

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO COMPLEXO RIBONUCLEOPROTÉICO
SGRNA: CAS9 EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INATIVADORA
DE GENES ALVO EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação

William Tadeu Santos da Silva

Porto Alegre

2022

**PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO COMPLEXO RIBONUCLEOPROTÉICO
SGRNA: CAS9 EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INATIVADORA
DE GENES ALVO EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

William Tadeu Santos da Silva

Orientador: Prof^o. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientador: Dr. Nicolau Sbaraini

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Santos da Silva, William Tadeu
PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO COMPLEXO
RIBONUCLEOPROTÉICO SGRNA: CAS9 EM *Escherichia coli* E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INATIVADORA DE GENES ALVO EM
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS / William Tadeu Santos da
Silva. -- 2022.

35 f.

Orientador: Charley Christian Staats.

Coorientador: Nicolau Sbaraini.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Fungos Entomopatogênicos. 2. CRISPR. 3. Mutantes
nulos. I. Christian Staats, Charley, orient. II.
Sbaraini, Nicolau, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

William Tadeu Santos da Silva

**PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO COMPLEXO RIBONUCLEOPROTÉICO
SGRNA: CAS9 EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INATIVADORA
DE GENES ALVO EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientador: Profº. Dr. Charley Christian Staats

Coorientador: Dr. Nicolau Sbaraini

Porto Alegre, Julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profº Dr. Charley Christian Staats
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Drª. Fernanda Cortez Lopes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Drª. Júlia Catarina Reuwsaat
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos da UFRGS, com apoio do CNPq, da CAPES e da FAPERGS.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a meus orientadores pela oportunidade de aprendizado.

Aos meus pais por sempre me apoiarem em minhas decisões, mesmo com todas as críticas envolvidas.

Aos meus familiares por fazerem do meu objetivo, o sonho deles.

Agradeço especialmente à minha companheira de vida, Alana, a quem definitivamente foi peça chave para que concluísse minha graduação. Te amo!

Enfim, agradeço e dedico esse trabalho à minha amada avó, Loeci (*in memorian*), que não pode se fazer presente nesse final de jornada, mas sempre estará comigo!

RESUMO

Considerado um organismo modelo para o estudo das interações patógeno-hospedeiro, *Metarhizium anisopliae* é um fungo filamentosso entomopatogênico amplamente utilizado no controle biológico de pragas. A caracterização de funções gênicas com a construção de mutantes nulos é uma das abordagens mais utilizadas para descrever os mecanismos de infecção de microrganismos. Entretanto, a geração de mutantes funcionais utilizando os métodos moleculares de geração de mutantes nulos por recombinação homóloga apresenta baixa eficiência em fungos filamentosos. Com o advento da era genômica, novas metodologias de edição de DNA vêm sendo testadas, dentre elas ganha notoriedade o sistema CRISPR, desenvolvido a partir de mecanismos moleculares do sistema imunológico bacteriano, no qual um RNA guia ligado à uma endonuclease direciona a clivagem do DNA alvo. Portanto, o presente estudo propõe avaliar a participação do gene *ChiMaD4* da família das quitinases, subgrupo D, na virulência de *M. anisopliae* a partir da construção de mutantes nulos do fungo utilizando do sistema CRISPR/Cas9. Para isso, foram construídos cassetes de inativação do locus do gene *ChiMaD4*, que foi clonado no vetor binário pPZP201BK, gerando os vetores pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Bar e pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Sur. Utilizando polietilenoglicol, foi realizada a transfecção dos protoplastos de *M. anisopliae* pelo sistema CRISPR. A utilização desse sistema para a geração de mutantes nulos se mostra como uma potencial solução para o aumento das taxas de recombinação. Contudo, observamos em nossos experimentos que a regeneração dos protoplastos transformados não ocorreu provavelmente devido a adaptações nos protocolos de transfecção entre diferentes microrganismos, o que evidencia a dificuldade de implementação de novas metodologias em organismos mais complexos. Avaliando os resultados obtidos a partir desse trabalho novas tentativas de geração de mutantes funcionais serão realizadas, utilizando diferentes protocolos a fim de estabelecer uma metodologia eficaz para o uso de CRISPR/Cas em fungos filamentosos.

Palavras-chave: *Metarhizium*; Mutantes nulos; ENGase; CRISPR; Cas9

ABSTRACT

Considered a model organism for the study of pathogen-host interactions, *Metarhizium anisopliae* is a species of entomopathogenic filamentous fungus widely used in the biological control of pests. The characterization of gene functions by the construction of null mutants is one of the most used approaches to describe the infection mechanisms of microorganisms. However, the generation of functional mutants using classical molecular methods of cloning, such as homologous recombination, presents low efficiency in filamentous fungi since non-homologous recombination is the main repair pathway of the DNA. With the advent of the genomic era, new DNA editing methodologies have been tested, such as the CRISPR system, developed from molecular mechanisms of the bacterial immune system, in which a guide RNA linked to an endonuclease directs the cleavage of the target DNA. Therefore, the present study proposes to evaluate the participation of the *ChiMaD4* gene, prospected from the D subgroup of the chitinase family, in the virulence of *M. anisopliae* from the construction of null mutants of the fungus using the CRISPR/Cas9 system as a transformation method. For this, deletion cassettes were constructed to interrupt the *ChiMaD4* gene locus, which was cloned into the pPZP201BK binary vector, generating the pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Bar and pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Sur vectors. Using polyethylene glycol, the transfection of *M. anisopliae* protoplasts by the CRISPR system was carried out. The use of this system for the generation of null mutants is shown as a potential solution to increase recombination rates. However, we observed in our experiments that the regeneration of transformed protoplasts probably did not occur due to adaptations in the transfection protocols between different microorganisms, which highlights the difficulty of implementing new methodologies in more complex organisms. Evaluating the results obtained from this work, new attempts to generate functional mutants will be performed, using different protocols in order to establish an effective methodology for the use of CRISPR/Cas in filamentous fungi.

Keywords: *Metarhizium*; Null mutants; ENGase; CRISPR; Cas9

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
Controle Biológico	10
O Fungo Entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
Mecanismos de infecção	13
Importância de enzimas na infecção	14
ENGases	15
O sistema CRISPR/Cas9	16
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVOS	20
Objetivo geral	20
Objetivos específicos	20
METODOLOGIA	21
Linhagens, Reagentes e Meios de Cultura.	21
<i>Cassetes de Deleção para a construção de Mutantes Funcionais.</i>	21
Clonagem do cassete Δ ChiMaD4 em vetor binário	22
Obtenção de protoplastos de <i>M. anisopliae</i> e transformação via CRISPR/Cas9	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

LISTA DE ABREVIACOES

- CAPES** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CNPq** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CRISPR** *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- DNA** cido Desoxirribonucleico
- ENGases** endo- β -N-acetilglucosaminidases
- ERAD:** *Endoplasmic-reticulum associated protein degradation*
- ESALQ** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
- FAPERGS** Fundação de Amparo  Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
- GH18** Glicosil Hidrolase 18
- GH73** Glicosil Hidrolase 73
- GH85** Glicosil Hidrolase 85
- GlcNAc** N-acetilglicosamina
- gRNA** RNA guia
- ITS** *Internal Transcribed Spacers*
- MCc** Meio de Cove Completo
- MEV** Micrografias de Varredura
- NHEJ** *non-homologous end joining*
- PCR** Proteína C-reativa
- PEG** Polietilenoglicol
- RNA** cido Ribonucleico
- SLIC** *Sequence and Ligation Independent Cloning*
- sgRNA** *single guide RNA*
- TALENs** *Transcription activator-like effector nucleases*
- UFRGS** Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- ZFNs** *Zinc-finger nucleases*

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTROLE BIOLÓGICO

O termo "controle biológico" foi usado pela primeira vez por Harry Scott Smith em 1919. Foi levado a um uso mais difundido pelo entomologista Paul H. DeBach, que trabalhou em pragas de culturas cítricas ao longo de sua vida. No entanto, a prática já era usada há séculos (DEBACH, 1964). O controle biológico é um fenômeno natural onde uma população de indivíduos de interesse tem seu número controlado pela ação de um inimigo natural. Tais adversários mantêm relações ecológicas desarmônicas, podendo ser empregados pelo homem, no intuito de controlar a população de uma praga alvo (FLINT et al., 1998). O controle biológico clássico consiste na introdução, controlada e proposital, de uma nova espécie em um ambiente não ocupado, para o controle de organismos não desejáveis, reestruturando assim este ambiente. Para ser mais eficaz no controle de uma praga, um agente de controle biológico requer uma habilidade colonizadora que lhe permita acompanhar as mudanças no habitat no espaço e no tempo. O controle é maior se o agente tiver persistência temporal para que possa manter sua população mesmo na ausência temporária da espécie-alvo, e se for um forrageiro oportunista, permitindo que ele explore rapidamente uma população da praga (FOLLET & DUAN, 2000).

