

SALÃO DE  
INICIAÇÃO CIENTÍFICA  
**XXIX SIC**  
  
**UFRGS**  
PROPESQ



múltipla   
**UNIVERSIDADE**  
inovadora  inspiradora

<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2017
<b>Local</b>	Campus do Vale
<b>Título</b>	Padronização do sistema CRISPR/Cas9 em <i>Metarhizium anisopliae</i>
<b>Autor</b>	AUGUSTO BARTZ PENTERICHE
<b>Orientador</b>	AUGUSTO SCHRANK

## Padronização do sistema CRISPR/Cas9 em *Metarhizium anisopliae*

Augusto Bartz Penteriche<sup>1</sup>, Augusto Schrank<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Descrito originalmente em 1879 por Metschnikoff, o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* vem sendo usado como agente de controle biológico há mais de 100 anos. Este fungo é capaz de infectar uma vasta gama de artrópodes, incluindo vetores de doenças humanas e pragas da agricultura. O sucesso da infecção de *M. anisopliae* depende de diversos fatores, dentre eles, enzimas como proteases, quitinases e lipases, além de toxinas e estruturas celulares especializadas. Com o objetivo de melhor compreender a biologia de *M. anisopliae*, a geração de mutantes funcionais para genes com provável envolvimento no processo de infecção tem sido uma ferramenta de grande importância. No entanto, os presentes métodos de edição genômica são laboriosos e demandam muito tempo. A recente descoberta do sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) como ferramenta de edição genômica têm se mostrado uma promissora técnica para a produção de mutantes funcionais em diversos organismos. Uma das suas vantagens é a rapidez e seu relativo baixo custo. Este sistema se caracteriza por apresentar dois componentes principais: uma endonuclease Cas9 e um RNA-guia (sgRNA). A fim de inativar um gene de interesse, o sgRNA (cerca de 20 nucleotídeos complementares ao gene alvo) guia a endonuclease para a sequência específica, a qual catalisa uma quebra na dupla fita de DNA. Tendo em vista a importância da geração de mutantes funcionais para o estudo de *M. anisopliae*, o objetivo do presente trabalho é padronizar o sistema CRISPR/Cas9 neste fungo. Para tal, primeiramente tentou-se construir linhagens de *M. anisopliae* que expressassem constitutivamente a endonuclease Cas9. Através do método de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) e um vetor binário contendo o *cassette* para expressão da endonuclease Cas9, linhagens de *M. anisopliae* E6 e *M. anisopliae* E6 expressando GFP (*Green fluorescent protein*) foram transformadas. Após três eventos de transformação independentes em ambas as linhagens, apenas dois mutantes *M. anisopliae* E6 +*gfp* com transcritos detectados para *cas9* foram isolados. Estes mutantes apresentavam nítidas alterações no crescimento e esporulação quando comparados com a linhagem controle. Adicionalmente, foi feita a transformação de sgRNAs via ATMT com o objetivo de interromper o gene *gfp*; no entanto, não houve funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9 nestas linhagens. A dificuldade em isolar transformantes que ativamente expressem a endonuclease Cas9, bem como as disfunções morfológicas apresentadas pelas únicas linhagens isoladas e a não funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9 nas mesmas indicam que a expressão desta proteína pode ser tóxica para *M. anisopliae*. Assim, métodos completos que visem atenuar a toxicidade do sistema CRISPR/Cas9 estão sendo testados, bem como mais estudos são necessários a fim de validar e padronizar este sistema neste fungo.