

**CRISPR/Cas9 para obtenção de *Trichoderma harzianum* com
marcas de seleção**

AMANDA AURÉLIO VIEIRA
Bióloga

AMANDA AURÉLIO VIEIRA

**CRISPR/Cas9 para obtenção de *Trichoderma harzianum* com
marcas de seleção**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pabline Marinho Vieira

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – *Campus* Urutaí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para obtenção do título de MESTRE.

Urutaí /GO

2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

VV658c Vieira, Amanda Aurélio
 CRISPR/Cas9 para obtenção de *Trichoderma harzianum*
 com marcas de seleção / Amanda Aurélio
 Vieira; orientadora Pabline Marinho Vieira. --
 Urutai, 2020.
 40 p.

 Dissertação (em Programa de Pós-Graduação em
 Proteção de Plantas) -- Instituto Federal Goiano,
 Campus Urutai, 2020.

 1. Controle Biológico. 2. Edição Gênica. 3.
 Fitopatígeno. 4. Micoparasitismo. 5. pyr4. I. Vieira,
 Pabline Marinho , orient. II. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Amanda Aurélio Vieira

Matrícula: 2018101330540031

Título do Trabalho: CRISPR/Cas9 para obtenção de *Trichoderma harzianum* com marcas de seleção.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: Após 1 ano da Defesa (25/04/2021)

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

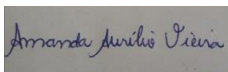
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí-Goiás, 16/04/2020.



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais



Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO,
CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROTEÇÃO DE PLANTAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CRISPR/Cas9 para obtenção de *Trichoderma harzianum* com marcas de seleção.

AUTORA: Amanda Aurélio Vieira

Dissertação defendida e aprovada como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Proteção de Plantas.

Banca Examinadora:

Dra. Pabline Marinho Vieira
Instituto Federal Goiano

Dr. Eudes de Arruda Carvalho
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Kenny Bonfim de Arruda Carvalho
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília - DF, 26 de março de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às minhas avós, Maria do Socorro e Antônia Nilza (*in memoriam*), exemplos de mulheres fortes, sábias e que, mesmo vivendo com muitas dificuldades, foram resilientes, não deixaram de ter fé e serem exemplos de mulheres amáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda força, sabedoria, proteção; por todas as pessoas que colocou em meu caminho durante todo o período da pós-graduação e por nunca ter me deixado desistir.

Agradeço aos meus pais e meus irmãos por todo amor, por sempre me apoiarem, me incentivarem, me proporcionarem condições para continuar minha formação e por nunca me deixaram seguir sozinha.

Agradeço ao Instituto Federal Goiano por toda a estrutura e equipe de profissionais oferecidos para que eu pudesse alcançar mais esta etapa na minha formação.

Agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG), por ter me fornecido toda a estrutura para realizar meus experimentos científicos. Por todos os ensinamentos e paciência da equipe do LEG para a construção deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora Pabline Marinho Vieira por toda a paciência, por todos os ensinamentos, por todo o carinho, por sempre me incentivar, me apoiar e estar comigo desde o início me proporcionando condições para alcançar mais esta etapa na minha vida acadêmica.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
RESULTADOS e DISCUSSÃO	8
CONCLUSÃO.....	14
REFERÊNCIAS	15
ANEXO (MANUSCRITO)	20

RESUMO

Trichoderma harzianum é um fungo filamentosso de controle biológico de pragas agrícolas. Os genes desse microrganismo têm sido mundialmente estudados e suas aplicações são patenteadas para uso em biofungicidas e em estratégias de melhoramento genético de plantas. Entretanto, a tecnologia de edição genômica ainda não foi reportada nessa espécie. Este trabalho registra a obtenção de mutantes com marcas de seleção nessa espécie através da técnica CRISPR/Cas9. Para isso, foi realizada a inserção do RNA-guia e Cas9 via biobalística, e o sequenciamento de *pyr4* nesses mutantes comprovou mutações (deleções e inserções) na região alvo do gene *pyr4*. A caracterização fenotípica demonstrou um atraso no crescimento dos mutantes na ausência de uridina, bem como, resistência ao ácido 5-fluorótico; além do nocaute gênico não interferir na atividade de micoparasitismo dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*. Dessa forma, foi possível demonstrar mutação do gene *pyr4* em *T. harzianum* com o uso da técnica CRISPR/Cas9 sem a necessidade de recombinação homóloga, e que a expressão endógena do sistema não interfere no controle biológico deste fungo. Este trabalho apresenta o primeiro relato para esta técnica nessa espécie de biocontrole e, os mutantes expressando Cas9, representam potencial biotecnológico para validação e patenteamento de genes em biotecnologia agrícola.