Fungos entomopatogênicos são espécies cosmopolitas que podem ser encontradas associadas a plantas, mas também tem capacidade de infectar hospedeiros artrópodes. Estes organismos apresentam grande potencial econômico como agentes de controle biológico, sendo aplicados em formulações para controle de infestações importantes em diversas partes do mundo (SCHRANK et al., 2010, BEHIE et al., 2012, FARIA et al., 2007). Devido sua importância econômica, um dos focos de pesquisa em fungos entomopatogênicos têm sido a ilustração dos mecanismos que envolvem os fatores de virulência importantes para a interação com artrópodes. Espécies fúngicas como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* infectam com sucesso populações de hospedeiros suscetíveis, principalmente por meio da deposição de conídios na superfície dos mesmos. Há pesquisas contínuas para determinar as vias de sinalização entre esses fungos e seus alvos hospedeiros (MSEDDI et al., 2022; QUIROGA-CUBIDES et al., 2022; WU et

al., 2022). Afinal, a capacidade de detectar esses parasitas pode aumentar a aptidão para os alvos do hospedeiro. Há evidências de que o reconhecimento do sinal ocorre em alguns hospedeiros, mas não em outros. Por exemplo, o ectoparasitóide *Cephalonomia tarsalis* é suscetível a *B. bassiana*, mas não consegue detectar a presença de conídios livres ou hospedeiros vivos que foram infectados pelo fungo. Como eles não podem detectar esses parasitas, o hospedeiro ou a prole do hospedeiro são infectados e/ou morrem (LORD, 2001). Em contraste, os cupins são capazes de detectar e evitar algumas cepas letais de conídios de distintos fungos por meio de isolamento de indivíduos infectados, esse reconhecimento ocorre quando há estímulo químico não usual em partes das antenas de cupins operários, levando os indivíduos próximos a entrarem em uma espécie de frenesi de movimentos longitudinais oscilatórios, cercando e impedindo que o organismo infectado adentre a colônia (MYLES, 2002).

1.2 O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

M. anisopliae foi primeiramente isolado e descrito por Metschnikoff, em 1879, a partir de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*, como *Entomophthora anisopliae*. O gênero *Metarhizium* foi descrito em 1883 por Sorokin. Cosmopolita, variedades deste fungo podem ser encontradas mundialmente, sendo isolado principalmente de insetos infectados e do solo. São considerados fungos deuteromicetos pertencentes à classe Hiphomycete. Apresenta micélio hialino e septados, com conidióforos característicos, sobre os quais surgem conídios (normalmente uninucleados, cilíndricos de cor esverdeada e de dimensões variadas) em colunas compactas (Figura 1) (ZIMMERMANN, 2007; BISCHOFF et al, 2009).

A primeira revisão taxonômica de *M. anisopliae* foi baseada em características morfológicas e revisada por Tulloch (1976) que aceitou apenas *M. flavoviridae* e *M. anisopliae*, sendo a segunda espécie subdividida em var. *anisopliae* ou var. *majus*, dependendo do tamanho dos conídios (ZIMMERMANN, 2007; DRIVER et al., 2000). Em 1994, outra tentativa de classificação baseada em características morfológicas e coloração dos conídios, propôs três espécies: *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M.*

album, com duas variedades: *M. anisopliae* var. *majus* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (CURRAN et al., 1994).

Nos anos 2000, utilizando de abordagens moleculares, mais uma tentativa de descrição do gênero foi feita, agora utilizando sequências de ITS (*internal transcribed spacers*). Tal análise levou à manutenção das espécies já descritas, porém acrescentou mais duas variedades a *M. anisopliae* e cinco a *M. flavoviride* (DRIVER, MILNER e TRUEMAN, 2000). Trabalhos mais recentes utilizando um número maior de marcadores moleculares discriminaram que o gênero é composto por 12 espécies (*M. anisopliae*; *M. acridum*; *M. brunneum*; *M. globosum*; *M. guizhouense*; *M. lepidiotae*; *M. majus*; *M. pinghaense*; *M. robertsii*; *M. album*; *M. flavoviride*; *M. frigidum*) (BISCHOFF, REHNER e HUMBER, 2006; 2009).

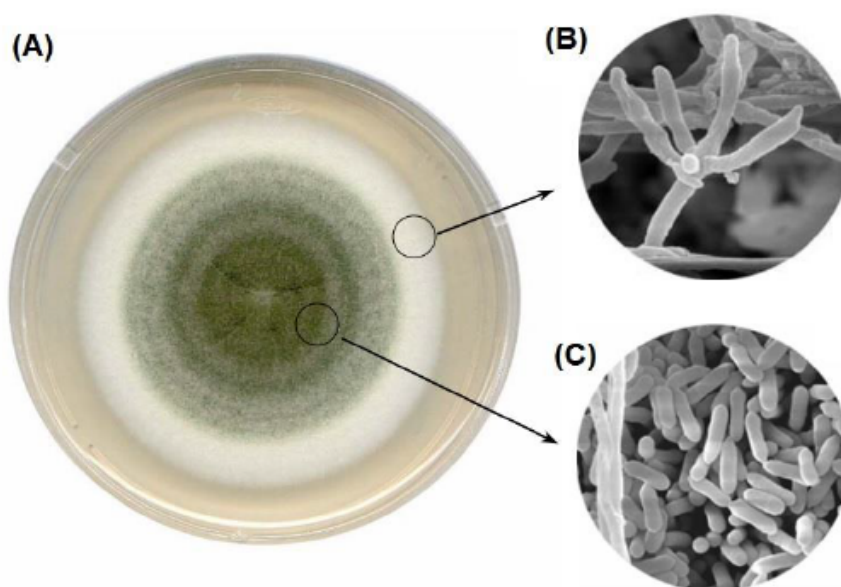


Figura 1. Aspectos morfológicos de *M. anisopliae* linhagem E6. Colônia após 21 dias de cultivo em meio de Cove completo (MCc) a 28°C. A) Micélio hialino de coloração branca na extremidade da colônia de onde emergem os conidióforos. B) Conidióforos. C) Esporos cilíndricos. As micrografias de varredura (MEV) são de autoria de Arruda et al., 2005.

M. anisopliae é considerado um organismo modelo para o estudo das interações entre entomopatógenos e o organismo infectado. Além disso, apresenta um amplo espectro de hospedeiros (mais de trezentas espécies somente nos artrópodes) e é muito utilizado como agente de controle biológico, pois muitos de

seus hospedeiros abrangem espécies-praga da agricultura e da pecuária e também vetores de doenças (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010).

1.3 MECANISMOS DE INFECÇÃO

O ciclo de infecção de *M. anisopliae* consiste em um processo multifatorial que envolve diversas etapas, resultando em uma infecção bastante eficiente (Figura 2). Embora existam descrições na literatura de infecção pós-ingestão, a penetração deste fungo independe da ingestão do mesmo pelo hospedeiro, ocorrendo uma penetração ativa na superfície do mesmo, sendo a carapaça a via de entrada preferencial do fungo (LEEMON & JONSSON, 2012).

A adesão do conídio à superfície do hospedeiro, sua germinação e posterior penetração são etapas chave no processo de infecção. Interações hidrofóbicas entre proteínas que recobrem o conídio e a camada lipídica dos artrópodes, e proteínas como hidrofobinas e adesinas desempenham um papel essencial no processo de adesão (WANG & ST LEGER, 2007; SEVIM et al., 2012).

