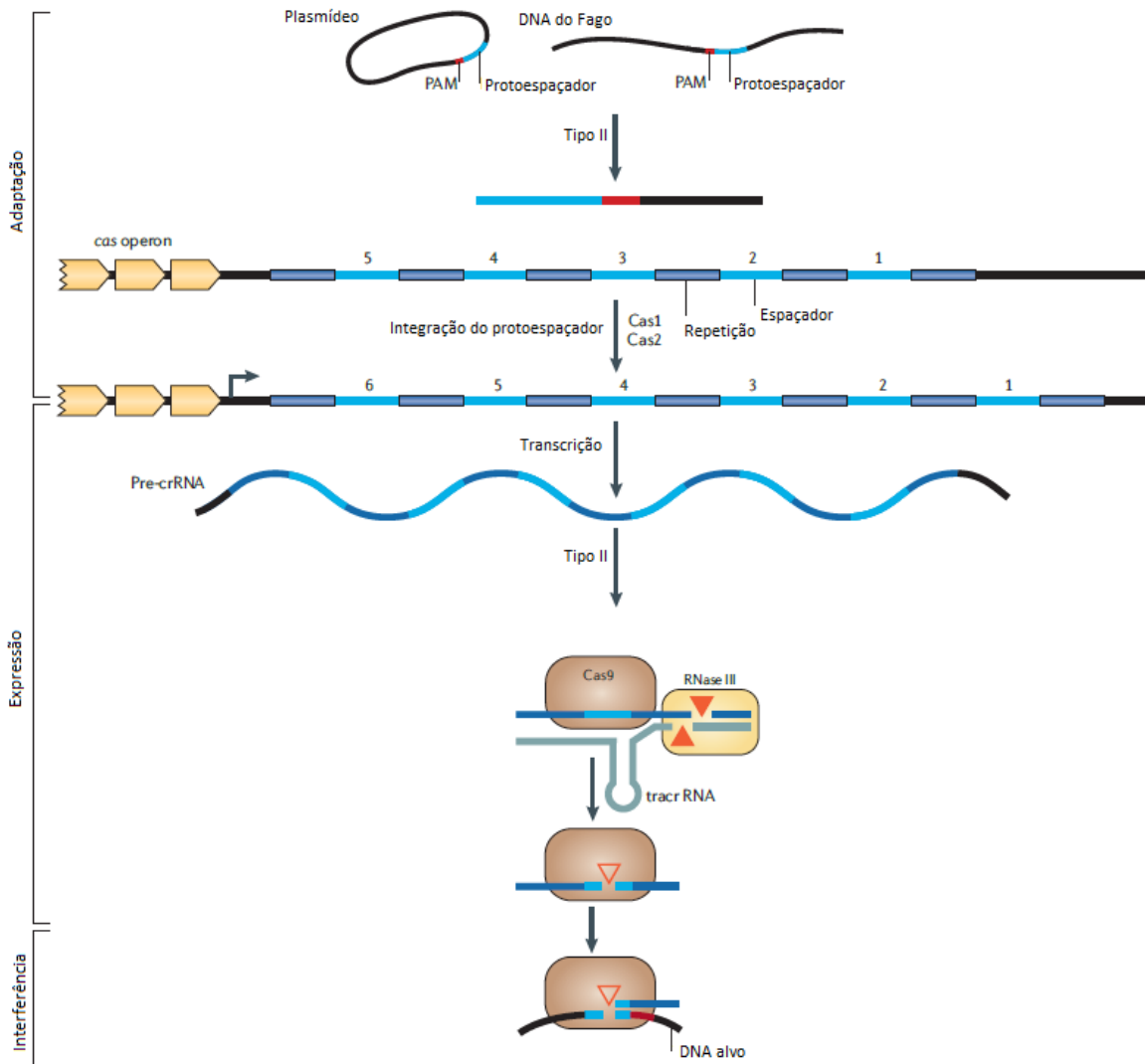


Figura 5. Fases que compõem o sistema CRISPR/Cas9. (Adaptação, expressão e interferência) Adaptação: incorporação dos proto-espaçadores a partir do DNA exógeno; Expressão: síntese do pre-crRNA; Interferência, o complexo ternário Cas9-crRNA-tracrRNA leva a clivagem do DNA. (Figura modificada a partir de Makarova *et al.*, 2011)

1.7. Mecanismos de Reparo do DNA

Uma consequência da ação de Cas9 é o desencadeamento de uma dupla clivagem na fita de DNA. A quebra da cadeia dupla do DNA é considerada a lesão mais deletéria que pode haver no material genético. Os caminhos de reparo desta lesão podem ser restaurados por dois tipos de recombinação: Recombinação Não Homóloga (RNH) (Figura 6) e Recombinação Homóloga (RH) (Figura 7) (Hefferin *et al.*, 2005). Esses dois mecanismos de reparo foram conservados através da evolução, bem como atuam numa grande variedade de organismos, tanto em procariotos quanto em eucariotos (Hefferin *et al.*, 2005).

Na recombinação homóloga a informação genética pode ser recuperada pela homologia de sequência entre as cromátides irmãs ou cromossomos homólogos e é dividida em etapas distintas. Durante a iniciação uma das fitas simples com extremidade 3' envolve a cadeia homóloga dupla possibilitando a formação de uma estrutura denominada D-loop. A segunda cadeia de fita simples 3' também executa a invasão da cadeia homóloga ou simplesmente anela com a fita deslocada, desta maneira a síntese da fita complementar ocorre a partir das duas fitas simples utilizando a fita duplex intacta como molde.

Esse processo leva a formação de duas junções de Holliday que são quatro estruturas de fitas de DNA em cadeia ramificadas. Tal estrutura pode se movimentar ao longo do DNA através de um processo de migração de ramos, estendendo ou diminuindo a região heteroduplex do DNA. Na última etapa da Recombinação Homóloga, as Junções de Holliday são clivadas por uma resolvase (Hefferin *et al.*, 2005).

Por sua vez, a Recombinação não Homóloga teria um conceito mais simples que é a ligação das duas extremidades que primeiramente são unidas e em seguida ligadas. Inicialmente, dá-se a ligação de fatores proteicos específicos nas terminações clivadas, que têm como finalidade limitar a degradação nucleotídica, o que resultaria

na perda da informação genética. A partir desta proteína e a ligação de outros fatores de ligação ocorre a justaposição e ligação das extremidades clivadas (Figura 6) (Van den Bosch *et al.*, 2002)

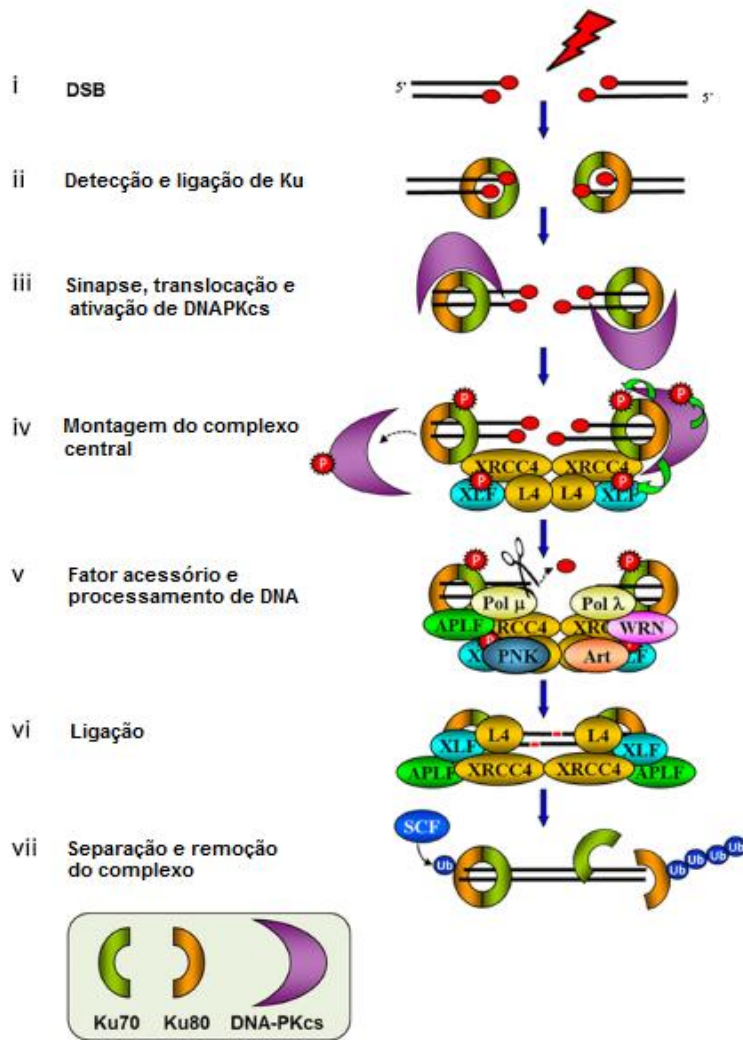


Figura 6. Esquema da via "clássica" de Recombinação não Homóloga. A partir da clivagem da dupla fita do DNA (DSB-*double strand break*) (i) é possibilitada a ligação do heterodímero Ku à extremidade do DNA (ii), em seguida, DNA-PKcs se liga ao complexo Ku (iii), dando início ao complexo NHEJ (*Non-homolog end joining*) que é formado por Ku, a XRCC4, e lig4 XLF os quais são estabilizados por meio de fosforilação de DNA-PKcs o qual em seguida dissocia-se do complexo(iv). Mais fatores são recrutados ao processo pela interação com Ku (v) onde ocorre a preparação da ligação do DNA(vi), em seguida o complexo é removido por proteólise(vii). Modificada a partir de Grundy *et al.*, (2014)

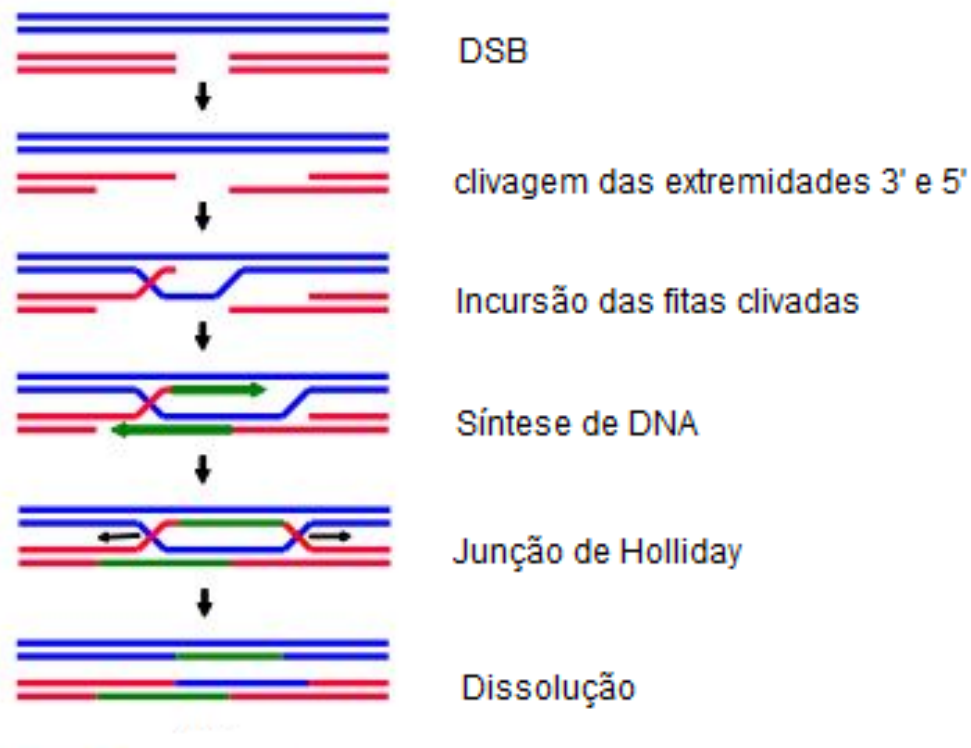


Figura 7. Recombinação Homóloga. Nesta representação esquemática dsDNA em vermelho e azul representam sequências homólogas. No sítio da dupla clivagem ocorre um intercâmbio de fitas que gera uma interação entre as moléculas clivadas e o duplex de DNA intacto. A sequência de código genético que foi perdida na dupla clivagem é restaurada através da síntese de DNA (verde). Essas moléculas interligadas são então processadas através da migração de seus ramos (indicada pelas flechas direita e esquerda) onde ocorre a resolução da Junção de Holliday e a ligação do DNA. Modificada a partir de Hefferin *et al.*, (2005)

1.8. Desenvolvimento da metodologia CRISPR/Cas9 em fungos

O primeiro fungo o qual o sistema CRISPR foi aplicado foi *Saccharomyces cerevisiae* (DiCarlo *et al.*, 2013). Neste caso, a nuclease Cas9 códon-otimizada para expressão em células humanas foi expressa em *S. cerevisiae*. O RNA guia foi desenhado com o objetivo de ter como alvo o marcador negativo CAN1, uma arginina-

permease de membrana plasmática. A inativação dessa enzima pode ser observada experimentalmente pela adição de canavanina (um análogo tóxico da arginina) que só é importado para dentro das células quando o gene de CAN1 é funcional.