Palavras-chave: controle biológico, fitopatógeno, *pyr4*, edição gênica, micoparasitismo.

ABSTRACT

Trichoderma harzianum is a filamentous fungus used as a biological control agent for agricultural pests. Genes of this microorganism have been studied and their applications are patented for use in biofungicides and plant breeding strategies. Gene editing technologies would be of great importance for genetic characterization of this species and has not yet been reported. This work registers obtaining of mutants with selection marks in this species using the CRISPR/Cas9 system. For this, sequences for a guide RNA and *Cas9* overexpression were inserted *via* biobalistics, and the sequencing approach proved mutants deletions and insertions at *pyr4* gene. Phenotypic characterization demonstrated a reduction in the growth of mutants in the absence of uridine, as well as resistance to 5-fluorotic acid; besides the gene disruption did not reduce mycoparasitic activity against phytopathogens. Thus, it was possible to demonstrate target disruption of *pyr4* gene in *T. harzianum* using the CRISPR/Cas9 system and also that endogenous expression of the system did not interfere with the biological control activity of pathogens. This work is the first report for this technique in this species of biocontrol and, the mutants expressing *Cas9*, represent biotechnological potential for generation of useful technologies in agricultural biotechnology.

Key-words: biocontrol; phytopathogen; *pyr4*; gene editing; mycoparasitism.

INTRODUÇÃO

O mercado agrícola busca complementar o uso de produtos químicos com produtos que possuam melhores mecanismos de ação, sejam mais específicos para o controle de pragas, além de induzirem menos resistência ao produto na planta. Nesse sentido, bioformulações produzidas com microrganismos, como bactérias e fungos, são uma alternativa para associar aos produtos químicos para realizar o manejo de pragas agrícolas de forma mais eficiente, a fim de minimizar possíveis danos a outros organismos, à saúde humana e ao meio ambiente, além de possibilitarem uma alternativa para a agricultura sustentável (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2016; HAJJI-HEDFI et al., 2017; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2018).

O fungo filamentoso da espécie *Trichoderma harzianum* é largamente utilizado em biofungicidas para o controle biológico de pragas agrícolas que afetam culturas de importância econômica, tais como: feijão, tomate, milho, tabaco, pepino (QUALHATO et al., 2013). Este microrganismo é cosmopolita, pois possui uma capacidade de sobreviver em diversos meios e condições, bem como realiza o biocontrole por vários mecanismos de ação, incluindo: antibiose, competição por nutrientes e micoparasitismo; além de promover o crescimento das plantas, induzir à maior tolerância a estresses abióticos e aumentar as taxas de germinação de sementes (HARMAN et al., 2004; CHEPSEY et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; SILVA et al., 2019). Esses efeitos benéficos promovidos por *Trichoderma* às plantas são possíveis devido à habilidade que estes possuem de colonizar e penetrar nas raízes das plantas e realizar relações simbióticas (MENDONZA-MENDONZA et al., 2017; RAMÍREZ-VALDESPINO et al., 2019). A ação micoparasita de *Trichoderma* deve-se à sua capacidade de envolver suas hifas nas células hospedeiras e secreção de enzimas hidrolíticas tais como: quitinases, glucanases e proteases, e consequente causar a morte do fitopatógeno (LIU & YANG, 2005; SILVA et al., 2019).

As bioformulações contendo *Trichoderma* já registradas no Brasil são para o controle de fitopatógenos, tais como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia soliani*, *Sclerotium roifsi*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, entre outras pragas de grande importância econômica (GHISALBERTI & SIVASITHAMPARAM, 1991; ROCO E PEREZ, 2001; HARMAN et al., 2004; ARENAS et al., 2018; MAPA, 2019). Além disso, existem relatos de aplicações biotecnológicas de enzimas deste microrganismo para a produção de biodiesel (MUKHERJEE et al., 2012; PATHAK et al., 2014), plantas transgênicas resistentes a estresses