A patogenicidade de *M. anisopliae* está, inicialmente, relacionada com a estratégia sinérgica de secretar uma combinação de enzimas hidrolíticas, responsáveis por degradar a cutícula do hospedeiro, associadas com a pressão mecânica exercida pelo apressório (hifa modificada) (STONE & BIDOCHKA, 2020). Assim, o processo de infecção de *M. anisopliae* começa com a adesão do conídio na superfície do hospedeiro seguido pela penetração ativa da cutícula. Todo este processo é dependente de características ambientais, da interação patógeno-hospedeiro e da estrutura, topologia e composição química da cutícula, interferindo na adesão dos conídios e conseqüentemente na patogenicidade (WANG & ST LEGER, 2020; STONE et al., 2020). Além disso, acredita-se que componentes específicos da cutícula dos artrópodes poderiam determinar a patogenicidade em diferentes hospedeiros (SANTI et al., 2010-b; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

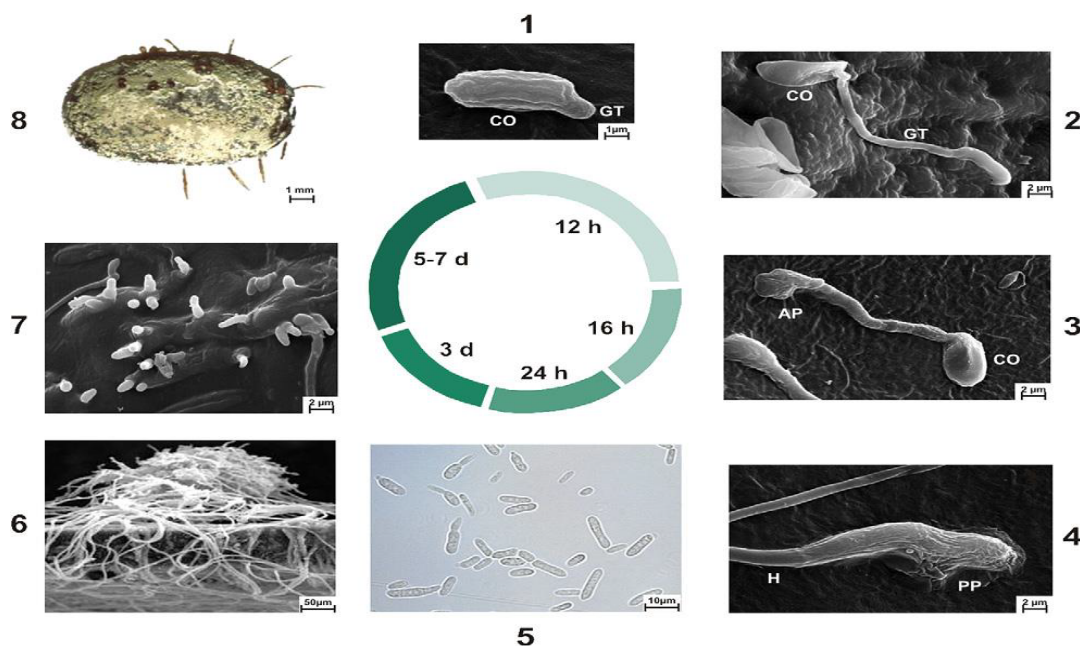


Figura 2. Ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae*. (1) Adesão do conídio na superfície do hospedeiro; (2) Germinação do conídio; (3) Diferenciação da extremidade apical do tubo germinativo em apressório; (4) Penetração; (5) Blastosporos na hemolinfa do artrópode; (6) Colonização; (7) Extrusão das hifas a partir do cadáver do inseto; (8) Conídios e conidióforos sobre a superfície do cadáver. CO- conídio, GT- tubo germinativo, AP- apressório, H- hifa, PP- penetração (Schrank & Vainstein, 2010).

1.4 IMPORTÂNCIA DE ENZIMAS NA INFECÇÃO

A infecção de *M. anisopliae* em seu hospedeiro é mediada por enzimas fundamentais neste processo. Desde o contato inicial com o seu hospedeiro essa espécie de fungo produz e secreta um complexo enzimático constituído principalmente por proteases, quitinases e lipases, que facilita a inserção do fungo na cutícula do inseto, que é a maior barreira física para a infecção (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2020).

As proteases estão ativamente envolvidas na hidrólise da fração proteica da cutícula e são consideradas fundamentais no processo de infecção do *M. anisopliae*. A protease Pr1, por exemplo, faz parte de uma série de proteases responsáveis pela degradação de proteínas complexadas com a quitina, que compõem a cutícula do hospedeiro, e sua atividade é regulada durante a formação do apressório e conidiogênese. A atividade extracelular de Pr1 necessária para a degradação da cutícula do hospedeiro é frequentemente usada como um marcador bioquímico de virulência fúngica contra espécies de pragas alvo (GAO et al., 2020).

As quitinases são uma classe de hidrolases que em fungos contribuem para a obtenção de nutrientes, na liberação dos esporos, na modificação da quitina da parede celular, na diferenciação e na morfogênese de hifas. Elas são produzidas nas etapas iniciais de penetração do fungo atuando sobre a quitina na cutícula dos insetos para facilitar a penetração do fungo. A produção destas enzimas é regulada por um sistema de indução e repressão, sendo indispensáveis quantidades mínimas da enzima para que a degradação do substrato inicie. Portanto, além das proteases, as quitinases apresentam importância para transposição da cutícula dos artrópodes pelo fungo, sendo fundamentais para o sucesso da patogênese (BOLDO et al., 2009).

Outro grupo de enzimas envolvidas na fase inicial de infecção são as lipases (BEYS DA SILVA et al., 2010-a; BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Estas enzimas foram detectadas durante as primeiras seis horas de infecção na superfície de hospedeiros (SANTI et al., 2010-a), levando a crer que sua atividade seja imprescindível no desencadeamento de todo o processo de infecção (BEYS DA SILVA et al., 2010-a). As lipases são importantes, pois a cutícula e o invólucro dos insetos contém gorduras, lipoproteínas e ceras e estas substâncias dificultam a adesão do conídio (LORD & HOWARD, 2004).

Coletivamente, estas enzimas, e potencialmente muitas outras, podem atuar em conjunto para solubilizar a cutícula do hospedeiro e favorecer a penetração do fungo, além de converter o tecido do inseto em nutrientes para seu crescimento (GEBREMARIAM et al., 2022).

1.4.1 ENGases

As *endo-β-N*-acetilglucosaminidases ou ENGases também chamadas de endohexosaminidases, são uma classe de enzimas (EC 3.2.1.96) identificadas pela primeira vez no início da década de 1970, e são produzidas por uma variedade de organismos, desde bactérias, fungos, e até mesmo por humanos (FAIRBANKS, 2017). As ENGases são membros das famílias GH18, GH73 e GH85 das glicosil hidrolases, e são classificadas dessa forma conforme a similaridade das suas estruturas terciárias, resíduos catalíticos e mecanismos de ação conservados (LOMBARD et al., 2014). Em relação à sua função celular, as ENGases são conhecidas por estarem envolvidas no catabolismo citosólico de oligossacarídeos

livres derivados do lúmen do retículo endoplasmático de eucariotos, provavelmente para maximizar a reutilização de açúcares nas células (SUZUKI, 1998).

Em bactérias, ENGases têm sido relatadas como envolvidas na aquisição de nutrientes para o crescimento bacteriano e nas respostas de defesa. Em fungos filamentosos, as ENGases foram consideradas importantes para o crescimento de hifas, esporulação e outros fins fisiológicos, contudo apenas a família GH18 é descrita para os mesmos. Em mixobactérias, ENGases são produzidas em maior concentração durante a fase de esporulação, podendo assim ter um papel importante no processo de esporulação em bactérias. No entanto, os papéis fisiológicos das ENGases ainda são pouco compreendidos (SUZUKI, 1998; ABBOTT, 2009; TAKEGAWA, 1989).