O desenvolvimento da metodologia CRISPR/Cas9 em fungos filamentosos apresentam dificuldades adicionais em comparação à leveduras tais como a morfologia multicelular, a diferenciação celular, a espessura das paredes celulares contendo quitina e a falta de plasmídeos adequados (Jiang *et al.*, 2013). Entretanto, em 2015 (Liu *et al.*, 2015) foi publicado o primeiro trabalho em *Trichoderma reesei* o qual foi desenvolvido utilizando a endonuclease Cas9 códon-otimizada para fungos filamentosos a partir de *Streptococcus pyogenes*. O gene utilizado como validação do experimento foi *ura5*, sua inativação pode ser observada em placas com meio contendo 5-FOA (5-Fluoroorotic acid). Células que contém o gene *ura5* funcional convertem 5-FOA na substância tóxica 5 fluorouridina monofosfato, que compromete de maneira severa o crescimento da célula.

Em 2015 foi publicado em um mesmo trabalho a edição gênica de seis espécies do gênero *Aspergillus*: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus carbonarius* (Nødvig *et al.*, 2015). Em agosto de 2015 foi publicado um trabalho de CRISPR em *Neurospora crassa*, (Matsu-ura *et al.*, 2015) e na sequência, em setembro, foi publicado um trabalho de edição de *Ustilago maydis*, agente parasita do milho, causador da doença denominada “carvão-do-milho”, mostrando mais eficiência de ~70% (Schuster *et al.*, 2015).

Em dezembro do mesmo ano, foi realizado no fungo *Pyricularia oryzae*, a edição gênica por meio de CRISPR, o qual foi demonstrado o estudo da utilização de diferentes promotores para a expressão do segmento que originaria o RNA guia. Foram utilizados dois promotores endógenos U6 específicos de RNA polimerase III e um promotor Trpc, amplamente utilizado em fungos filamentosos, sendo específicos para RNA polimerase II. Os resultados confirmaram o evento de nocaute nas construções com os três promotores, porém as construções com os promotores U6

resultaram em maior taxa de nocaute gênico (Arazoe *et al.*, 2015) (Tabela 2). Neste estudo, o gene alvo foi o que codifica a enzima SDH, responsável pela biossíntese de melanina. Uma mutação neste gene acarreta perda de deposição de melanina resultando em colônias com fenótipo branco. Dessa maneira, foi observada uma taxa de nocaute de até 80% nas construções com os promotores U6-1 e U6-2.

Em 2016, a tecnologia CRISPR foi desenvolvida em *Candida albicans* (Min *et al.*, 2016) e em *Cryptococcus neoformans*, onde foi desenvolvida a expressão da endonuclease Cas9 no organismo, a qual não alterou a virulência do fungo. Em seguida foi feita a edição no gene ADE2, onde a perda da expressão resultou em fenótipos facilmente observáveis, pois apresentam coloração rosa devido à acumulação do intermediário biossintético de purina (Arras *et al.*, 2016).

Tabela 2 Eficiência das construções com diferentes promotores desenvolvidos no fungo *Pyricularia oryzae*. U6-1, U6-2 e TrpC. Número total de colônias e número de colônias desmelanizadas (Colônias brancas). Porcentagem total de eficiência (Arazoe *et al.*, 2015 modificado).

Transgene	Total	Colônias brancas	Eficiência
Apenas TV	36	0	0,0%
TV+CRISPR/Cas-U6-1 sítio1	39	21	53,8%
TV+CRISPR/Cas-U6-1 sítio2	43	33	76,7%
TV+CRISPR/Cas-U6-1 sítio3	41	33	80,5%
TV+CRISPR/Cas-U6-1 sítio4	39	28	71,8%

Transgene	Total	Colônias brancas	Eficiência
Apenas TV	25	0	0,0%
TV+CRISPR/Cas-U6-2 sítio1	36	13	36,1%
TV+CRISPR/Cas-U6-2 sítio2	61	51	83,6%
TV+CRISPR/Cas-U6-2 sítio3	41	16	39,0%
TV+CRISPR/Cas-U6-2 sítio4	55	40	72,2%

Transgene	Total	Colônias brancas	Eficiência
Apenas TV	36	0	0,0%
TV+CRISPR/Cas-TrpC sítio1	52	6	9,8%
TV+CRISPR/Cas-TrpC sítio2	62	7	11,5%
TV+CRISPR/Cas-TrpC sítio3	41	4	11,3%
TV+CRISPR/Cas-TrpC sítio4	48	13	27,1%

1.9. Construção de organismos eucariotos transgênicos estáveis que expressam a endonuclease Cas9

Com a finalidade de avaliar de uma maneira mais ampla o comportamento dos organismos, como por exemplo mudanças fenotípicas no organismo eucarioto frente a expressão constitutiva da endonuclease Cas9, foram desenvolvidos organismos eucariotos transgênicos estáveis que expressam a endonuclease Cas9 (Kondo & Ueda *et al.*, 2013; Fuller *et al.*, 2015). O desenvolvimento de organismos que expressam a endonuclease Cas9 também foi realizada com o objetivo de reduzir a quantidade de pares de bases nas construções de vetores (Yin *et al.*, 2015) como por exemplo o Geminivírus que não comporta mais do que 800 pb (Muangsan *et al.*, 2004).

Em 2013 foi desenvolvido o primeiro organismo transgênico que expressou de forma estável a proteína Cas9: *Drosophila melanogaster*. Neste estudo foi demonstrado que a mosca-das-frutas que expressava a proteína era viável e fértil, mostrando que Cas9, bem como o RNA guia, não tinham efeitos deletérios à célula (Kondo & Ueda *et al.*, 2013).

Um estudo expandiu as possibilidades de elaborar novos trabalhos com *Caenorhabditis elegans*. A partir dos protocolos de RNAi utilizados em *C. elegans*, foram desenvolvidos os protocolos de CRISPR/Cas9. *C. elegans* se alimenta de bactérias, e partindo desta característica, foi desenvolvido o protocolo de RNAi (Timmons & Fire, 1998) e posteriormente o protocolo de Cas9 (Liu *et al.*, 2014). O trabalho em questão apresentou *C. elegans* que expressa Cas9 sob controle de promotores de expressão ubíqua, tecido específica ou induzível.

O primeiro fungo o qual foi desenvolvida uma linhagem transgênica que expressou de maneira constitutiva a endonuclease Cas9 foi *A. fumigatus*. Neste trabalho foi validado que a expressão constitutiva da nuclease Cas9 não era deletéria ao fungo, tanto em crescimento vegetativo quanto em virulência, realçando desta maneira a potencial utilização da tecnologia CRISPR em futuros estudos (Fuller *et al.*, 2015).

Em vegetais, foi desenvolvida uma linhagem transgênica de *Nicotiana benthamiana*, onde foram criadas plantas estáveis transgênicas que expressavam a nuclease Cas9. Neste trabalho, foi sintetizada uma nuclease a partir de *S. pyogenes* códon-otimizada baseando-se em *Arabidopsis*. Onde foi desenvolvido primeiramente o vegetal que expressa Cas9, pois o trabalho foi realizado com geminivírus como vetor dos genes para edição. Todavia, os geminivírus comportam até 800 nucleotídeos, desta maneira, obter uma linhagem que primeiramente expressa Cas9 foi uma grande vantagem (Yin *et al.*, 2015).

Em 2015 (Yin *et al.*, 2015) realizou-se a primeira edição de CRISPR multiplex e um estudo demonstrou que Zebrafish (*Danio rerio*) pode expressar Cas9 de maneira ubíqua em diferentes células, sendo desta maneira possibilitada a edição gênica de mais de um gene no mesmo organismo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia de CRISPR/Cas9 bem como RNAi e verificar a sua aplicação na construção de mutantes funcionais no fungo *Metarhizium anisopliae*.

2.2. Objetivos Específicos

- Construir um sistema de vetores para realizar edições gênicas com a finalidade de gerar mutantes do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.
- Clonar Cas9 em *M. anisopliae* linhagem E6 e linhagem que expressa GFP para possibilitar que essa linhagem expresse a endonuclease Cas9.
- Construir vetores que expressam RNA guia, os quais contém as sequências derivadas do gene alvo.
- Verificar a funcionalidade dos vetores construídos em *M. anisopliae* utilizando uma linhagem que possui um gene repórter que expressa de maneira constitutiva a proteína GFP.
- Construir um sistema de silenciamento pós-transcricional baseado no sistema de RNA de interferência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

A linhagem *M. anisopliae* var. *anisopliae* E6 utilizada neste trabalho foi originalmente isolada de *Deois flavopicta* (*Homoptera:Cercopidea*) no estado do Espírito Santo, Brasil cedida pelo professor João Lúcio de Azevedo da coleção da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP). A linhagem *M. anisopliae* GFP+ foi construída por Nakazato *et al.* (2005) apresentando como região regulatória o promotor homólogo do gene do fator de alongamento de tradução 1 α (*tef-1 α*) e como marca de seleção dominante o gene *bar* que confere resistência ao glifosinato de amônio. A linhagem de *A. tumefaciens* e o vetor binário utilizados em nosso protocolo de agrotransformação são EHA105 e pPZP201BK, respectivamente. As células EHA105 foram preparadas para quimiocompetência.

3.2. Meios de Cultivo e Manutenção dos organismos

3.2.1. Meios de cultivo e manipulação para *M. anisopliae*

Meio de Cove Completo (MCc):

Glicose	-1%
Nitrato de sódio	-0,6%
Casaminoácidos	-0,15%
Extrato de levedura	-0,05%
Peptona	-0,2%

São ainda acrescentados: 2% de Solução de Sais [KCl 2,6%, MgSO₄•7H₂O 2,6% e KH₂PO₄ 7,6% (p/v)] e 0,04% de Solução de Elementos Traços [Na₂Ba₄O₇•7H₂O 4mg%, CuSO₄•5H₂O 40 mg%, FeSO₄ 1 mg%, Na₂MNO₄•7H₂O 80 mg%, MnSO₄•7H₂O

80 mg% e ZnSO₄•7H₂O 80 mg% (p/v)]. Para meio sólidos foi acrescido 1,5% de ágar. Linhagens fúngicas foram mantidas a 28°C.

3.2.2. Meios de Cultivo e Manipulação para *E.coli*

Inóculos de células de *E.coli* foram efetuados em meio Luria-Bertani (LB) e em Meio SOC.

Meio Luria-Bertani:

Triptona	-1%
Extrato de levedura	-5%
NaCl	-1% (p/v)

Meio SOC:

Triptona	-1%
Extrato de levedura	-5%
NaCl	-1%
Glicose	-20mM

Após transformação, foram adicionados 1,5% de ágar aos meios sólidos. Todos os cultivos foram mantidos a 37°C.

3.3. Manipulação de Ácidos Nucléicos

A extração do DNA fúngico a partir do micélio foi realizada conforme protocolo estabelecido por Nakato *et al.* (2005). Para realizar a extração de DNA de esporos em forno de micro-ondas, uma alça de esporos foi retirada de placas esporuladas de *M. anisopliae* e adicionadas em tubos *Eppendorf* contendo 100 µl de água Milli-Q. Após permanecer por 10 minutos no forno de micro-ondas em potência máxima, o material foi centrifugado e uma alíquota de 20 µl de sobrenadante foi transferida para tubos

novos em diluição de 10x. 5 µl do material contido no sobrenadante diluído foram utilizados como molde para reação de PCR. Esta metodologia é baseada na descrita por Ferreira & Glass (1996). A extração de DNA plasmidial a partir de *E. coli* foi realizada conforme Green & Sambrook (2014).

3.4. Soluções e Enzimas Utilizadas

As soluções e tampões utilizados foram preparados de acordo com Green & Sambrook (2014) utilizando água Milli-Q autoclavada. As enzimas de restrição e de modificação utilizadas foram obtidas a partir de *Fermentas*, *Invitrogen*, *New England Biolabs* e *Promega*. A linhagem XL1-Blue (*Stratagene*) de *E.coli* foi utilizada para as manipulações de DNA de acordo com procedimento padrão de Green & Sambrook (2014).

3.5. Suspensão de Conídios

A suspensão de conídios foi preparada a partir de culturas esporuladas. Em placas de Petri contendo esporos foram vertidos 3 ml de uma solução de 0,01% de Tween 80. Com alça de Drigalsky, o fundo da placa foi friccionado com o objetivo de remover os conídios presentes e dispersá-los na solução adicionada. Os conídios foram coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferidos para tubos estéreis do tipo *Falcon*. Na sequência, o material foi centrifugado por 10 min. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionada água Milli-Q estéril com o intuito de ressuspender os conídios para a retirada do Tween-80 ainda presente. A suspensão foi centrifugada por 10 min novamente. Descartou-se o sobrenadante, foram adicionados 2 ml de água Milli-Q estéril com o objetivo de ressuspender os conídios com o auxílio de um agitador. A contagem dos conídios foi realizada em

câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para uma concentração final de 1×10^8 conídios.ml⁻¹ com água destilada esterilizada.