bióticos e abióticos (SHORESH et al., 2010; HERMOSA et al., 2012; NICOLÁS et al., 2014), bioformulações, estudos e aplicações de cepas recombinantes (DRUZHININA & KUBICEK, 2017; NOVY et al., 2019; DARIO RAFAEL et al., 2019). Com isso, estudos morfológicos e moleculares em espécies de *Trichoderma* são realizados com inúmeras perspectivas e aplicações biotecnológicas. Nesse contexto, há uma demanda crescente por diferentes técnicas moleculares em *Trichoderma* spp. para estudo de genomas; vias metabólicas; validação de genes envolvidos no biocontrole e no micoparasitismo (LORITO et al., 2010; SILVA et al., 2019). Por isso, ferramentas moleculares utilizadas em transcriptomas e proteomas são essenciais para revelar as estratégias de micoparasitismo em espécies de *Trichoderma* (ATANASOVA et al., 2013; RAMADA et al. 2016).

As ferramentas moleculares de edição genética surgiram como proposta recente e altamente eficazes para análise funcional de genes em procariotos e eucariotos. Estas tornaram possível deletar sequências em genes e/ou suas regiões regulatórias, bem como, direcionar a inserção de sequências para superexpressão em regiões alvo (SCHUSTER & KAHMANN, 2019). Dentre essas ferramentas, sistema CRISPR/Cas, técnicas de ZFN (zinc-finger nucleases) e TALEN (transcription activator-like effector nucleases). CRISPR (repetições palindrômicas curtas, intercaladas e regularmente espaçadas) é um sistema baseado no mecanismo de defesa bacteriano descoberto em *Streptococcus thermophilus* contra DNA exógeno, sendo constituído pela enzima Cas9 e por gRNAs (RNAs guias). A Cas9 é uma endonuclease, responsável pelo corte na dupla fita de DNA e o gRNA é uma sequência de RNA composta por dois RNAs que podem ser expressos separadamente ou fusionados, o crisprRNA (crRNA), região complementar ao DNA alvo, e o RNA transativador (tracrRNA), que forma um duplex de RNA com uma porção do crRNA. Além disso, o gRNA possui uma região de interação com a Cas9, denominada PAM (protospacer adjacente motif). Após a interação da Cas9 com o duplex DNA-RNA, esta cliva o DNA e o reparo se dá por HR (recombinação homóloga) ou NHEJ (recombinação não-homóloga). A vantagem deste sistema em relação ao TALEN é que a nuclease é a mesma para a deleção de qualquer gene, o que muda são os gRNAs; além disso, o sistema CRISPR/Cas9 é mais específico, porque a interação ocorre com o nucleotídeo, enquanto que ZFN e TALEN a interação ocorre entre a proteína e o DNA. Por essas razões, a biotecnologia tem como perspectiva utilizar o sistema CRISPR/Cas9 como ferramenta para melhorar a edição gênica, pois este sistema permite introduzir vários gRNAs e clivar diferentes

regiões do genoma simultaneamente (DOUDNA & CHARPENTIER, 2014; BOETTCHER & MCMANUS, 2015; ARAZOE et al., 2015; KRAPPMANN, 2016; ZHANG et al., 2019).

Sabe-se que *Trichoderma harzianum* possui uma maquinaria de recombinação homóloga ineficiente e por se reproduzirem assexuadamente, preferem realizar recombinação não homóloga, o que acarreta em baixa frequência correta de integração genômica (LIU & CHEN, 2015). Estes desafios podem ser superados pela edição gênica, técnica na qual o DNA pode ser inserido, substituído ou removido do genoma através de endonucleases. Dentre estas, o sistema CRISPR/Cas9 representa uma ferramenta valiosa na elucidação funcional de um gene e/ou proteína, aumenta a eficiência da mutação gênica por recombinação homóloga, como foi relatado em *Trichoderma reesei*, espécie de uso industrial, importante na produção de enzima lignocelulósica para produção de biocombustíveis, como o biodiesel (LIU et al., 2015; NOVY et al., 2019). Esta tecnologia gerou linhagem de *T. reesei* com alta produção dessas enzimas hidrolíticas que degradam a biomassa lignocelulósica vegetal por direcionar a integração correta do gene em promotor específico (RANTASALO et al., 2019).