O interesse na família das ENGases vem crescendo devido sua capacidade em hidrolisar *N-glicanos* aderidos em glicoproteínas. Estas enzimas catalisam uma reação de hidrólise semelhante à das quitinases, porém diferem em relação ao tipo de substrato utilizado. Enquanto as quitinases hidrolisam homopolímeros de GlcNAc, as ENGases GH18 de fungos atuam sobre oligossacarídeos de proteínas N-glicosiladas, em um processo de deglicosilação (STALS et al., 2012). Trabalhos prévios do grupo (Junges *et al.*, 2012) mostram a existência de um subgrupo D, presente na família GH18, de ENGases nomeadas de *chimaD*, das quais o gene estudado neste trabalho, *chimaD4*, faz parte.

Sabe-se que a família GH85 das ENGases integram a rota de degradação de proteínas mal formadas, em animais e plantas (*ERAD: Endoplasmic-reticulum associated protein degradation*), além de exibir atividade hidrolítica no núcleo de diacetilquitobiose de N-glicanos e apresentar ação de transglicosilação (SUZUKI, 2002; KIMURA, 2011). Já as ENGases da família GH73 são as menos descritas, entretanto estudos demonstram sua atuação na hidrólise de peptideoglicana, constituinte da parede celular bacteriana, a qual contém GlcNAc (INAGAKI et al., 2009; RONHOLM et al., 2012).

1.5 O SISTEMA CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é uma ferramenta para edição gênica específica no genoma que foi desenvolvida a partir de mecanismos moleculares do sistema imunológico bacteriano. A estrutura genética do CRISPR é constituída de repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente espaçadas. Um RNA guia ligado à uma endonuclease Cas9 direciona a clivagem do DNA (Figura 3) alvo por meio do pareamento de 20 nucleotídeos (BARRANGOU, 2012; JINEK et al., 2012; CONG et al., 2013).

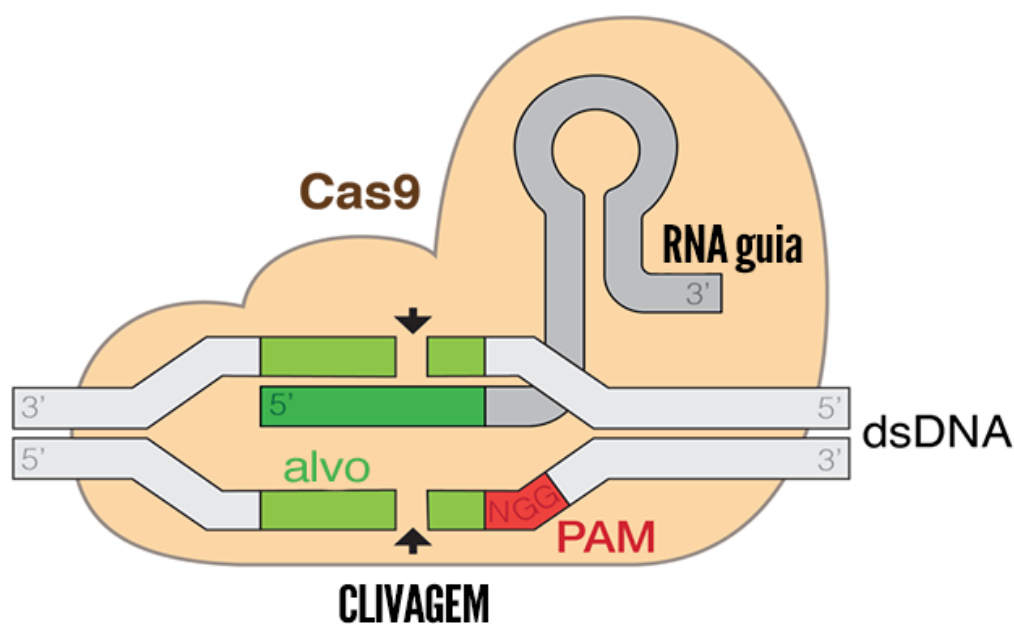


Figura 3 - Figura representativa do mecanismo de funcionamento do sistema CRISPR/Cas9.

Fonte: Genetics Home Reference.

Nesse sistema, o RNA guia contendo a sequência alvo se hibridiza à sequência complementar junto ao *locus* do DNA genômico a ser editado. Esta interação recruta a endonuclease Cas9. Assim, tanto a proteína Cas9 quanto o RNA guia, podem ser introduzidos *in vitro* em outras células com o auxílio de vetores ou agentes químicos, e direcionados a locais específicos do genoma, para que promovam quebras na fita dupla (PALERMO et al., 2017; RICHTER et al., 2013), as quais podem ser reparadas por vias como *non-homologous end joining* (NHEJ) ou recombinação homóloga, ocasionando mutações (RODGERS, 2016).

Entre as múltiplas aplicações do sistema CRISPR-Cas9, destacam-se as possibilidades de inserção ou deleção de bases no DNA de qualquer organismo alvo; inserção ou mesmo a troca de sequências específicas no genoma; produção

de grandes deleções ou rearranjos genômicos (inversões, translocações); ativação e repressão gênica; modificação de histonas; metilação de DNA; produção de proteínas fluorescentes e localização de genes no genoma (HSU et al., 2014; LI, D. et al., 2013; LI, W. et al., 2013; WANG et al., 2013). O complexo Cas9-gRNA montado *in vitro* ou Cas9 e gRNA expressos *in vivo* têm sido empregados para desativar genes, seguido de análises comparativas de metabólitos, morfologia celular, toxicidade e outras propriedades entre as cepas de tipo selvagem e de deleção para verificar as funções dos genes (LIAO et al., 2021).

Diversas dúvidas ainda existem sobre como o sistema CRISPR/Cas9 interage com os mecanismos naturais de reparo do DNA, qual a frequência e a amplitude dos efeitos fora do alvo (*off-target*), e qual o impacto da exposição das células ao sistema CRISPR durante longos períodos de tempo (LINO et al., 2018).

Em fungos filamentosos a utilização do sistema CRISPR/Cas9 apresenta dificuldade, quando comparado a seu uso em leveduras, por exemplo, devido à maior complexidade evolutiva do gênero. A diferenciação celular, morfologia multicelular, espessura das paredes celulares contendo quitina, além da falta de plasmídeos apropriados são obstáculos das pesquisas de aplicação do modelo CRISPR/Cas em fungos filamentosos (JIANG et al., 2013).

O sistema CRISPR/Cas9 foi aplicado com sucesso a fungos filamentosos pela primeira vez em 2015, quando Liu et al. editaram genes de *Trichoderma reesei* otimizando a transcrição da proteína Cas9 e a transcrição de gRNA *in vitro*. Em 2017 Nielsen et al. descobrem um novo gene em *Talaromyces atroroseus* responsável pela produção de produtos híbridos policetídeo-peptídeo não ribossomal usando a tecnologia CRISPR/Cas9. Recentemente, Steen et al. (2021) produziram um mutante nulo de *Metarhizium brunneum* com a abordagem CRISPR eliminando a síntese de α -hidroxietilamida de ácido lisérgico. Desde então, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido usada para edição de genoma em vários fungos filamentosos, como *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Magnaporthe oryzae*, *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis*, *Mucor circulaloides*, *Phytophthora sojae*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium chrysogenum* (LIAO et al., 2021).

2 JUSTIFICATIVA

O sistema CRISPR se apresenta como uma importante ferramenta para modificações específicas do genoma em inúmeras espécies (AKRAM et al, 2022). Composta por uma enzima endonuclease chamada Cas9 (que cliva o DNA) e uma fita de RNA guia (gRNA), a ferramenta forma um complexo ribonucleoproteico que funciona como guia, direcionando a enzima ao local de homologia no genoma.

A determinação do perfil transcricional e o estudo funcional de genes empregando a construção de mutantes nulos é um dos métodos mais utilizados em estudos realizados com *M. anisopliae*. Considerando o perfil de expressão de genes envolvidos na infecção, especula-se que o produto do gene *ChiMaD4* pode estar envolvido no processo de infecção. Portanto, a interrupção do locus de interesse via recombinação homóloga pode trazer indícios sobre a funcionalidade deste produto gênico no processo de infecção e interação do fungo com o hospedeiro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de *ChiMaD4* na virulência de *M. anisopliae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Construir *cassetes* para inativação do gene *ChiMaD4* .