3.6. Preparação e transformação de células quimiocompetentes

3.6.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Uma colônia da cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* foi inoculada em meio LB líquido a 28°C até obter OD₆₀₀ na faixa de 0,4 e 0,5. O cultivo foi resfriado no gelo por 15 min e centrifugados a 4.000 g por 15 min. As células foram ressuspensas em 0,5 ml de glicerol 10% e CaCl₂ 20 mM. Alíquotas (0,1 ml) foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Para transformar as células, foram adicionados entre 200 e 1.000 ng do plasmídeo desejado. O material foi homogeneizado por branda agitação e mantido no gelo por 30 min. Após, a amostra foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e incubada a 37°C por 5 min. Adicionou-se 1 ml de LB líquido. O conteúdo foi incubado 2 h a 28°C. Cerca de 100 µl de LB contendo as células foram, então, plaqueados em LB sólido contendo 50 µg.ml⁻¹ de canamicina. As placas foram mantidas por 48 h a 28°C

3.6.2. *E. coli*

Uma colônia da cepa XL1-Blue de *E. coli* foi inoculada em meio LB líquido a 28°C até obter OD₆₀₀ na faixa de 0,4 e 0,5. O cultivo obtido foi resfriado no gelo por 15 min e centrifugados a 4.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em uma solução de 20 mM de CaCl₂ / 80 mM de MgCl₂. As células então foram centrifugadas por 10 min, 4°C a 4.000 g. Na sequência, as células foram ressuspendidas em 20 ml de 100 mM de CaCl₂ / 10% de glicerol. Foram feitas alíquotas de 100 µl em tubos *Eppendorfs* estéreis e gelados. Em seguida, o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C por aproximadamente dois meses. Para transformar as células, foram adicionados entre 200 e 1.000 ng do plasmídeo desejado. O material foi homogeneizado por branda agitação e mantido no

gelo por 30 min. Após, a amostra foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e incubada a 42°C por 2 min, em seguida a amostra é colocada imediatamente no gelo novamente e é adicionado cerca de 1 ml de SOC ou LB. As células são incubadas por 1 h a 37°C. Após este período as células foram plaqueadas em diferentes volumes em placas de Petri contendo LB e o antibiótico de seleção cujo, no experimento, foi utilizado canamicina na concentração de 50µg/mL.

3.7 Meios de cultivo e soluções utilizados para Agrotransformação

Os meios de cultivo foram preparados com água destilada e imediatamente autoclavados a 120°C por 10 min. Foi adicionado ágar para uma concentração final de 1,5% (ou 0,7% no Top ágar) para meios de cultivo sólidos. Os meios foram preparados seguindo as recomendações de Green & Sambrook (2014). O Meio de Indução (Covert, 2000) contém Sais MM 1x, glicose 10 mM, glicerol 0,5% (v/v), sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 5mg mL⁻¹.

3.7.1 Meio de Indução – IM (Covert, 2000)

Sais MM	- 1 x
Glicose	-10 mM
Glicerol	-0,5 % (v/v)
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	- 5 mg.mL ⁻¹

O meio foi dissolvido em água destilada e autoclavado. No momento do uso, foi adicionado assepticamente MES 40 mM. A solução de Sais MM 2,5x contém: fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 0,36% (m/V), fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,51% (m/V), cloreto de sódio (NaCl) 0,37%(m/V), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) 0,12%(m/V), cloreto de cálcio diidratado (CaCl₂.H₂O) 0,016%(m/V), sulfato de ferro heptaidratado (FeSO₄.7H₂O) 0,00062%(m/V).

3.7.2 Sais MM 2,5 x

Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4)	– 0,36% (m/V)
Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	– 0,51% (m/V)
Cloreto de Sódio (NaCl)	– 0,37%(m/V)
Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($\text{MgSO}_{4.7}\text{H}_2\text{O}$)	– 0,12%(m/V)
Cloreto de Cálcio Diidratado ($\text{CaCl}_2.\text{H}_2\text{O}$)	– 0,016%(m/V)
Sulfato de Ferro Heptaidratado ($\text{FeSO}_{4.7}\text{H}_2\text{O}$)	– 0,00062%(m/V)

Os sais foram adicionados em água destilada e HCl até a completa dissolução. Após, a solução foi autoclavada.

3.7.3 Solução MES 1 M

Foi dissolvido 19,52 g de MES em 80 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 5,3 utilizando KOH 5 M. O volume foi completado para 100 mL e esterilizado por filtração em filtros contendo poros de 45 μm . Armazenamento a -20°C .

3.7.4 Solução de Acetoseríngona 10mM – AS

Foi adicionado 0,0196 g de Acetoseríngona em 100 mL de DMSO. Foi armazenado a -20°C .

3.7.5 Meio top MM

Glicose	– 1% (m/V)
Nitrato de Sódio (NaNO_3)	– 0,6% (m/V)
Ágar	– 1,5% (m/V)

O meio foi esterilizado por autoclavagem. Após, foi adicionado assepticamente solução de sais 2 %, elementos traços 0.04 %, cefotaxima 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3.7.6 Solução de Glifosinato de Amônio 40 mg. mL⁻¹

A partir da formulação comercial Finale (Bayer) foi feito um tratamento com n-butanol para remoção de compostos não desejados, como corantes e detergentes. Misturou-se o composto numa proporção 1:1. Após decantação em funil de separação, a fase inferior foi recuperada e a superior descartada. Repetiu-se o processo de tratamento com n-butanol, recuperou-se a fase inferior e armazena-se a 4°C.

3.8 Agrotransformação

Uma colônia com o vetor binário de interesse foi inoculada em 10 ml de LB líquido contendo canamicina (50 mg/ml). A solução permaneceu a 28°C por aproximadamente 48 h. Após este período, foi retirada uma alíquota e adicionada em 10 ml de MI para que o volume final fique na concentração de OD₆₀₀ de 0,15. Retirou-se uma alíquota de aproximadamente 1 ml de MI antes de fazer o novo inóculo com o objetivo utilizá-la como branco nas próximas medidas de OD. O cultivo permaneceu a 28°C a 200 RPM por aproximadamente 2h até obtenção de uma densidade óptica (OD₆₀₀) entre 0,4 e 0,5. Durante esse período foram realizadas suspensões de esporos das linhagens fúngicas a serem transformadas (tipo selvagem e linhagem GFP+). Após contagem do número de esporos e células, foi efetuada uma mistura (na proporção 1:1) da suspensão de esporos e da suspensão de *A. tumefaciens*. Após um período de aproximadamente 30 min de interação dos tipos celulares, a mistura foi espalhada (volume de aproximadamente 200 µl) em diferentes placas de Petri contendo meio ágar suplementado com acetoceringona (AS) 200 µM e MES 40mM que foram previamente cobertas com uma membrana de celofane por cada placa. O co-cultivo de células fúngicas e células bacterianas foi incubado por tempo indeterminado até o aparecimento das primeiras colônias fúngicas resistentes clorimuron etil (10 x/ml) (Protocolo conforme Staats *et al.*, 2007)

3.9 Construção do vetor binário pPZP::NAT

O vetor binário pPZP (6.794 pb) foi clivado pelas enzimas de restrição *SacI* e *PstI* (Promega) e posteriormente purificado utilizando o *kit* de purificação de ácidos nucleicos PureLink Quick Gel Extration & PCR Purification Combo (Invitrogen). O plasmídeo pUC18::NAT contém o *cassette* para expressão do gene *nat* como marca de seleção, o qual confere resistência a nourseotricina. Esse *cassette* foi construído contendo como promotor *Pgpd* (promotor do gene da gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase) e como terminador *TtrpC* (terminador do gene *trpC*). Após clivagem de pUC18::NAT com as mesmas enzimas de restrição utilizadas anteriormente, (*SacI* e *PstI*) e posterior purificação com o *kit* PureLink Quick Gel Extration & PCR Purification Combo (Invitrogen), o *cassette* NAT (*Pgpd*::NAT::*trpC*) foi clonado em pPZP utilizando o protocolo Sticky-end Ligation (Thermo Scientific) e gerando, desta maneira, o plasmídeo pPZP::NAT.

3.10 Construções de vetores para realização do sistema CRISPR/Cas9

Para realizar as construções para o desenvolvimento da técnica CRISPR/Cas9, a sequência codificadora de Cas9 códon otimizada para fungos filamentosos, assim como o promotor e terminador foram retirados do plasmídeo pCRISPR/Cas doado por Arazoe *et al.* (2015). Neste plasmídeo a expressão de Cas9 é regulada pelo promotor constitutivo *tef* e pelo terminador *gla*, respectivamente.

3.11 Construção de *M. anisopliae* expressando Cas9

Para gerar as construções de expressão constitutiva de Cas9 no fungo foi desenvolvido o plasmídeo pPZP::SUR::Cas9.

Para expressão constitutiva de Cas9, foi escolhido como promotor do gene *tef* (Translation factor promoter), o gene Cas9 códon otimizado para fungos filamentosos e *Tgla* (glicoamilase) como terminador.

Para a construção, primeiramente o plasmídeo pPZP (6794 pb) foi linearizado com *SacI* e *EcoRI*. As mesmas enzimas foram utilizadas para retirar a sequência completa responsável por expressar Cas9 do plasmídeo pCRISPR/Cas9, em seguida, foi feita uma reação de ligação formando dessa maneira o plasmídeo pPZP::Cas9. Esse plasmídeo foi clivado com *EcoRI*, dessa maneira, o plasmídeo ficou linearizado.

Foi retirado a sequência SUR do plasmídeo TOPO::SUR por meio da clivagem com a enzima *EcoRI*. Dessa maneira, foi feita uma reação de ligação com o plasmídeo pPZP::Cas9 linearizado com a sequência responsável por expressar SUR. Assim, foi obtido o plasmídeo pPZP::SUR::Cas9.

3.12 Construção do vetor binário pPZP::NAT::GFP

Para conduzir a expressão do RNA guia em fungos filamentosos, foi utilizado o promotor U6-1 de *P. oryzae* e como terminador da construção foi utilizada uma repetição de cinco timinas, ambos gentilmente doada por Arazoe *et al.* (2015). Foram escolhidos quatro sítios alvos do gene *gfp* (GFP1, GFP2, GFP3 e GFP4). Esses sítios de escolha foram projetados através da utilização da ferramenta CRISPR RGEN Tool (www.rgenome.net) com o objetivo de prevenir a formação de *off-targets*.

Os oligonucleotídeos foram anexados aos plasmídeos pela técnica *Golden Gate cloning* (Sakuma *et al.*, 2014) com algumas modificações (Arazoe *et al.*, 2015). Após a inserção dos oligonucleotídeos no RNA guia, a sequência completa do RNA guia foi retirada de pCRISPR/Cas9 para ser clonada posteriormente no vetor binário pPZP::NAT. O vetor binário pPZP::NAT foi clivado pelas enzimas de restrição *PstI* (Promega) e *XbaI* (Promega) e posteriormente purificada através do *kit PureLink Quick Gel Extration & PCR Purification Combo* (Invitrogen).

Posteriormente, os plasmídeos pCRISPR/Cas9 que continham as sequências do RNA guia prontas, foram clivadas com as mesmas enzimas que o pPZP::NAT foi

clivado (*Pst*I (Promega) e *Xba*I (Promega)) a fim de obter a sequência de RNA guia completa pronta para ser unida ao vetor binário em questão. Essas sequências de RNA guia foram também purificadas através do *kit PureLink Quick Gel Extration & PCR Purification Combo* (Invitrogen). As sequências gRNA-GFP1, gRNA-GFP2, gRNA-GFP3 e gRNA-GFP4 foram ligadas ao vetor binário pPZP::NAT já linearizado e purificado através do protocolo de ligação da Thermo Scientific. Desta maneira foram formados quatro plasmídeos: pPZP::NAT::GFP1, pPZP::NAT::GFP2, pPZP::NAT::GFP3, and pPZP::NAT::GFP4.

As quatro construções geradas foram transformadas em *A. tumefaciens* e posteriormente, as bactérias contendo os plasmídeos construídos foram usadas para agrotransformar *M. anisopliae* (MaE6::GFP+ que expressa Cas9) conforme Staats *et al.* (2007).

3.13 Construção do vetor binário pPZP::BAR::chiB1

Foram escolhidos 4 sítios alvos do gene *chimaB1* (*chiB1-1*, *chiB1-2*, *chiB1-3* e *chiB1-4*). Esses sítios de escolha foram projetados através da utilização da ferramenta CRISPR RGEN Tool (www.rgenome.net) com o objetivo de prevenir a formação de *off-targets*. Os oligonucleotídeos foram anexados aos plasmídeos pela técnica *Golden Gate cloning* (Sakuma *et al.*, 2014) com algumas modificações (Arazoe *et al.*, 2015).