Dessa forma, avanços nessas ferramentas moleculares possibilitam direcionar mutações, como também, gerar marcas de seleção com eficácia (NØDVIG et al. 2015; DERNTL et al. 2015; NIHEI & KISHI, 2017). As marcas de seleção auxotróficas incluem alterações em enzimas-chave, importantes para as vias metabólicas de biossíntese de nucleotídeos para distinção dos organismos mutados. Os nucleotídeos são biomoléculas essenciais para os organismos porque integram as vias de informação genética, além de participarem de processos celulares e metabólicos. Por essas razões, alterações na biossíntese de nucleotídeos podem causar importantes alterações fisiológicas e até a morte celular (SERAHT et al. 2012; KOKINA et al. 2019). Inclusive, existe uma linhagem de *T. reesei* contendo marca auxotrófica utilizada para aplicação industrial e biotecnológica (HARTL & SEIBOTH, 2005; SCHUSTER & SCHMOL, 2010). Apesar de linhagens de *Trichoderma* contendo marcas seletivas serem indispensáveis dispositivos para trabalhos de seleção e desenvolvimento de linhagens com aplicabilidade biotecnológica, inexistem linhagens do fungo de biocontrole *T. harzianum* contendo marca auxotrófica. Tampouco, há relatos sobre os efeitos da deleção gênica em marca auxotrófica na atividade de micoparasitismo em fungos de controle biológico. O gene *pyr4* é um representante de genes com marcas auxotróficas, é um gene necessário para a biossíntese de uridina, pois codifica a enzima oritidina-5'-fosfato descarboxilase (DRUZHININA & KUCICEK, 2017). A tecnologia CRISPR/Cas9 pode ser utilizada para criar mutantes por

deleção do gene *pyr4* (marca auxotrófica), os quais necessitam de meio de cultura acrescido de uridina para reestabelecer o crescimento, além do mais, mutantes crescem na presença de ácido 5-fluorótico (5'-FOA), molécula tóxica para *Trichoderma* selvagem, porque a conversão de 5'-FOA em 5-fluoracil causa morte dos selvagens (WENDEROTH et al., 2017).

Neste trabalho, o uso da técnica de engenharia genética CRISR/Cas9 em *Trichoderma harzianum* para nocaute da expressão do gene *pyr4*, configura uma estratégia inovadora para análise funcional deste gene durante o controle biológico de fungos fitopatogênicos, além da validação da técnica e produção de marcas de seleção nesta espécie.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Obter linhagens de *T. harzianum* mutantes para marcas de seleção *pyr4*, utilizando engenharia genética de precisão (CRISPR/Cas9), sem perder a capacidade micoparasita das linhagens a fitopatógenos.

Objetivos Específicos

- Desenvolver sistema de edição CRISPR/Cas9 para o gene *pyr4* de *T. harzianum*.
- Avaliar alterações na região alvo do gene nos transformantes de *T. harzianum* através de sequenciamento.
- Avaliar o crescimento de transformantes de *T. harzianum* em meio de cultura com marcas auxotrófica e prototrófica.
- Avaliar nos transformantes a atividade de micoparasitismo dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção dos fungos

Trichoderma harzianum (ALL42) da coleção do Laboratório de Enzimologia (UFG/ICBII), foi utilizado em estudos anteriores para estudo dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* (GOMES et al., 2015; RAMADA et al., 2016; VIEIRA et al., 2018; SILVA et al., 2019). Os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* da coleção da Embrapa/CENARGEN e *Trichoderma harzianum* foram mantidos em meio MEX (3% de extrato de malte e 2% de ágar) e estocados a 28°C no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura (LEG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / CENARGEN – Brasília/DF.

Construção do vetor de edição gênica CRISPR/Cas9 e transformação de genética de *T. harzianum*

Para possibilitar a edição gênica e análise funcional da marca auxotrófica (*pyr4*) em *T. harzianum* desenvolvemos um sistema baseado em CRISPR/Cas9 e adaptado para uso neste fungo de biocontrole. A endonuclease Cas9 e a sequência de gRNA para *pyr4* foram introduzidos em cepas de *T. harzianum* e os mutantes produzidos foram selecionados em meio contendo ácido 5-fluoroorótico (5'-FOA).