Gerar mutantes nulos para o gene *ChiMaD4* em *Metarhizium anisopliae* utilizando o sistema CRISPR/Cas9.

4 METODOLOGIA

4.1 LINHAGENS, REAGENTES E MEIOS DE CULTURA.

A linhagem E6 de *M. anisopliae* foi escolhida para a construção dos mutantes funcionais. Tal linhagem foi obtida da coleção da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Brasil) e mantida em Meio de Cove completo (MCc) [nitrato de sódio 0,6%, glicose 1%, peptona 0,2%, extrato de levedura 0,05%, caseína hidrolisada 0,15%, pH 6,0]. São ainda acrescentados: 2% de Solução de Sais [KCl 2,6%, MgSO₄.7H₂O 2,6%, KH₂PO₄ 7,6% (m/v)] e 0,04% de Elementos Traços [Na₂B₄O₇.7H₂O 0,004%, CuSO₄.5H₂O 0,04%, FeSO₄ 0,0001%, MnSO₄ 0,08%, Na₂Mo₄.2H₂O 0,08%, ZnSO₄.7H₂O 0,08% (m/v)] e, quando realizado cultivo em meio sólido, foi adicionado 1,5 % de ágar (DUTRA et al., 2004). A linhagem TOP10 de *Escherichia coli* foi utilizada para as clonagens, obtidas da coleção própria do laboratório e propagadas no meio de cultura de Luria-Bertani (LB) com os antibióticos adequados (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Meios de cultura e reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Enzimas de restrição, e utilizadas para foram adquiridas da Promega (Fitchburg, WI, USA), Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), Life Technologies (Grand Island, NY, USA) ou GE Healthcare (Little Chalfont, UK).

4.2 CASSETES DE DELEÇÃO PARA A CONSTRUÇÃO DE MUTANTES FUNCIONAIS.

Foi construído um *cassete* de inativação para interromper o *locus* do gene *ChiMaD4* da linhagem E6 de *M. anisopliae*. Para isso, as regiões de aproximadamente 1.000 pb à montante e à jusante da região codificadora do gene, bem como os *cassetes* para expressão dos genes *bar* e *sur*, os quais conferem resistência à Glifosinato de amônio e *Chlorimuron-ethyl*, respectivamente, foram amplificadas utilizando primers específicos da família dos genes ChiMa, devido a similaridade nas sequências flanqueadoras dos genes do grupo (Tabela 1). Os *amplicons* obtidos foram utilizados para confecção de um fragmento de fusão empregando o método double-joint PCR (YU et al., 2004)(Figura 4), sendo o *cassete* de deleção amplificado com os primers *Nested* presentes na coleção do laboratório, gerando, então, os *cassetes* Δ ChiMaD4Bar e Δ ChiMaD4Sur.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para as construções do vetor

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA (5' → 3')
BAR_1880_FOR	CTGTACAGTGACCGGTGACT
BAR_1880_REV	GAGTAAAGAAGAGGAGCATG
SUR_FOR	TCGACGTGCCAACGCCACAG
SUR_REV	TCGACGTGGAGAGCATGCAATTC
D3_3FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTCGGAGTCGGGCTTCCCATC
D3_5REV	TGCCAGAAAGAGTCAACCGGTCCTGTACAGGCTTCCAGCCTGTGGTCTGC
chiD3qPCR_F1	TGGTGGCTGGACAGCTTTCTTC
chiD3qPCR_R1	ACCTCCAAGGTTTCATCCATGCC
D3_5FOR	GAGAGCCAGGATTCTGGCTT
D3_3REV	GTGAGTGGCTTTGTTATGTC
D4_NESTED_HindIII_F	AGAGGCCTAGGCGCGCCATGGATGCCGACACTAGTCAC
D4_NESTED_HindIII_R	AAACGACGGCCAGTGCCAATGAACAATGTTCCAAGCCC

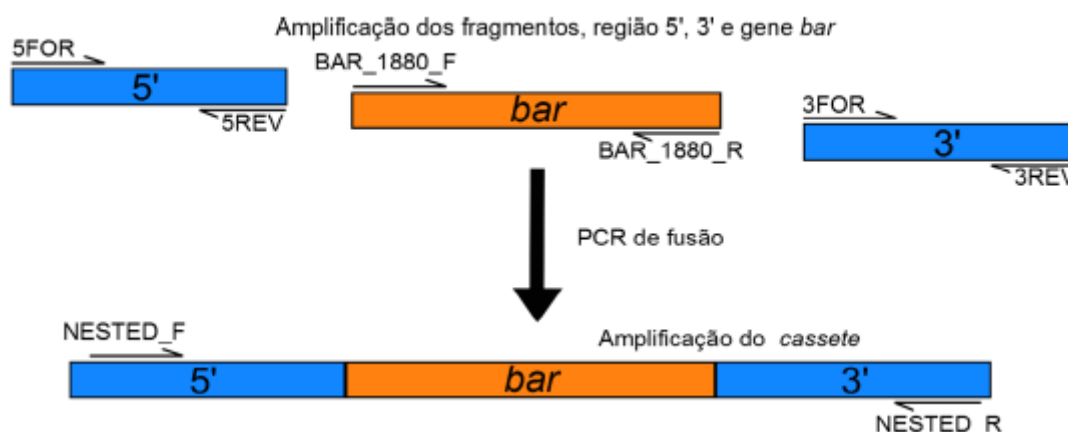


Figura 4 - Esquema representativo da clonagem de fusão dos *amplicons*. O mesmo método foi utilizado para gerar o *cassete* contendo o gene de resistência *sur*.

4.3 CLONAGEM DO CASSETE Δ ChiMaD4 EM VETOR BINÁRIO

Os *cassetes* gerados foram clonados no vetor binário pPZP201BK, obtido da coleção do laboratório, gerando os vetores pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Bar e pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Sur. Estes plasmídeos foram então utilizados para

realização de uma clivagem confirmativa com a enzima de restrição EcoRI para verificar a inserção do cassete por clivagem de sítios internos. Para isso, foi realizado o cultivo das células competentes que passaram por reação de PCR; 15 colônias do vetor $\Delta D4Bar$ e 32 colônias do vetor $\Delta D4Sur$ foram selecionadas e após extração de DNA via miniprep, realizou-se a eletroforese para confirmação.

4.4 OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *M. ANISOPLIAE* E TRANSFORMAÇÃO VIA CRISPR/Cas9

Para a obtenção dos protoplastos a serem utilizados na transformação, esporos de *M. anisopliae* foram cultivados em meio MCc sólido até que houvesse formação de conídios (aproximadamente 10 dias). Os mesmos foram coletados em solução de Tween 80 0,1% com auxílio de alça de Drigalski. Os conídios foram então inoculados em meio MCc por 16 h, sendo então o micélio coletado e protoplastos preparados conforme metodologia descrita por Bogo e colaboradores (1996). Uma suspensão contendo 1×10^6 conídios.mL⁻¹ foi incubada em MCc por 18 horas à 37 °C, sendo então $1,2 \times 10^8$ células.mL⁻¹ protoplastos gerados, essa quantidade é condizente com outros estudos que apresentam crescimento de aproximadamente 10^7 células.mL⁻¹. A transformação de protoplastos utilizando polietilenoglicol (PEG), o qual promove a aglomeração celular facilitando a captação do DNA, foi realizada conforme Bogo e colaboradores (1996). A integração de oligonucleotídeos (Tabela 2) e o gene de interesse, a fim de avaliar sua capacidade de atuação em *M. anisopliae* pelo sistema CRISPR foi realizada conforme o manual do fabricante (EnGen® sgRNA Synthesis Kit, *S. pyogenes*).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no protocolo CRISPR

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA (5' → 3')
MANI_030302_Cas9	TTCTAATACGACTCACTATAGAATGGGTTTAAGGCCTCTCGTTTTAGAGCTAGA

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos funcionais para determinar as proteínas produzidas por *M. anisopliae* durante a infecção, suas ferramentas de regulação e respectivas funções são necessárias para definir os mecanismos de infecção e compreender as interações entre entomopatógenos e seus hospedeiros (JIANG et al., 2013; BARRETO et al., 2004). A manipulação gênica em estudos funcionais é talvez a abordagem mais relevante a ser utilizada. Após o isolamento e a caracterização de genes alvo, uma das estratégias é a construção de mutantes nulos (mutantes funcionais) e a verificação da perda de sua função. Estes mutantes têm a expressão de um gene alvo específico interrompido pela inserção de fragmento de DNA, qual dá-se por meio de recombinação homóloga (KRAPPMANN, 2007). Nestes mutantes funcionais são realizadas análises das alterações fenotípicas que ocorrem, dessa forma é possível identificar em quais processos um determinado gene está envolvido e qual a sua função neste organismo (WELD et al., 2006).