Após a inserção dos oligonucleotídeos no RNA guia, a sequência completa do RNA guia foi retirada do pCRISPR/Cas para ser clonada posteriormente no vetor binário pPZP::BAR. O vetor binário pPZP::BAR foi clivado pelas enzimas de restrição *Pst*I (Promega) e *Xba*I (Promega) e posteriormente purificada através do *kit PureLink Quick Gel Extration & PCR Purification Combo* (Invitrogen).

Posteriormente, os plasmídeos pCRISPR/Cas9 que continham as sequências do RNA guia prontas, foram clivados com as mesmas enzimas que o pPZP::BAR foi clivado (*Eco*RI e *Xba*I) a fim de obter a sequência de RNA guia completa pronta para

ser unida ao vetor binário em questão. Essas sequências de RNA guia foram também purificadas através do kit *PureLink Quick Gel Extration & PCR Purification Combo* (Invitrogen).

As sequências gRNA-chiB1-1, gRNA-chiB1-2, gRNA-chiB1-3 e gRNA-chiB1-4 foram ligadas ao vetor binário pPZP::BAR já linearizado e purificado através do protocolo de ligação da Thermo Scientific. Desta maneira foram formados quatro plasmídeos: pPZP::BAR::chiB1-1, pPZP::BAR::chiB1-2, pPZP::BAR::chiB1-3, e pPZP::BAR::chiB1-4. As quatro construções geradas foram transformadas em *A. tumefaciens* e posteriormente o fungo MaE6::GFP+::Cas9.+ foi agrotransformado seguindo o protocolo de Staats *et al.* (2007).

3.14 Preparação dos oligonucleotídeos

Foi preparada a solução para fosforilação e anelamento dos oligonucleotídeos de RNA guia, tanto a sequência *REV* e *FOR* (Tabela 3) desejada da seguinte maneira:

sgRNA REV (100 µM)	- 1 µl
sgRNA FOR (100 µM)	- 1 µl
10x T4 tampão de ligação	- 1 µl
T4 PNK	- 1 µl
H ₂ O Milli-Q autoclavada	<u>- 6 µl</u>
	Total 10 µl

3.15 Método de clonagem *Golden Gate*

A fosforilação e o anelamento dos oligonucleotídeos foram realizados em termociclador e seguiram os seguintes parâmetros: 37 °C por 30 min; 95 °C por 5 min; diminuição da temperatura para 25 °C a 5 °C min⁻¹. Após fosforilação e anelamento, foi feita a diluição da solução com o objetivo de obter uma concentração de 1:50

adicionando 1 μl de oligonucleotídeo para 49 μl de água Milli-Q autoclavada em temperatura ambiente, em seguida, foi feita a etapa de clonagem dos oligonucleotídeos no plasmídeo pCRISPR/Cas da seguinte maneira:

Foi configurada uma reação de ligação para cada sgRNA, como descrito abaixo:

Oligonucleotídeos fosforilados e anelados	- 0.8 μl
50 ng/ μl pCRISPR/Cas	- 0.3 μl
10xT4 DNA tampão de ligase	- 0.4 μl
Esp 3I	- 0.2 μl
Quick ligase	<u>- 0.2 μl</u>
	Total 4 μl

A reação de ligação foi realizada em termociclador e seguiram os seguintes parâmetros: 37°C por 5 min seguido de 16°C por 10 min por 6 vezes. Foi feita uma digestão adicional com adição de 0.5 μl de tampão Tango 10 x, 0.5 μl de DTT e 0.2 μl de *Esp3I* a qual seguiu os seguintes parâmetros: *premix* de 1,2 μl a 37°C por 1h, 5 min a 80°C, 4°C ∞ 6 vezes.

Em seguida foi feita a transformação em *E.coli* TOP 10 quimiocompetentes. Foi retirado 1 μl do produto da reação de ligação e inoculado em 10 μl de células competes.

A reação foi plaqueada em placas de Petri com meio LB contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina, Xgal (2 $\mu\text{l/ml}$) e IPTG (1 mM).

3.16 Construções de vetores para realização da técnica de RNAi (Dual Promoter)

3.16.1 Construção do *dual-promoter*

Foram projetados dois *primers* (PrimerGFP anti-senso PrimerGFP senso, Tabela 4) a partir do vetor binário pPZP::GFP que contém o gene que expressa a proteína GFP previamente construído por NAKAZATO *et al.* (2006). Com a finalidade de obter 420 pb do gene *gfp* que possui 784 pb foi realizado uma reação de PCR utilizando a polimerase *Platinum - Taq DNA polimerase High Fidelity*. Dessa maneira, foi obtida a sequência de 420 pb do gene *gfp*. Após a reação de PCR, a solução foi submetida a purificação através da utilização do *kit* PureLink Quick Gel Extration & PCR Purification Combo (Invitrogen) para posteriormente clonar a sequência em pPCR2.1-TOPO, obtendo o plasmídeo pTOPO::GFP420pb.

O *dual promoter* (Pgpd e PtrpC de *A. nidulans* em direções opostas) clonado em pPUC18 foi removido e subclonado no vetor binário pPZP::SUR (9.257 pb) que possui marca de resistência a sulfoniluréia. Desta maneira, foi obtido o plasmídeo pPZP::SUR::DP. A sequência de 420 pb foi clonada entre o *dual promoter* utilizando a enzima de restrição *EcoRV* (Promega). Dessa maneira foi obtido o plasmídeo pPZP::SUR::DP::GFP.

O vetor gerado pPZP::SUR::DP::GFP foi transformado em *A. tumefaciens* e em seguida foi realizada a agrotransformação de *M. anisopliae*::GFP+ segundo o protocolo de Staats *et al.* (2007).

Tabela 3. Primers para construção do RNA guia para nocaute do gene *gfp* e *ChiMaB1*

Nome do oligo	–	Sequência 5'-3'
gfpcrisp4REV	–	AAACGCAGGACCATGTGATCGCGC
gfpcrisp4FOR	–	TTCGGCGCGATCACATGGTCCTGC
gfpcrisp3REV	–	AAACCGATGTTGTGGCGGATCTTG
gfpcrisp3FOR	–	TTCGCAAGATCCGCCACAACATCG
gfpcrisp2REV	–	AAACTGAAGAAGATGGTGCGCTCC
gfpcrisp2FOR	–	TTCGGGAGCGCACCATCTTCTTCA
gfpcrisp1REV	–	AAACGGATGGGCACCACCCCGGTG
gfpcrisp1FOR	–	TTCGCACCGGGGTGGTGCCCATCC
chiB1crisp1REV	–	AAACGAATTGGGCTGGCAATACGC
chiB1crisp1FOR	–	TTCGGCGTATTGCCAGCCCAATTC
chiB1crisp2REV	–	AAACTACGAGTCCCATAGGTA CTG
chiB1crisp2FOR	–	TTCGCAGTACCTATGGGACTCGTA
chiB1crisp3REV	–	AAACTTGACGAGGATACTCTTTGC
chiB1crisp3FOR	–	TTCGGCAAAGAGTATCCTCGTCAA
chiB1crisp4REV	–	AAACTGCTTGACACATTGGTAAGG
chiB1crisp4FOR	–	TTCGCCTTACCAATGTGTCAAGCA

Tabela 4. *Primers para amplificar gene sur, cassete de nat, Cas9 e GFP*

Nome do <i>primer</i>	–	Sequência 5'-3'
SUR_REV	–	TCGACGTGAGAGCATGCAATTC
SUR_FOR	–	TCGACGTGCCAACGCCACAG
NAT_REV	–	GAGTAAAGAAGAGGAGCATG
NAT_FOR	–	CTGTACAGTGACCGGTGACT
Cas9_FOR	–	ACGAGAAGGTCCTTCCCAA
Cas9_REV	–	TCGTCGTGGATGAGTTGCAT
RNAi-gfpFOR	–	CACAAGTTCAGCGTGTCC
RNAi-gfpREV	–	GTTCACCTTGATGCCGTT

4. RESULTADOS

4.1. Construção dos RNAs guias (sgRNAs)

A fim de avaliar a eficiência da nuclease guiada pelo RNA guia em diferentes *loci* gênicos, quatro sgRNAs foram construídos, tendo como alvos quatro sítios diferentes no *locus* do gene *gfp*, que foi usado como gene repórter no desenvolvimento do trabalho. Para a construção dos RNAs guias, foi utilizada a ferramenta *CRISPR rgen* a fim de evitar *off-targets* (Figura 8).

```
aagtaccatggtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtgggcccatctggctcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttc
agcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggc
ccaccctcgtgaccaccttcacctacggcgtgagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtccgcatgc
ccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacacc
tggtgaaccgcatcgagctgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccaca
acgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttaagatccgccacaacatcaggacggcagcgtgcaagctcg
ccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcgcccctgagcaa
agacccaacgagaaacgcatcacatggctctgtggagttcgtgaccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaa
ccatgggga
```

Figura 8. Sequências alvo do gene *gfp*. Representação Esquemática da sequência do gene *gfp* e as sequências-alvo (em verde) selecionadas para construção do RNA guia derivado do gene alvo a fim de direcionar a endonuclease Cas9 a esses determinados *loci*. A sequência PAM está representada em amarelo.

Os nucleotídeos foram anelados e inseridos pela técnica *Golden Gate cloning* (Araoz *et al.*, 2015) e a partir do plasmídeo pCRISPR/Cas – U6 (Figura 10). Dessa maneira, foi possível obter quatro plasmídeos que possuem o gene *nat* que conferem resistência a nourseotricina: pPZP::NAT::RNAg::GFP1, pPZP::NAT::RNAg::GFP2, pPZP::NAT::RNAg::GFP3 e pPZP::NAT::RNAg::GFP4.

O promotor U6 – 1 contido na construção do RNA guia é originário do fungo *Pyricularia oryzae* (Arazoe *et al.*, 2015), um promotor específico para RNAP III para conduzir a expressão dos RNA guias e como terminador da sequência temos uma repetição de 5 timinas.

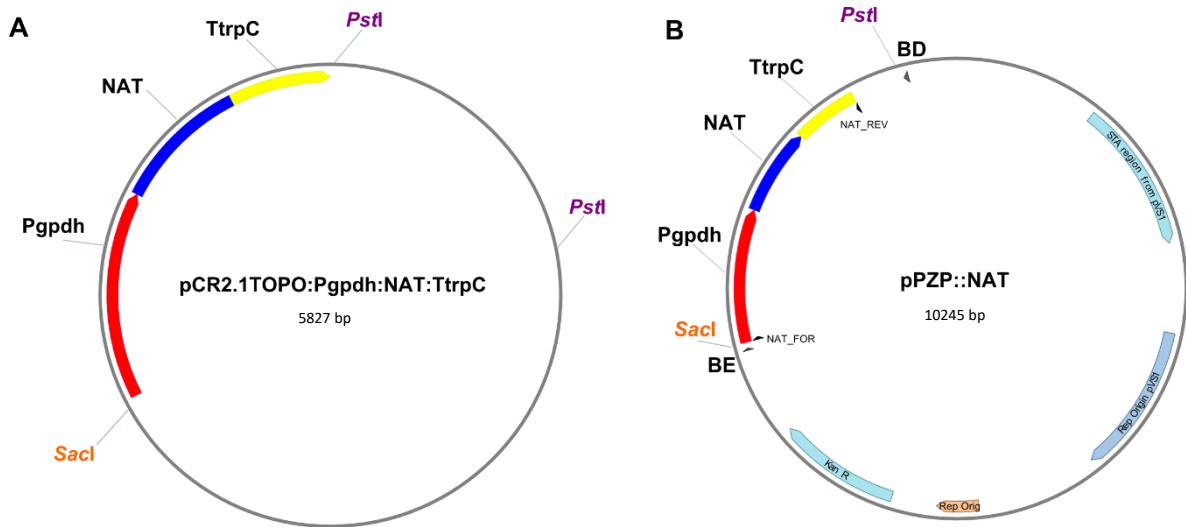


Figura 9. Representação esquemática da construção do plasmídeo pPZP::NAT. (A) A sequência do gene *nat* a qual possui marca de resistência a aminoglicosídeo nourseotricina, juntamente com o promotor *Pgpdh* e o terminador *TtrpC* de *A. nidulans*, foram removidos do plasmídeo TOPO por meio de clivagem dos sítios de restrição *SacI* e *PstI*. (B) Subclonagem da sequência *Pgpdh*::*NAT*::*Ttrpc* no plasmídeo pPZP, que foi previamente linearizado com *SacI* e *PstI*.