Visando construir mutantes fúngicos nulos para o gene *ChiMaD4*, construímos um *cassete* de deleção via vetor de clonagem para isso, foi realizada a amplificação de regiões flangeadoras do gene *ChiMaD4* e dos *cassetes* de expressão dos genes de resistência *sur/bar*. O método de clonagem convencional, embora funcione muito bem para diversas aplicações, é particularmente difícil de aplicar a tarefas complexas de clonagem envolvendo vários fragmentos, que são cada vez mais a norma, por exemplo, em biologia sintética. Além disso, são métodos laboriosos e muitas vezes restritos pelos relativamente poucos locais de restrição disponíveis para manipulação. Pensando nisso novas abordagens de clonagem vêm sendo descritas, com o objetivo de diminuir o tempo necessário das metodologias clássicas. Algumas dessas técnicas foram testadas sem sucesso por nosso grupo, como a *sequence and ligation independent cloning* (SLIC) (JEONG et al., 2012). A recombinação *in vivo* utilizando *E. coli*, encontrou barreiras técnicas para sua utilização (PARRISH et al., 2004) em nossos estudos anteriores. Já a recombinação comercial *in vitro* utilizando In-Fusion™ (Clontech, Japão) apresentou resultados satisfatórios, além de ser mais barata que outras metodologias comerciais como os vetores Gateway® (ThermoFisher, EUA) e Gibson® Assembly (NEB, EUA).

No presente estudo utilizamos a tecnologia de *double-joint* PCR (YU et al., 2004) para fundir os produtos amplificados separadamente, a qual se mostrou

satisfatória. O resultado foi a obtenção do *cassete* de deleção que foi amplificado com os primers *Nested* que flanqueiam toda a região de deleção do gene. Os *cassetes* gerados a partir do PCR de fusão foram então clonados no vetor binário pPZP201BK, o qual já foi utilizado em outros trabalhos do grupo (SBARAINI, 2021). Com a obtenção dos vetores pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Bar e pPZP201BK:: Δ ChiMaD4Sur, foi realizado o cultivo das células competentes que passaram por reação de PCR; 15 colônias do vetor Δ D4Bar e 32 colônias do vetor Δ D4Sur foram selecionadas. Utilizamos genes de resistência a antibióticos diferentes devido a uma possível toxicidade durante a clonagem em *E. coli*, felizmente obtivemos sucesso em ambas as fusões. Após extração de DNA via miniprep, para confirmação da clonagem, foi realizada reação de digestão do material obtido com a enzima de restrição EcoRI. A reação foi observada por eletroforese em gel de agarose (Figura 5).

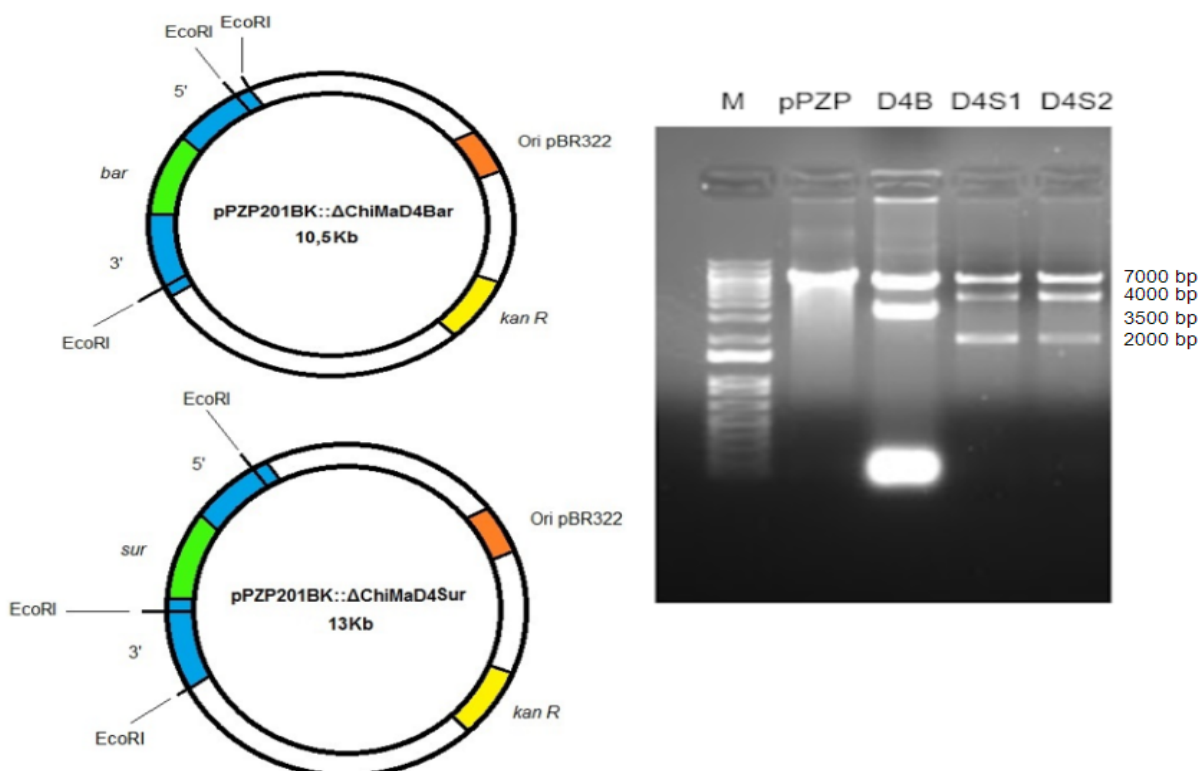


Figura 5 - Mapas da construção dos vetores de clonagem e confirmação da clonagem dos *cassetes* de deleção no vetor pPZP201BK. Clivagem dos sítios internos dos insertos com a enzima de restrição EcoRI. M = 1 kb *plus* DNA ladder; pPZP = DNA plasmidial utilizado como controle da reação; D4B = DNA plasmidial da colônia Δ D4Bar#12 selecionada previamente; D4S1 = DNA plasmidial da colônia Δ D4Sur#13; D4S2 = DNA plasmidial da colônia Δ D4Sur#25. Imagem fora de escala.

Tendo sido confirmada a construção dos plasmídeos, foram iniciados os experimentos para transformação de *M. anisopliae* para obtenção de mutantes nulos. Uma das técnicas mais consolidadas para a transformação genética de fungos filamentosos e leveduriformes é por meio da obtenção de protoplastos. Protoplastos são células artificialmente livres de parede celular, o que as torna receptoras e permeáveis à entrada do DNA exógeno frente a tratamentos específicos, como a presença de PEG e cálcio (BOGO, 1996). A utilização de polietilenoglicol como sistema de transformação é um método bem estabelecido e amplamente utilizado, empregando protoplastos e conídios germinados como células competentes (OLMEDO-MONFIL, 2004). A obtenção de protoplastos de células fúngicas, utilizando várias enzimas que degradam a parede celular, tem sido o método mais comum para se preparar células competentes para estudos genéticos (ZANETTE, 2007). Particularmente em fungos filamentosos, devido a sua parede celular, o preparo de protoplastos é uma etapa indispensável para uma transformação de sucesso (POSSIEDE, 2004). Contudo, vários fatores podem interferir na obtenção de protoplastos, como o estabilizador osmótico, a idade micelial, a preparação enzimática, e até mesmo o microrganismo usado (PEBERDY, 1976).