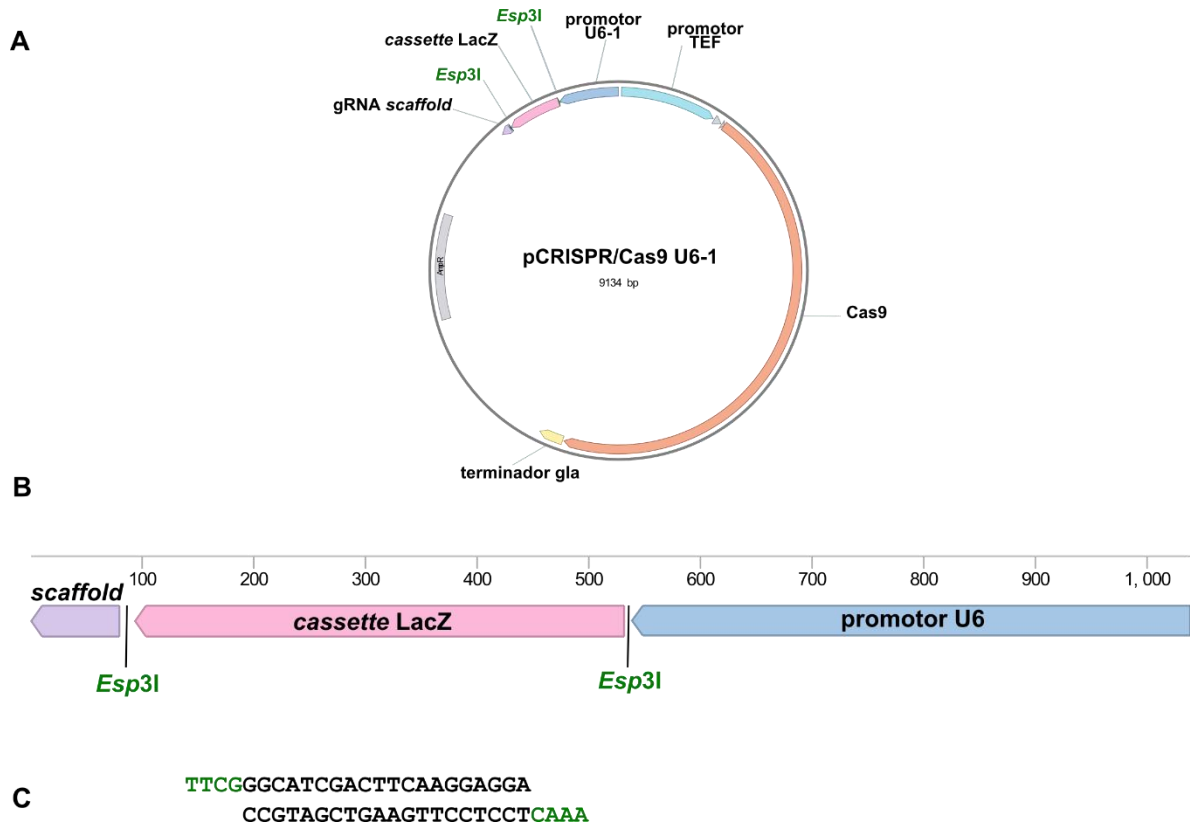


Figura 10. Representação esquemática da construção do RNA guia derivado do gene alvo a fim de direcionar a endonuclease Cas9 ao gene *gfp* (A) Plasmídeo pCRISPR/Cas9 U6. (B) Sequência removida de pCRISPR/Cas-U6 após a inserção pela técnica *Golden Gate cloning* (Arazoe *et al.*, 2015) das sequências de oligonucleotídeos aneladas, que substituem a região que contém a sequência *lacZ* a qual possui em suas extremidades dois sítios da enzima *Esp3I*, onde as sequências de 20 nucleotídeos são adicionadas. (C) Representação dos oligonucleotídeos que foram anelados no RNA guia.

A construção do plasmídeo foi confirmada através da clivagem com enzimas de restrição *Pst*I e *Xba*I (liberando uma banda de 600 pb), onde foi possível visualizar a inserção correta do RNA guia no vetor pPZP::NAT, conforme pode ser observado na Figura 11.

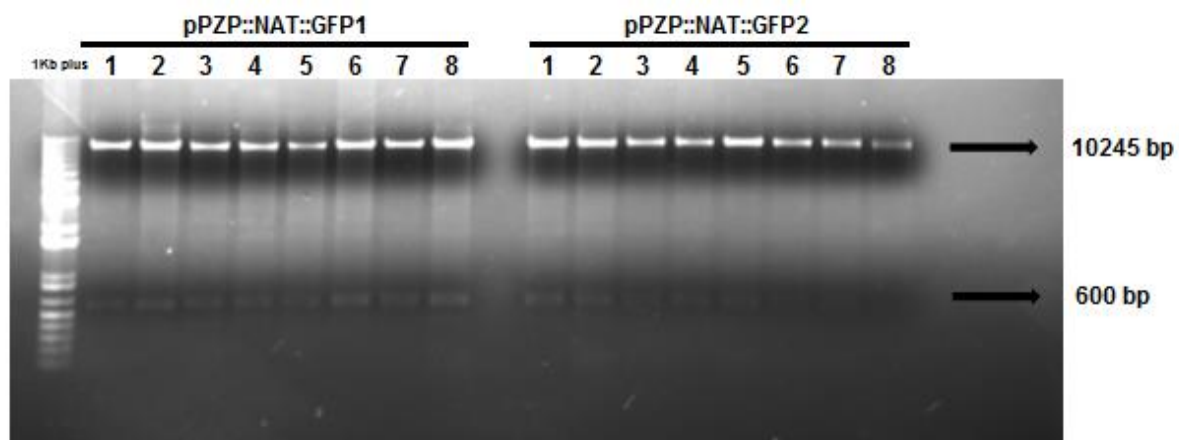


Figura 11 . Eletroforese em gel de agarose indicando a confirmação da obtenção de RNA guia: Através da clivagem pelas enzimas *Pst*I e *Xba*I há a liberação do RNA guia (600 pb) e a linearização do plasmídeo pPZP::NAT (10245 pb). Com a retirada do *lacZ* (438 pb), através do método "Golden Gate" foram inseridos os oligonucleotídeos no RNA guia formando uma sequência de 600 pb.

Foram construídos, posteriormente, vetores que expressam RNA guia os quais têm como alvo o gene *chimaB1* Para a construção dos RNAs guias, foi utilizada a ferramenta *CRISPR rgen* a fim de evitar *off-targets* (Figura 12).

4.2. Construção de transformantes em *M. anisopliae* que expressam constitutivamente a endonuclease Cas9

Para avaliar o comportamento fenotípico frente a expressão constitutiva da endonuclease Cas9, foram construídos mutantes que expressam de maneira constitutiva a endonuclease Cas9 por meio de agrotransformação. Os fungos empregados foram *M. anisopliae* que expressa a proteína GFP (Nakazato *et al.*, 2005) a fim de que o gene *gfp* seja nocauteado primeiramente para padronização do sistema CRISPR/Cas9 e também em *M. anisopliae* linhagem E6 a fim de desenvolver futuros estudos funcionais de genes específicos, como por exemplo genes de quitinases. O gene da endonuclease Cas9 foi previamente códon-otimizado para a expressão em fungos filamentosos por Arazoe *et al.*, (2015).

Para avaliar conduzir a expressão constitutiva, foi construído um plasmídeo a fim de expressar constitutivamente a endonuclease Cas9 via promotor constitutivo P_{tef} de *P. oryzae* (Promotor do gene *tef-1α*) e com o terminador foi utilizado Tgla (*Terminator of glucoamylase*) (Arazoe *et al.*, 2013). O gene *sur* foi utilizado como seleção o qual confere resistência à sulfoniluréia. Dessa construção, obtemos o plasmídeo pPZP::SUR::Cas9.

O plasmídeo pCRISPR/Cas-U6 foi elaborado com a finalidade de ser empregado no método de transformação por protoplastos de fungos filamentosos (Arazoe *et al.*, 2013), entretanto, o propósito desse trabalho é trazer pela primeira vez a tecnologia CRISPR/Cas9 mediada por agrotransformação, dessa forma esta construção foi feita com a retirada da sequência inteira de Cas9 junto com seu promotor e terminador e subcloná-lo em um vetor binário pPZP próprio para agrotransformação onde foi possível desenvolver o vetor pPZP::SUR::Cas9 (Figura 13).

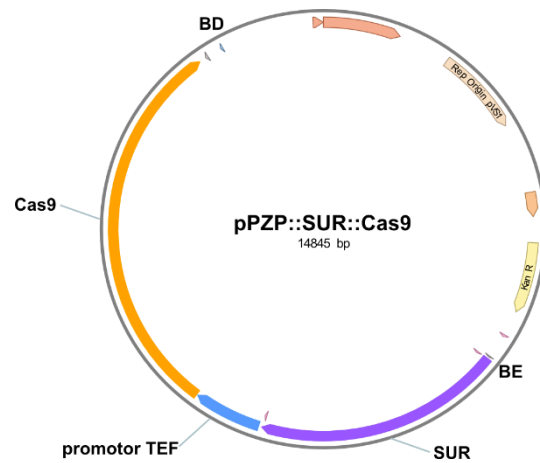
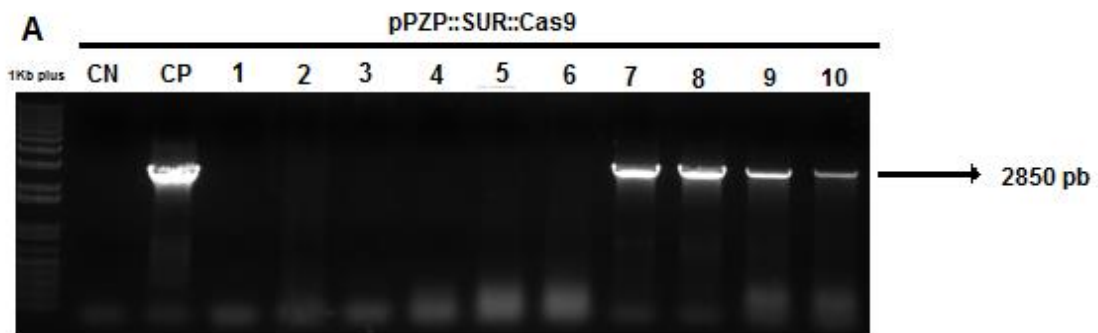


Figura 13. Representação esquemática do plasmídeo pPZP::SUR::Cas9 o qual foi inserido no genoma de *M. anisopliae* por agrotransformação.

A inserção do plasmídeo foi confirmada por meio de amplificação por PCR utilizando os primers SUR_REV e SUR_FOR (Figura 14). Conforme pode ser observado na Figura 14, é possível visualizar a banda de 2.850 pb correspondente ao *cassette* de expressão de Cas9.



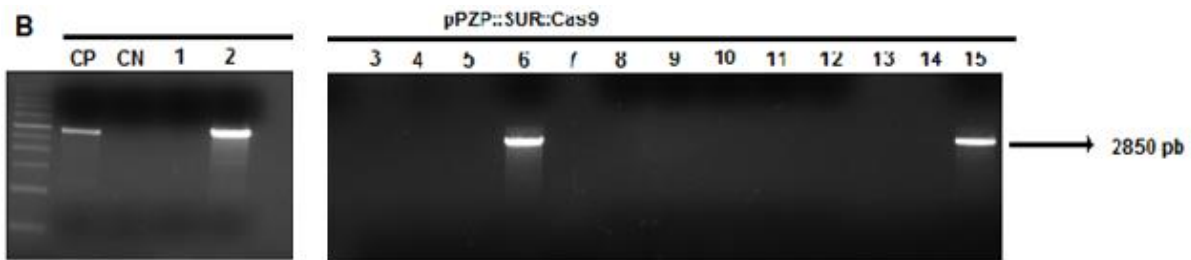


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose indicando a confirmação da inserção de **pPZP::SUR::Cas9** no genoma de *M. anisopliae* (A) Confirmação PCR da inserção do plasmídeo pPZP::SUR::Cas9 em *A. tumefaciens*. (B) Após a agrotransformação foi feito PCR de confirmação da presença da sequência do gene *sur* no DNA genômico das colônias selecionadas de *M. anisopliae*.

4.3. RNAi (*dual promoter*) mediado por ATMT

Para realizar uma comparação entre nocaute e silenciamento pós-transcricional a metodologia de RNAi (*dual promoter*) foi realizada paralelamente para avaliar o silenciamento pós-transcricional do gene *gfp* como gene repórter da linhagem *M. anisopliae* GFP+. Em relação à técnica RNAi, foi viabilizada a técnica de *dual promoter* que consiste na transcrição independente de RNA a partir de dois promotores em direção oposta específicos para RNA pol II. Foram utilizados os promotores (*P_{trpc}* e *P_{gpd}*). Foi selecionada uma região do gene *gfp* contendo 420 pb, a qual foi clonada entre os dois promotores previamente citados. O gene *gfp* possui 784 pb. A partir dessa construção foi possível obter o plasmídeo pPZP::SUR::DP::GFP (Figura 15), apresentando como marca de resistência o gene *sur* o qual confere resistência a sulfoniluréia. O *knockdown* gênico foi viabilizado por meio de agrotransformação.

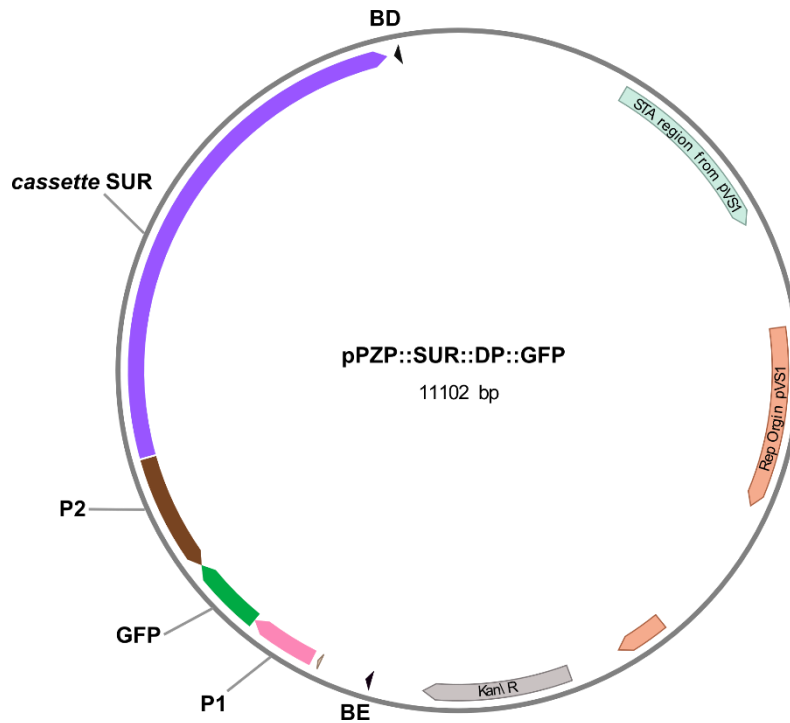


Figura 15. Representação esquemática do plasmídeo pPZP::SUR::DP::GFP. Para gerar duas fitas de mRNA a partir do gene *gfp* (em verde) foram utilizados dois promotores (P1 e P2). Os promotores P1 (rosa) e P2 (marrom) correspondem aos promotores P_{gpd} e P_{trpC} de *A. nidulans*. A marca de resistência escolhida para selecionar os fungos transformantes corresponde ao gene de resistência a clorimuron etil (*cassette* para expressão do gene *sur*, em roxo).

A partir da realização da agrotransformação, foi possível observar o silenciamento de GFP das primeiras linhagens de *M. anisopliae* que possuem *gfp* como gene repórter. As linhagens obtidas foram verificadas quanto a sua capacidade de emitir fluorescência em GFP, como pode ser observado na Figura 16.

A construção do plasmídeo com dois promotores opostos possibilitou a geração de interferência da expressão de GFP. A linhagem *M. anisopliae* (controle) que expressa GFP apresentou fluorescência normal quando exposta à luz UV por meio de microscopia. No entanto, as linhagens as quais a metodologia de RNAi foi empregada não apresentaram fluorescência quando exposta à luz UV por meio de microscopia.

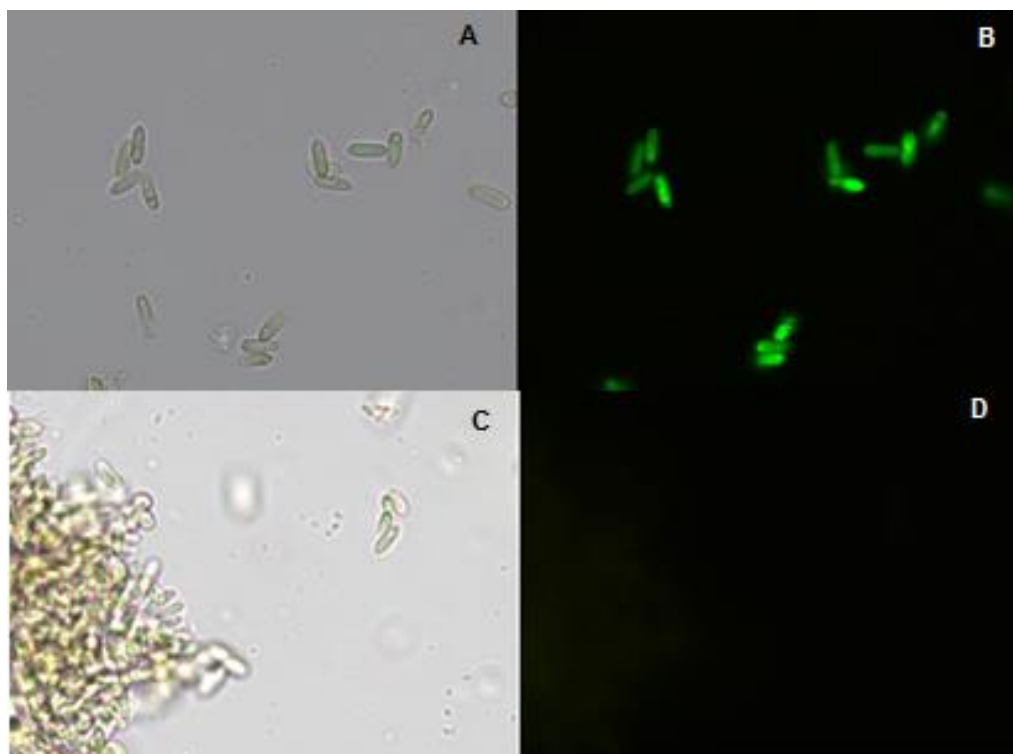


Figura 16. Silenciamento de *gfp* em *M. anisopliae* utilizando RNAi. Microscopia UV após agrotransformação do plasmídeo em *M. anisopliae* GFP+. (a) MaGFP+ campo claro (b) MaGFP+ (exposição UV) (c) MaGFP::RNAi+ campo claro (d) MaGFP::RNAi+ (exposição UV)

5. DISCUSSÃO

O sequenciamento do genoma de espécies de *Metarhizium*, as quais desenvolveram estilo de vida especialista ou generalista, está ampliando a compreensão da evolução da patogenicidade bem como ampliando a aplicação desses fungos como modelo de estudos. A partir da análise comparativa genômica das espécies de *Metarhizium* estão sendo identificados mecanismos novos e especializados de virulência, genes que codificam moléculas biologicamente ativas e genes responsáveis pela interação entre fungos, plantas e insetos (Wang *et al.*, 2016). O aumento dos estudos da relação entre os genomas de diferentes espécies vem proporcionando o aumento da informação sobre a função biológica de determinados genes. Suas funções podem ser investigadas mais detalhadamente pelo estudo funcional de um determinado gene por meio de sua inativação (Fuller *et al.*, 2015)

A construção de linhagens de fungos mutantes utilizando a técnica de recombinação homóloga para gerar nocautes gênicos é normalmente limitada e de baixa eficiência e essa baixa taxa de recombinação homóloga, a qual pode ser inferior a 5%, é um passo limitante para futuros progressos nas pesquisas (Ferreira *et al.*, 2006; Fuller *et al.*, 2015). Todavia, foram demonstradas taxas de disrupção gênica superiores a 50% por meio da metodologia CRISPR/Cas9 em fungos filamentosos, como por exemplo em *Aspergillus* spp. (Katayama *et al.*; 2015; Nodvig *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016), *Trichoderma reesei* (Liu *et al.*, 2015), *Neurospora crassa* (Matsura *et al.*, 2015) e *Pyricularia oryzae* (Araoz *et al.*, 2015).

No presente trabalho, foi construído um sistema de vetores para realizar edições gênicas com a finalidade de desenvolver estudos funcionais em fungos filamentosos entomopatogênicos *M. anisopliae*. As construções foram feitas em vetores binários específicos (pPZP) para que o emprego da metodologia CRISPR/Cas9 seja por meio de agrotransformação. Esta é a primeira vez que a metodologia CRISPR/Cas9 é elaborada a partir de agrotransformação a qual foi adotada dado que o emprego do método ATMT resulta em transformantes integrativos

estáveis e produz os mais altos níveis de transformação em comparação com outras técnicas de transformação. Por exemplo, o níveis de transformação chega a ser até 140 vezes superior à frequência de transformação mediada por protoplastos (Meyer *et al.*, 2013).

Para a elaboração da metodologia CRISPR/Cas9, primeiramente foi realizada a construção de fungos os quais expressam a endonuclease Cas9 códon-otimizada para fungos filamentosos utilizando uma linhagem de *M. anisopliae* que possui o gene repórter *gfp* o qual expressa de maneira constitutiva a proteína GFP (Nakazato *et al.*, 2005) e também em *M. anisopliae* linhagem E6 a fim de disponibilizar linhagens de fungos que expressam constitutivamente a proteína Cas9 com o objetivo de realizar futuros estudos de funções gênicas em novas pesquisas.

A fim de otimizar a metodologia CRISPR/Cas9, alguns trabalhos buscaram como alternativa gerar linhagens transgênicas que expressam a endonuclease Cas9 com o objetivo de obter organismos modelos próprios e preparados para a introdução do *cassette* de expressão de diferentes gRNAs, como por exemplo, *Drosophila melanogaster* (Kondo & Ueda *et al.*, 2013), *Caenorhabditis elegans* (Liu *et al.*, 2014), *Nicotiana benthamiana* (Yin *et al.*, 2015), *Dario rerio* (Yin *et al.*, 2015). Em fungos, foi construída uma linhagem de *Aspergillus fumigatus* que expressa via promotor constitutivo *tef1*, Cas9 códon-otimizada para humanos e a transformação foi mediada por protoplastos. Como resultado, foi demonstrado que *A. fumigatus* que expressam Cas9 podem ser utilizados como modelo dentro de uma plataforma de varredura, dado que estes transformantes exibiram taxa de crescimento e desenvolvimento normal, homeostase da parede celular, sensibilidade a antifúngicos e virulência padrão em modelos murinos (Fuller *et al.*, 2015).

Com o objetivo de promover nocaute gênico do gene *gfp* na linhagem de *M. anisopliae* que possui o gene repórter *gfp*, foram selecionadas quatro regiões distintas ao longo dos *loci* para a elaboração do RNA guia a fim de avaliar a ocorrência da variação de eficiência do sistema CRISPR/Cas9 em relação à taxa de nocaute gênico em diferentes *loci* do gene alvo (Figura 8). Um trabalho realizado em *P. oryzae* exibiu

diferença na eficiência de nocaute do sistema CRISPR/Cas9 quando comparadas as construções de RNA guias em diferentes *loci*, por exemplo, a diferentes construções apresentaram alteração de ~30% na taxa de transformantes (Araoz *et al.*, 2015). Dessa maneira, é importante considerar a realização do nocaute pela metodologia CRISPR/Cas9 em diferentes *loci* gênicos ao elaborar as construções de RNA guia.

Para a seleção do *locus* na elaboração da construção do RNA guia é importante realizar uma análise computacional dos *loci* a fim de evitar a ocorrência de nocaute em regiões *off-targets* durante a aplicação do sistema CRISPR/Cas9. Para esses fins, foram desenvolvidas algumas ferramentas computacionais como por exemplo, *Benchling CRISPR gRNA Design* (Chia *et al.*, 2016), *Cas-OFFinder* (Bae *et al.*, 2014), *CRISPR Design* (Hsu *et al.*, 2013), *DESKGEN* (Hough *et al.*, 2016), *Off-Spotter* (Pliatsika *et al.*, 2015), *sgRNA Designer* (Liu *et al.*, 2015) entre outros.

O presente trabalho foi elaborado por meio da utilização de *Benchling CRISPR gRNA Design* (Chia *et al.*, 2016) o qual foi utilizado para realizar as construções de sistema de vetores a fim de executar a metodologia CRISPR/Cas9 para obtenção de transformantes em *M. anisopliae*, como por exemplo pPZP::SUR::Cas9, pPZP::NAT::GFP1, pPZP::NAT::GFP2, pPZP::NAT::GFP3 e pPZP::NAT::GFP4.

A construção do RNA guia foi realizada pela seleção de *loci* específicos do gene *gfp* bem como *chimaB1* por meio do auxílio do aplicativo computacional *Cas-OFFinder* (Bae *et al.*, 2014) o qual exibiu a seleção das regiões dos genes as quais teriam baixa probabilidade de se ligar à um *locus* de um gene que não foi selecionado para o desenvolvimento da metodologia. Para a seleção das sequências alvos, o aplicativo foi programado a partir do genoma de *M. anisopliae* linhagem E6.