Devido ao grande número de espécies de fungos e suas complexas estruturas de parede celular, diferentes métodos de transformação são necessários para diferentes espécies de fungos. Assim, os protocolos de transformação específicos da espécie devem ser otimizados para cada cepa. Além disso, tempo e custo de cada metodologia deve ser levada em consideração. Existem alguns métodos gerais de transformação genética para fungos, incluindo transformação mediada por protoplastos, transformação mediada por *Agrobacterium*, eletroporação, método biolístico e transformação mediada por ondas de choque. A tecnologia de transformação é uma premissa para modificar o genoma de fungos filamentosos. Em comparação com a transformação por eletroporação, os protocolos que utilizam protoplastos ou *Agrobacterium* são mais bem desenvolvidos e usados rotineiramente (LI, 2017).

Recentemente, a tecnologia de edição de genoma tem evoluído rapidamente. As tecnologias surgidas incluem principalmente *Zinc-finger nucleases* (ZFNs) (URNOV, 2005), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) (TESSON,

2011) e *clustered regularly interspersed short palindromic repeats* (CRISPR) (ZHANG, 2015). As ZFNs têm sido amplamente utilizadas, mas podem resultar em uma alta taxa de desvio do alvo e alto nível de citotoxicidade. TALENs são semelhantes às ZFNs, porém apresentam protocolos mais complexos e caros (YU, 2015). Para este trabalho utilizamos o método de transformação mediada por protoplastos, pois outros trabalhos do grupo demonstraram eficiência da técnica.

Uma suspensão contendo 1×10^6 conídios.mL⁻¹ foi incubada em MCc por 18 horas à 37 °C, sendo então $1,2 \times 10^8$ células.mL⁻¹ protoplastos gerados, essa quantidade é condizente com outros estudos que apresentam crescimento de aproximadamente 10^7 células.mL⁻¹ (GOETTEL, 1989).

Utilizando a transformação com o emprego de PEG, prosseguimos com a transformação do *cassete* para inativação do gene *chimaD4* utilizando a ferramenta CRISPR, a qual vem se mostrando bastante eficiente na geração de transformantes de fungos filamentosos (ROZHKOVA, 2021; SONG et al, 2019). Após a transformação de 100 µL da solução de protoplastos empregando 25 µL PEG e 5 µg dos plasmídeos independentes, assim como o sgRNA e as enzimas Cas9, foi realizada a regeneração dos mesmos em meio MCc acrescido de sorbitol na concentração de 1 M. Após um período de 1 hora, os protoplastos regenerados foram transferidos para meio MCc acrescido do agente seletivo conforme o plasmídeo empregado na transformação: glufosinato de amônio para o plasmídeo pPZP201BK::ΔChiMaD4Bar e *chlorimuron-ethyl* para o plasmídeo pPZP201BK::ΔChiMaD4Sur. Após um período de incubação de até 15 dias, não pudemos observar transformantes emergindo das placas. Atribuímos essa recuperação nula à alta sensibilidade do material utilizado, assim é possível que a estabilidade dos protoplastos diminuiu durante os passos do protocolo utilizado.

Abordagens de genética reversa em fungos filamentosos têm baixo número de mutantes com a recombinação homóloga desejada correta quando comparados com mutantes com recombinação ectópica. A maioria dos eventos de transformação em fungos filamentosos mostra taxas extremamente baixas de recombinação homóloga, variando de 1-2%, dependendo do *locus*, do gene a ser interrompido e do gênero do fungo (FRANDSEN, 2011). A integração de DNA exógeno em fungos é impulsionada principalmente pela via de recombinação não homóloga (*NHEJ: non-homologous end join*), o que pode estar associado à baixa taxa de sucesso observada (TADASHI, MASUDA & KOYAMA, 2006). Abordagens iniciais

utilizando a integração de *cassetes* para expressão de sgRNAs e de Cas9 no genoma de *M. anisopliae* não tiveram sucesso na edição gênica (OLIVEIRA, 2016). A abordagem para geração de mutantes nulos em *M. anisopliae* empregando o sistema CRISPR/Cas9 pela cotransformação de gRNAs, *cassetes* de inativação e da proteína Cas9 tem sido empregada com sucesso. Por exemplo, Davis e colaboradores (2020) mostram que, taxas de recombinação de clonagem heteróloga de ácido lisérgico em *Metarhizium brunneum* passaram de 2% quando clonadas por técnicas tradicionais para 86,9% utilizando do método CRISPR/Cas (DAVIS, 2020). Adicionalmente, o mesmo grupo desenvolveu mutantes nulos empregando esta estratégia para genes envolvidos em vias de biossíntese de metabólitos secundários (STEEN et al., 2021; BRITTON et al., 2022). Hipotetizamos que a não obtenção de mutantes não se deve a funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9 em *M. anisopliae*, já que trabalhos anteriores do grupo apresentaram eficiência adequada (50%). O potencial problema de nossa abordagem reside no preparo e regeneração de protoplastos. Trata-se de um conjunto de tratamentos que gera células de extrema sensibilidade, e que qualquer variação no lote de enzimas utilizada para obtenção dos protoplastos pode ter papel fundamental na eficácia do processo (LI, 2017). Futuramente, devido a relevância de estudos de mutantes nulos, novas tentativas de transformação de protoplastos deverão ser realizadas pelo grupo a fim de otimizar o protocolo de manipulação de protoplastos de *M. anisopliae*. Além disso, outras técnicas de transformação, como a eletroporação, poderão ser utilizadas para comparar a eficácia entre novas metodologias de transformação nessa espécie.

6 CONCLUSÃO

- Foi possível construir *cassetes* para inativação do gene *ChiMaD4* em *M. anisopliae*;
- A falta de obtenção de transformantes deve ter ocorrido pela baixa qualidade dos protoplastos obtidos.

REFERÊNCIAS

AKRAM, F.; SAHREEN, S.; AAMIR, F.; HAQ, I. U.; MALIK, K.; IMTIAZ, M.; NASEEM, W.; NASIR, N. & WAHEED, H. M. (2022). An Insight into Modern Targeted Genome-Editing Technologies with a Special Focus on CRISPR/Cas9 and its Applications. *Molecular biotechnology*, 1–16. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00501-4>

ARRUDA, W. Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

ABBOTT, D., MACAULEY, M., VOCADLO, D. & BORASTON, A. Streptococcus pneumoniae endohexosaminidase D, structural and mechanistic insight into substrate-assisted catalysis in family 85 glycoside hydrolases. *J. Biol. Chem.* 284, 11676–11689 (2009).

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, v. 101, n. 4, p. 512-530, Jul-Aug 2009. ISSN 0027-5514.

BOLDO, J. T., JUNGES, A., DO 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*, 55(5), 551–560.

BRITTON, K. N.; STEEN, C.R.; DAVIS, K.A.; SAMPSON, J.K.; PANACCIONE, D.G. Contribution of a novel gene to lysergic acid amide synthesis in *Metarhizium brunneum*. *BMC Research Notes*. 2022 May;15(1):183.

DEBACH, P.; HAGEN, KS. Manipulation of entomophagous species. In *Biological Control of Insect Pests and Weeds* (DeBach P, ed.), New York, Reinhold, 1964, p.429-458.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, v. 104, p. 134-150, Feb 2000. ISSN 0953-7562.

DUTRA, V. *et al.* 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*, v. 155, n. 4, p. 245-251, MAY 2004 2004. ISSN 0923-2508.

FLINT, M. L. *et al.* *Natural enemies handbook : the illustrated guide to biological pest control*. Oakland, Calif. Berkeley: UC Division of Agriculture and Natural Sciences; University of California Press, 1998. viii, 154 p. ISBN 1879906414.

FOLLETT, P.A. & DUAN, J.J. (eds.). 2000. Nontarget Effects of Biological Control. Kluwer Academic Publishers, Norwell, UK.

GAO, B. J.; MOU, Y. N.; TONG, S. M.; YING, S. H. & FENG, M. G. (2020). Subtilisin-like Pr1 proteases marking the evolution of pathogenicity in a wide-spectrum insect-pathogenic fungus. *Virulence*, 11(1), 365–380.

GEBREMARIAM, A.; CHEKOL, Y. & ASSEFA, F. (2022). Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *BMC research notes*, 15(1), 117.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ A. G.; PADILLA-GUERRERO, E. I.*; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, A. & TORRES-GUZMÁN C. J. Virulence Factors of the Entomopathogenic Genus *Metarhizium*, *Current Protein & Peptide Science* 2020; 21(3).