Foi desenvolvida, paralelamente a metodologia de RNAi, uma técnica de silenciamento pós-transcricional mediada por sequências de RNAs os quais necessitam da proteína Argonauta/Piwi como componente central do complexo de silenciamento (RISC) (Carmell *et al.*, 2002; Cerutti *et al.*, 2006)

Dentre as metodologias empregadas do sistema RNAi, dois tipos de construção são os mais comumente utilizados para desenvolvimento de silenciamento: RNAi mediada por *Hairpin* e RNAi mediada por *Dual Promoter*. Embora o silenciamento mediado por RNA *hairpin* seja eficiente, o sistema de construção pode ser longo o que pode limitar sua aplicação de análise em larga escala (Dang *et al.*, 2011).

No presente trabalho, foi feita a construção baseada em promotor duplo. Nesse sistema, uma sequência do gene *gfp* (420 pb) foi clonada entre os dois promotores em direções opostas onde a transcrição ocorre nas duas direções opostas, dessa maneira tanto a fita senso como a anti-senso são transcritas simultaneamente ocorrendo a formação de um RNA dupla fita (Ziv *et al.*, 2010). Este método é apropriado para análises em larga escala e sua construção foi relativamente simples e configurou-se como uma possibilidade para desenvolvimento de estudos funcionais em fungos filamentosos (Dang *et al.*, 2011).

Uma desvantagem do sistema, comparado com o sistema de RNAi induzido por *Dual Promoter* é que ele pode apresentar baixa eficiência comparada com a técnica de *hairpin*, pois a formação da dupla fita de RNA pode apresentar baixa eficiência (Rappleye *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2008). No entanto, foi demonstrado no presente trabalho por meio de microscopia, resultados prévios satisfatórios o qual apresentou uma taxa de silenciamento de 20% das colônias totais. A qual se mostra inicialmente com taxa de sucesso 4 vezes superior à técnica de Recombinação Homóloga. Ainda é necessária a confirmação dos resultados por meio de *Western Blot*.

6. CONCLUSÕES

- A endonuclease Cas9 foi clonada em *M. anisopliae* linhagem E6 bem como em *M. anisopliae* que expressa a proteína GFP.
- Foram construídos vetores que expressam RNA guia os quais contém as sequências derivadas dos genes *gfp* e *chimaB1*.
- Foi construído um sistema de silenciamento pós-transcricional baseado no sistema de RNA de interferência que foi testado usando GFP como repórter.

7. PERSPECTIVAS

- Confirmar por meio de *Western Blot* a expressão da endonuclease Cas9 nos transformantes de *M. anisopliae* linhagem E6 e na linhagem que expressa GFP.
- Confirmar por meio de *Western Blot* a diminuição da expressão de GFP por meio da metodologia de RNAi nos transformantes de *M. anisopliae* que expressam GFP.
- Realizar agrotransformação das quatro construções dirigidas para o nocaute do genes *gfp* e *chimaB1* na linhagem de *M. anisopliae* que expressa Cas9, bem como realizar a comparação da eficácia do nocaute dos diferentes sítios.
- Realizar estudos funcionais em genes específicos que dão origem à quitinases, lipases e proteases.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. Moino Jr., S.B. Alves, R.B. Lopes, P.M.O.J. Neves, R.M. Pereira, S.A. Vieira External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis* *Sci. Agric.*, 59 (2) (2002), pp. 267–273

Adams, D.J., (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *microbiology* 150:2029-2035.

Alves SB (1998) Microbial control of insects. Publisher of the Foundation for Agrarian Studies Luiz de Queiroz Piracicaba. FEALQ. *Entomopathogenic Fungi* pp. 289-371.

Alves, S. B. (1998). *Controle microbiano de insetos*. Fealq.

Arakawa, H. (2016). A method to convert mRNA into a gRNA library for CRISPR/Cas9 editing of any organism. *Science Advances*, 2(8), e1600699.

Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, Ogawa T, Ohsato S, Arie T, Kuwata S (2015) Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol Bioeng.* 2015 Dec; 112(12):2543-9. doi: 10.1002/bit.25662. Epub

Arazoe T, Ohsato S, Arie T, Yoneyama K, Kuwata S. 2013. Construction of a system for exploring mitotic homologous recombination in the genome of *Pyricularia oryzae*. *J Gen Plant Pathol* 79(6):422–430.21.

Arras, S. D., Chua, S. M., Wizrah, M. S., Faint, J. A., Yap, A. S., & Fraser, J. A. (2016). Targeted genome editing via CRISPR in the pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 11(10), e0164322.

Arruda, W ., Lubeck, I., Schrank, A., Vainstein, MH. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 37: 231-244,2005.

Bae S., Park J., & Kim J.-S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473-1475 (2014).

Bae, S., Park, J., & Kim, J. S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, btu048

- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Bechara IJ, Destéfano RH, Bresil C, Messias CL (2011) Histopathological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). *Braz J Biol.* 2011 Feb; 71(1):91-8.
- Becker A, Schloder P, Steele JE, Wegener G. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 1996;52(5):433–9.
- Benjamin, M. A., Zhioua, E., & Ostfeld, R. S. (2002). Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisoplia* (*Deuteromycetes*) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (*Acari: Ixodidae*). *Journal of Medical Entomology*, 39(5), 723-728.
- Bidochka, M. J., Leger, R. J. S., & Roberts, D. W. (1997). Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129(S171), 213-224.
- Blanford, S., Chan, B. H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R. J., Read, A. F., & Thomas, M. B. (2005). Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 308(5728), 1638-1641.
- Bogo, M. R., Rota, C. A., Pinto Jr, H., Ocampos, M., Correa, C. T., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (1998). A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology*, 37(4), 221-225.
- Boldo, J. T. (2009). Estudos da função e regulação do gene CHI2 do fungo entomopatogénico *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (1883).
- Boldo, J. T; Junges, A; Amaral, K. B; Staats, C. C; Vainstein, M. H.; Schrank, A. (2009) Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics*, v. 55, p. 551-560.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561.
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.

- Braga GU, Destefano RH, Messias CL. (1999) Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *J Invertebr Pathol* 74(2):112–9
- Breunig KD, Bolotin-Fukuhara M, Bianchi MM, Bourgarel D, Falcone C, Ferrero II, *et al.* (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb Technol* 26(9–10):771–80.
- Brooks, A. J., & Wall, R. (2001). Infection of Psoroptes mites with the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental & applied acarology*, 25(10-11), 869-880.
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V. & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960–964
- Bushley, K. E., & Turgeon, B. G. (2010). Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships. *BMC Evolutionary Biology*, 10.
- Callejas-Negrete, O. A., Torres-Guzmán, J. C., Padilla-Guerrero, I. E., Esquivel-Naranjo, U., Padilla-Ballesteros, M. F., García-Tapia, A., Schrank, A., Salazar-Solís, E., Gutiérrez-Corona, F., and González-Hernández, G. A. (2015). The *Adh1* gene of the fungus *Metarhizium anisopliae* is expressed during insect colonization and required for full virulence. *Microbiol. Res.* 172:57-67.
- Carmell, M. A., Z. Xuan, M. Q. Zhang, and G. J. Hannon. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control,
- Cerutti, H., and J. A. Casas-Mollano. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.* 50:81–99.
- Charnley, A. K., & Leger, R. S. (1991). The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals* (pp. 267-286). *Springer US*.
- Chaverocche MK¹, Ghigo JM, d'Enfert C. (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 15; 28(22): e97.
- Chia, D. (2016). A comprehensive and informative platform package for genome editing using the CRISPR-Cas9 system. *Express Biology*, 1(1), 16-25.
- Clarkson JM, Charnley AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* 1996;4(5):197–203.

- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Da Costa, G. L., Sarquis, M. I. M., De Moraes, A. M. L., & Bittencourt, V. R. E. P. (2002). Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, 154(4), 207-209.
- da Silva, M. V., Santi, L., Staats, C. C., da Costa, A. M., Colodel, E. M., Driemeier, D. & Schrank, A. (2005). Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in microbiology*, 156(3), 382-392.
- Dahiya, N., Tewari, R., & Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(6), 773-782..
- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic cell*, 10(9), 1148-1155.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, gkt135.
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(02), 134-150.
- Duo-Chuan, L. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161(6), 345-360.
- Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Schrank, I. S., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2004). Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology*, 155(4), 245-251.
- Dykxhoorn, D. M.; Lieberman, J. The Silent Revolution:RNA Interference as Basic Biology, Research Tool, and Therapeutic. *Annu. Rev. Med.* 2005, 56, 401–423.
- Ferreira, A. B., & Glass, N. L. (1996). PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genetics Newsletter*, 25-26.

- Frazzon, Ana Paula Guedes, *et al.* "In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*." *Veterinary parasitology* 94.1 (2000): 117-125.
- Freimoser, F. M., Jensen, A. B., Tuor, U., Aebi, M., & Eilenberg, J. (2001). Isolation and in vitro cultivation of the aphid pathogenic fungus *Entomophthora planchoniana*. *Canadian journal of microbiology*, 47(12), 1082-1087.
- Freimoser, F.M., Hu, G. and St Leger, R.J. (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology (Read.)* 151,361–371.
- Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell*, 14(11), 1073-1080.
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., ... & Peng, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet*, 7(1), e1001264.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.E., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magada ´n, A.H., and Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67–71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586.
- Gillespie, J. P. *et al.* (2000) Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 49–68.
- Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguilera, G., de Vienne, D. M....Giraud, T. (2014). Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Molecular Ecology*, 23, 753e773.
- Goettel, M. S., & Inglis, G. D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In "Manual of Techniques in Insect Pathology"(LA Lacey, Ed.) pp. 213–249.
- Gruber, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, 158(1), 26-34.
- Grundy, G. J., Moulding, H. A., Caldecott, K. W., & Rulten, S. L. (2014). One ring to bring them all—the role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA repair*, 17, 30-38..

- Hefferin ML, Tomkinson AE: Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair* 2005, 4(6):639–648.
- Hough, S. H., Ajetunmobi, A., Brody, L., Humphryes-Kirilov, N., & Perello, E. (2016). *Desktop Genetics*
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013). "DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases". *Nat. Biotechnol.* 31 (9): 827–32
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Hu, X., Xiao, G. H., Zheng, P., Shang, Y. F., Su, Y., Zhang, X. Y....Wang, C. (2014). Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and hostadaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 16796e16801
- Hutchinson, R. (2005) <http://www.roberth.u-net.com/ectoskel.htm>. 30 de agosto
- Idnurm A, Reedy JL, Nussbaum JC, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryot Cell* 2004; 3:420–9. *Cell Research* (2006) 16: 31–44. doi:10.1038/sj.cr.7310006; published online 16 January 2006.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429-5433. ISSN 0021-9193. PMID 3316184.
- Jansen R1, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43 (6): 1565-1575. DOI:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x. ISSN 1365-2958.
- Jiang D, Zhu W, Wang Y, Sun C, Zhang KQ, Yang J. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnol Adv* 2013; 31: 1562–1574
- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31: 233-239.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.

Science. 2012 Aug 17; 337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28..

Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *elife*, 2, e00471.

Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., ... & Kaplan, M. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997.

Juárez, M. P., Crespo, R., Fernández, G. C., Lecuona, R., & Cafferata, L. F. (2000). Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas disease vector. *Journal of invertebrate pathology*, 76(3), 198-207.

Junges, Â., Boldo, J. T., Souza, B. K., Guedes, R. L. M., Sbaraini, N., Kmetzsch, L., ... & Vainstein, M. H. (2014). Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *PLoS one*, 9(9), e107864.

Kanga, L. H. B., James, R. R., & Boucias, D. G. (2002). *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of invertebrate pathology*, 81(3), 175-184.

Kanga, L. H. B., Jones, W. A., & James, R. R. (2003). Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (*Deuteromycetes: Hyphomycetes*) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (*Acari: Varroidae*) in honey bee, *Apis mellifera* (*Hymenoptera: Apidae*) colonies. *Journal of economic entomology*, 96(4), 1091-1099.

Kassner, P. D. Discovery of Novel Targets with HighThroughput RNA Interference Screening. *Comb. Chem. High Through. Screen.* 2008, 11 (3), 175–184.

Kim, K. H., Willger, S. D., Park, S. W., Puttikamonkul, S., Grahl, N., Cho, Y.... Lawrence, C. B. (2009). TmpL, a transmembrane protein required for intracellular redox homeostasis and virulence in a plant and an animal fungal pathogen. *PLoS Pathogens*, 5.

Kondo, S., & Ueda, R. (2013). Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 195(3), 715-721.

Li, Y., Hsiang, T., Yang, R. H., Hu, X. D., Wang, K., Wang, W. J., ... & Yao, Y. J. (2016). Comparison of different sequencing and assembly strategies for a repeat-rich fungal genome, *Ophiocordyceps sinensis*. *Journal of Microbiological Methods*, 128, 1-6.

Liu R, Chen L, Jiang Y, Zhou Z, Zou G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discov.* 2015;1: 15007. doi: 10.1038/celldisc.2015.7.

- Liu, H., Wei, Z., Dominguez, A., Li, Y., Wang, X., & Qi, L. S. (2015). CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*, *btv423*.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., ... & van der Oost, J. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(6), 467-477.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., ... & Horvath, P. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*.
- Malagočka, J., Grell, M. N., Lange, L., Eilenberg, J., & Jensen, A. B. (2015). Transcriptome of an entomophthorean fungus (*Pandora formicae*) shows molecular machinery adjusted for successful host exploitation and transmission. *Journal of Invertebrate Pathology*, *128*, 47e56.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*.2013;10:957–963. doi: 10.1038/nmeth.2649.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, *339*(6121), 823-826.
- Malina, A., Katigbak, A., Cencic, R., Maiga, R. I., Robert, F., Miura, H., *et al.* (2014). Adapting CRISPR/Cas9 for functional genomics screens. *Methods Enzymol*. *546*, 193–213.
- Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. Self versus nonself discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* *463*, 568–571 (2010).
- Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *staphylococci* by targeting DNA. *Science* *322*, 1843–1845
- Matsu-ura, T. *et al.*, 2015. Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biol. Biotechnol.* *2*, 1–7.
- Meyer V, Mueller D, Strowig T, Stahl U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet* 2003; *43*:371–7.
- Meyer, J.R. (2005) <http://www.cals.ncsu.edu:8050/course/ent425/tutorial/integ.html>. 30 de agosto.
- Merkling, S. H.; van Rij, R. P. Beyond RNAi: Antiviral Defense Strategies in *Drosophila* and Mosquito. *J. Insect Physiol.* 2013, *59* (2), 159–170.

Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C. A., & Mitchell, A. P. (2016). *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. *mSphere*, 1(3), e00130-16.

Mohr, S. E.; Smith, J. A.; Shamu, C. E.; et al. RNAi Screening Comes of Age: Improved Techniques and Complementary Approaches. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* 2014, 15 (9), 591– 600.

Moino Jr, A., Alves, S. B., Lopes, R. B., Neves, P. M. O. J., Pereira, R. M., & Vieira, S. A. (2002). External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia agricola*, 59(2), 267-273.

Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol April* 2000;36(1):244–6.

Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. & Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155, 733–740 (2009).

Mol. Microbiol. 53:153–165.

Muangsan, N., & Robertson, D. (2004). Geminivirus vectors for transient gene silencing in plants. *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols*, 101-115.

Nakazato, L., Dutra, V., Broetto, L., Staats, C. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2006). Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1α* homologous promoter. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(3), 521-528.

Nguyen, Q. B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S., & Nakayashiki, H. (2008). Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Molecular microbiology*, 68(6), 1348-1365.

Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., and Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156, 935–949.

Nødvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E., Mortensen, U.H., 2015. A CRISPR–Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* 10, e0133085

Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., & Doudna, J. A. (2014). Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature structural & molecular biology*, 21(6), 528-534.

Onofre, S. B., Miniuk, C. M., Barros, N. M. D., & Azevedo, J. L. (2001). Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes. *Scientia Agricola*, 58(3), 613-616.

Pannabecker TL, Andrews F, Beyenbach KW (1992) A quantitative analysis of the osmolytes in the haemolymph of the larval gypsy moth, *Lymantria dispar*, *J Insect Physiol* 38: 823–830.

Passos, G. A. ; Hernandez C. A. S. ; Sousa L. C. ; Felicio R. F. M. ; Souza T. A. J. . Aplicações da técnica (Cap 4). In: Tiago Campos Pereira. (Org.). Introdução à técnica de CRISPR. 1ed.Ribeirão Preto: *Sociedade Brasileira de Genética*, 2016, v. 1, p. 71-83.

Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7), 473-483.

Pattemore, J. A., Hane, J. K., Williams, A. H., Wilson, B. A., Stodart, B. J., & Ash, G. J. (2014). The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC genomics*, 15(1), 1.

Pinto, A. D. S., Barreto, C. C., Vainstein, M. H., Schrank, A., & Ulhoa, C. J. (1997). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(4), 322-327.

Pliatsika, V., & Rigoutsos, I. (2015). “Off-Spotter”: very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biology direct*, 10(1), 1

Rappleye, C. A., Engle, J. T., & Goldman, W. E. (2004). RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for α -(1, 3)-glucan in virulence. *Molecular microbiology*, 53(1), 153-165.

Rao, D. D.; Vorhies, J. S.; Senzer, N.; et al. siRNA vs. shRNA: Similarities and Differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61 (9), 746–759.

Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE: RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)- glucan in virulence. *Mol Microbiol* 2004, 53:153-165.

Richter H, Randau L, Plagens A (2013) Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. *Int J Mol Sci* 14: 14518-14531.

Roberts, D. W. & St. Leger, R. J. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv. Appl. Microbiol.* 54, 1–70.

Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., & Nimrichter, L. (2014). The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *Journal of proteomics*, 97, 177-186.

- Sakuma, T., Nishikawa, A., Kume, S., Chayama, K., & Yamamoto, T. (2014). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific reports*, 4.
- Sambrook and D.W. Russell Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Vols 1,2 and 3, ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001,
- Samish, M., & Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual review of entomology*, 44(1), 159-182.
- Samuels, K. D. Z., Pinnock, D. E. & Allsopp, P. G. (1989). The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (*Deutermycotina, Hyphomycetes*) as a biological control-agent of *Inopus rubriceps* (Macquart) (*Diptera, Stratiomyidae*). *J Aust Entomol Soc* 28, 69–74.
- Sbaraini N, Guedes RL, Andreis FC, Junges Â, de Moraes GL, Vainstein MH, de Vasconcelos AT, Schrank. A. Secondary metabolite gene clusters in the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*: genome identification and patterns of expression in a cuticle infection model. *BMC Genomics*. 2016 Oct 25;17(Suppl 8):736.).
- Scholte, E. J., Njiru, B. N., Smallegange, R. C., Takken, W., & Knols, B. G. (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* ss) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria journal*, 2(1), 1.
- Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 2010 Dec 15;56(7):1267-74. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.008. Epub 2010 Mar 16.
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274.
- Schuster M, Schweizer G, Reissmann S, Kahmann R (2015) Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genet Biol* 89:3–9
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, 22(1), 36-42.
- Shafie NH, Saleem M, Moses EJ, Razak SRA, Yusoff NM (2014) The CRISPR-Cas9 System: A New Dawn in Gene Editing. *J Bioanal Biomed* 06:045-048. doi:10.4172/1948-593X.1000109
- Shang, Y., Xiao, G., Zheng, P., Cen, K., Zhan, S., & Wang, C. (2016). Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome biology and evolution*, 8(5), 1374-1387.

- Smith, K. E., Wall, R., & French, N. P. (2000). The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. *Veterinary parasitology*, 92(2), 97-105.
- Spatafora, J. W., SUNG, G. H., SUNG, J. M., Hywel-Jones, N. L., & White, J. F. (2007). Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology*, 16(8), 1701-1711.
- St, L., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W., & Roberts, D. W. (1996). Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 907-912.
- St. Leger R.J., Joshi, L., and Roberts, D.W., Adaptation of Proteases and Carbohydrases of Saprophytic, Phytopathogenic, and Entomopathogenic Fungi to the Requirements of Their Ecological Niches, *Microbiology*, 1997, vol. 143, pp. 1983–1992.
- Staats, C. C., Junges, Â., Guedes, R. L. M., Thompson, C. E., de Moraes, G. L., Boldo, J. T., ... & da Paixão, R. L. D. A. (2014). Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC genomics*, 15(1), 1..
- Staats, C.C., Junges, A., Fitarelli, M. *et al.* Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae* *Appl Microbiol Biotechnol* (2007) 76: 945. doi:10.1007/s00253-007-1043-4.
- Steinhaus, E. A. (1975). *Disease in a minor chord: being a semihistorical and semibiographical account of a period in science when one could be happily yet seriously concerned with the diseases of lowly animals without backbones, especially the insects*. The Ohio State University Press. stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16:2733–2742.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., and Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67.the grass endophytes. *Mol Ecol.* 16: 1701–1711.
- Timmons, L., & Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705), 854-854.
- Van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M. G., & Eijsink, V. G. H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 8979-8984.
- Van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A: DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* 2002, 383(6):873–892.

- Varshney, G. K., & Burgess, S. M. (2016). DNA-guided genome editing using structure-guided endonucleases. *Genome Biology*, 17(1), 187. Gibson G, Muse SV. A primer of genome science (3rd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates (2009)
- Wang C, St Leger RJ. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Eukaryot Cell* 2005;4(5):937–47.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, et al. (2013) One step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas mediated genome engineering. *Cell* 153: 910-918.
- Wang, C., Hu, G., & Leger, R. J. S. (2005). Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 42(8), 704-718.
- Wang, J. B., Leger, R. S., & Wang, C. (2016). Chapter Three-Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. *Advances in genetics*, 94, 67-105.
- Wang, Y., Wei, D., Zhu, X., Pan, J., Zhang, P., Huo, L., & Zhu, X. (2016). A 'suicide'CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. *Scientific Reports*, 6.
- Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall’Agnol B, Klafke GM, Beys-da-Silva WO, Martins JR, Schrank A: Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet Parasitol.* 2015;207:302–8.
- Wyatt, G. R. (1961). The biochemistry of insect hemolymph. *Annual review of entomology*, 6(1), 75-102.
- Xia Y, Clarkson JM, Charnley AK. Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol* 2002a;80(3):139–47
- Xia, Y., Clarkson, J.M. & Charnley, K.A. Acid phosphatases of *Metarhizium anisopliae* during infection of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Arch Microbiol* (2001) 176: 427.
- Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., ... & Feng, M. G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific reports*, 2.
- Yen, M. T., Yang, J. H., & Mau, J. L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 15-21.

Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AY, Liu Y (2015) A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep* 5:14926

Zeeman AM, Kuyper M, Pronk JT, van Dijken JP, Steensma HY. Regulation of pyruvate metabolism in chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* 2000;16(7):611–20.

Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X., Zhang, S., ... & Zhao, G. P. (2011). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome biology*, 12(11), 1.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879-920.

Ziv, C., and O. Yarden. 2010. Gene silencing for functional analysis: assessing RNAi as a tool for manipulation of gene expression. *Methods Mol. Biol.*

CURRICULUM VITAE

OLIVEIRA, T. C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Thais Campos de Oliveira

Local e data de nascimento: Guarulhos, São Paulo, Brasil, 22/12/1981

Endereço profissional: Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos - Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Prédio 43421 - Avenida Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone profissional: Tel. (51) 3308-6071 / Fax (51) 3308-7309

E-mail: thacampos@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO: Ciências Farmacêuticas, (FOC – Faculdades Oswaldo Cruz, 2010) – São Paulo, SP, Brasil

3. ESTÁGIOS:

Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) – Hospital das Clínicas da FFM-USP (out/2007 – mai-2009)

Iniciação Científica (CNPq – PIBIC) – Instituto de Química, Departamento de Bioquímica – USP – Universidade de São Paulo (jan/2006 – jul-2007)

Estudo genômico do comportamento de organismos (células do pâncreas, pulmão e o fungo *Trichoderma reesei*) à diferentes estímulos ambientais. Sob orientação do Prof. Dr. Hamza Fahmi Ali El Dorry.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Menção Honrosa pela participação no prêmio Milton Krieger na área de Genética de Microorganismos.

Participação no Prêmio Milton Krieger na área de Genética de Microorganismos, com o trabalho intitulado “DEVELOPMENT OF CRISPR/CAS9 METHODOLOGY FOR THE GENERATION OF FUNCTIONAL MUTANTS IN *Metarhizium anisopliae*” autoria de OLIVEIRA, TC, JUNGES, A, STAATS, CC, SCHRANK, A, apresentado durante o GENÉTICA 2016 - Brazilian-International Congress of Genetics , em Caxambu, MG, período de 11 a 14 de Setembro de 2016.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

RAIA DROGASIL - 02/2010 a 01/2013 – Farmacêutica Co-responsável

VIGIPHARM - 05/2008 a 09/2009 – Analista de Farmacovigilância

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Capítulo de Livro - Introdução à técnica de CRISPR - SBG - Sociedade Brasileira de Genética – 2016

Referência:

BARROS, L. R. C. ; OLIVEIRA T. C. ; SCHRANK A. ; PEREIRA T. C. . Tópicos de Fronteira (Cap 12). In: Tiago Campos Pereira. (Org.). Introdução à técnica de CRISPR. 1ed.Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016, v. 1, p. 237-243.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Apresentação Oral e Exposição de Pôster no GENÉTICA 2016 - *Brazilian-International Congress of Genetics*, em Caxambu, MG, período de 11 a 14 de Setembro de 2016, do trabalho intitulado “DEVELOPMENT OF CRISPR/CAS9 METHODOLOGY FOR THE GENERATION OF FUNCTIONAL MUTANTS IN *Metarhizium anisopliae*” autoria de OLIVEIRA, TC, JUNGES, A, STAATS, CC, SCHRANK, A.