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, Cambridge, v. 157, p. 1262-1278, 2014.

INAGAKI, N. et al. Molecular properties of the glucosaminidase AcmA from *Lactococcus lactis* MG1363: Mutational and biochemical analyses. *Gene*, v. 447, n. 2, p. 61-71, Nov 2009. ISSN 0378- 1119.

KIMURA, Y. et al. Double-Knockout of Putative Endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) Genes in *Arabidopsis thaliana*: Loss of ENGase Activity Induced Accumulation of High-Mannose Type Free N-Glycans Bearing N,N'-Acetylchitobiosyl Unit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 75, n. 5, p. 1019-1021, 2011.

LI, D.; QIU, Z.; SHAO, Y.; CHEN, Y.; GUAN, Y.; LIU, M.; LI, Y.; GAO, N.; WANG, L.; LU, X.; ZHAO, Y.; LIU, M. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, New York, v. 31, p. 681-683, 2013.

LI, W.; TENG, F.; LI, T.; ZHOU, Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, New York, v. 31, p. 684-686, 2013.

LI, D.; TANG, Y.; LIN, J. & CAI, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial cell factories*, 16(1), 168.

LIAO, B., CHEN, X., ZHOU, X., ZHOU, Y., SHI, Y., YE, X., LIAO, M., ZHOU, Z., CHENG, L., & REN, B. (2021). Applications of CRISPR/Cas gene-editing technology in yeast and fungi. *Archives of microbiology*, 204(1), 79.

LINO, C. A., HARPER, J. C., CARNEY, J. P., & TIMLIN, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug delivery*, 25(1), 1234–1257.

LIU, R.; CHEN, L.; JIANG, Y.; ZHOU, Z.; ZOU, G. (2015) Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discov* 1:15007.

LOMBARD, V.; GOLACONDA, R. H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. & HENRISSAT, B. The carbohydrateactive enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, 490–495 (2014).

LORD, J.C. (2001) Response of the Wasp *Cephalonomia tarsalis* (Hymenoptera: *Bethylidae*) to *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: *Moniliales*) as Free Conidia or Infection in Its Host, the Sawtoothed Grain Beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: *Silvanidae*). *Biological Control*, 21.300–304.

LUBECK, I. *et al.* Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology*, v. 1, p. 78-88, May-Aug 2008. ISSN 1754-5048.

MSEDDI, J.; FARHAT-TOUZRI, B. D., & AZZOUZ, H. (2022). Selection and characterization of thermotolerant *Beauveria bassiana* isolates and with insecticidal activity against the cotton-melon aphid *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: *Aphididae*). *Pest management science*, 78(6), 2183–2195.

MYLES, T. G. (2002). Alarm, aggregation, and defense by *Reticulitermes flavipes* in response to a naturally occurring isolate of *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology*. 40. 243-255.

NIELSEN, M.L. *et al.* (2017) Genes linked to production of secondary metabolites in *Talaromyces atrovirens* revealed using CRISPR-Cas9. *PLoS ONE* 12:e169712.

OLIVEIRA, T. C. Metodologias para a geração de mutantes funcionais em *Metarhizium anisopliae*: CRISPR/Cas9 e RNAi. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

OLMEDO-MONFIL, V.; CORTÉS-PENAGOS, C. & HERRERA-ESTRELLA, A. (2004). Three decades of fungal transformation: key concepts and applications. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 267, 297–313.

PALERMO, G.; RICCI, C. G.; FERNANDO, A.; BASAK, R.; JINEK, M.; RIVALTA, I.; BATISTA, V. S.; MCCAMMON, J. A. Protospacer adjacent motif-induced allostery activates CRISPR-cas9. *J Am Chem Soc*, v.139, p.16028- 16031, 2017

QUIROGA-CUBIDES, G.; GARCÍA-RIAÑO, L.; GRIJALBA-BERNAL, E. P.; ESPINEL, C.; CUARTAS OTÁLORA, P. E.; GUEVARA, E. J.; GÓMEZ-ÁLVAREZ, M. I. & CRUZ BARRERA, M. (2022). Assessment of a potential bioproduct for controlling *Ceratomyxa arcuata tingomariana* (Coleoptera: *Chrysomelidae*). *Journal of applied microbiology*, 10.1111/jam.15630. Advance online publication.

RICHTER, H.; RANDAU, L. Plagens A. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):14518-31.

RODGERS, K. & MCVEY, M. (2016). Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Journal of cellular physiology*, 231(1), 15–24.

RONHOLM, J. *et al.* The *Listeria monocytogenes* serotype 4b autolysin IspC has Nacetylglucosaminidase activity. *Glycobiology*, v. 22, n. 10, p. 1311-1320, Oct 2012. ISSN 0959-6658.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbour, New York: Springer Harbor Laboratory Press, 2001.
Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulation and targeting genomes. *Nature Biotechnol.* 2014;32(4):347-55.

SBARAINI, N.; JUNGES, A.; OLIVEIRA, E.; WEBSTER, A.; VAINSTEIN, M.; STAATS, C.; SCHRANK, A. (2021). The deletion of chiMaD1, a horizontally acquired chitinase of *Metarhizium anisopliae*, led to higher virulence towards the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*). *FEMS Microbiology Letters*. 368.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, v. 56, n. 7, p. 1267-74. ISSN 1879-3150.

STAATS, C. C. *et al.* Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC Genomics* , v. 15, p. 822, 2014.

STEEN, C. R.; SAMPSON, J. K. & PANACCIONE, D. G. (2021). A Baeyer-Villiger Monooxygenase Gene Involved in the Synthesis of Lysergic Acid Amides Affects the Interaction of the Fungus *Metarhizium brunneum* with Insects. *Applied and environmental microbiology*, 87(17), e0074821.

ST LEGER, R. J. & WANG, J. B. (2020). *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Open biology*, 10(12), 200307.

STONE, L. & BIDOCHKA, M. J. (2020). The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(23), 9935–9945.

SUZUKI, T. Complex, Two-way Traffic of Molecules Across the Membrane of the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 273, 10083–10086 (1998).

SUZUKI, T. *et al.* Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 15, p. 9691-9696, Jul 2002. ISSN 0027-8424.

TAKEGAWA, K.; NAKOSHI, M.; IWAHARA, S.; YAMAMOTO, K. & TOCHIKURA, T. Induction and purification of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Arthrobacter protophormiae* grown in ovalbumin. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3107–3112 (1989).

TESSON, L.; USAL, C.; MENORET, S.; LEUNG, E.; NILES, B.J.; REMY, S. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol.* 2011;29:695–696.

TULLOCH, M. GENUS *METARHIZIUM*. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 66, n. JUN, p. 407-411, 1976. ISSN 0007-1536.

URNOV, F.D.; MILLER, J.C.; LEE, Y.L.; BEAUSEJOUR, C.M.; ROCK, J.M.; AUGUSTUS, S. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*. 2005;435:646–651.

WANG, H.; YANG, H.; SHIVALILA, C. S.; DAWLATY, M. M.; CHENG, A. W.; ZHANG, F.; JAENISCH, R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas mediated genome engineering. *Cell, Cambridge*, v. 153, p. 910- 918, 2013.

WU, Y.; FANG, H.; LIU, X.; MICHAUD, J. P.; XU, H.; ZHAO, Z.; ZHANG, S. & LI, Z. (2022). Laboratory evaluation of the compatibility of *Beauveria bassiana* with the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*) for joint application against oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: *Tortricidae*). *Pest management science*, 10.1002/ps.7003. Advance online publication.

YU, J. H. *et al.* Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 41, n. 11, p. 973-981, Nov 2004. ISSN 1087-1845.

YU, T.; LI, L.; LIN, J. Advances in transcription activator-like effectors—a review. *Chin J Biotechnol.* 2015;31:1024.

ZHANG, M.; JIANG, S.; ZHENG, J.; ZHENG, Z.; LI, X.; PAN, L. Construction of an integration vector carrying hygromycin B resistance gene and its genetic transformation in *Rhizopus oryzae*. *Chin J Biotechnol.* 2015;31:1203.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007/10/01 2007. ISSN 0958-3157.