Para a síntese do plasmídeo, o gene da Cas9 de *S.pyogenes* foi otimizado para a expressão em *T. harzianum* e sintetizado pela empresa de biotecnologia Epoch Life Science, Inc. (Sugar Land, TX, USA). A sequência da Cas9 foi inserida entre o promotor constitutivo de *A.nidulans* *gpdA* e o terminador *trpC*. A sequência de gRNA para a edição do gene *pyr4* (JGI ID: 480432) foi construída utilizando o servidor online E-CRISPR (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>) e inserida a jusante do promotor constitutivo de *T.reesei* *tef1* no plasmídeo pLHhph1-*tef1*. Para a construção do sistema de edição CRISPR/Cas9, a proteína Cas9 e o gRNA foram inseridos no plasmídeo previamente linearizado. O vetor final (CRISPR/*pyr4*) foi usado para transformar *T.harzianum* (ALL42) usando partícula de tungstênio M5 de com Vieira et al. (2018). Após o bombardeio, conídios de *T.harzianum* foram banhados em placas com extrato de levedura/ágar (meio MEX) contendo 5'-FOA (1.5 g/L; Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) e uridina (10mM).

Triagem de mutantes de *T. harzianum* e sequenciamento

Os mutantes obtidos por análise fenotípica (resistência ao 5'FOA) foram verificados usando iniciadores alinhados na sequência vetorial Cas9_RNAgCheC (CTGCAAGGCGATTAAGTTGG) e Cas9_3897F (ACAGCATAAGCACTACCTCG). Conídios alternados em meio BDA / higromicina, seguido pelo isolamento de esporos únicos em meio BDA com uridina foram realizados em três etapas para purificar os mutantes. Colônias resistentes a 5'-FOA foram obtidas após 3-4 dias e transferidas para o meio BDA contendo uridina para esporulação. O DNA genômico das cepas foi isolado e o gene *pyr4* foi sequenciado usando o iniciador universal SP6. O DNA da cepa do tipo selvagem (WT) foi incluído como controle.

Análise de crescimento e confronto direto

Para analisar as cepas de *T. harzianum* para a auxotrofia da uridina, foram colocados plugs de micélio medindo 1 cm no centro de placas frescas de BDA ou MEX suplementadas com 10 mM de uridina e incubadas a 28° C por 7 dias. A atividade antagonista de *T. harzianum* selvagem (WT) e mutantes contra patógenos foi realizada com ensaio de confronto de placas, como descrito anteriormente (GOMES et al., 2015), bem como medição do diâmetro das colônias por um período de 7 dias. Dois patógenos (*Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*) foram avaliados independentemente durante o confronto com cepas de *T. harzianum* na ausência e presença de uridina. Todas as experiências foram conduzidas em triplicatas biológicas independentes.

Análise Estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade (testes de Shapiro-Wilk) e quanto à homogeneidade (testes de Bartlett). Os dados que não eram normais foram transformados usando $(x + 0,5) / 2$. Posteriormente, os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram separadas pelo teste de Dunnett com 5% de probabilidade sempre que a ANOVA fosse significativa. A análise estatística foi realizada no software R, versão 3.2.2 (R Core Team, 2016) e o trabalho gráfico foi realizado no software GraphPad Prism versão 7.0 (La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trichoderma harzianum é um fungo filamentososo que exibe uma variedade de aplicações em biotecnologia (ADNAN et al.,2019a; HARMAN & UPHOFF, 2019). Devido à sua capacidade de antagonizar patógenos vegetais, bem como estimular o crescimento das plantas e respostas de defesa, cepas de *T. harzianum* são utilizadas na agricultura para controle biológico, e algumas de suas linhagens são utilizadas em bioformulações (VIEIRA et al.,2013; ADNAN et al.,2019b; MUKHERJEE, 2019; SILVA et al., 2019).

Ferramentas genéticas são pouco desenvolvidas para a maioria dos fungos filamentosos, o que dificulta empregar engenharia genética para entender a biologia de espécies de *Trichoderma*, além de poder explorá-las industrialmente e cientificamente (SCHUSTER & SCHMOLL,2010; LORITO et al., 2010). Por esses motivos, existe uma demanda para desenvolver métodos versáteis que possam ser utilizados para manipular geneticamente *T. harzianum*. Portanto, as tecnologias de edição de genes representam uma alternativa promissora na engenharia genética, o que ocasionou a estabelecer novas linhagens mutantes para manipulações genéticas.

O bloqueio do gene *pyr4* (OMP-decarboxilase) em *T. harzianum* produz cepas prototróficas resistentes ao 5'-FOA, um intermediário tóxico que é convertido pela orotidina-5'-monofosfato (OMP)-decarboxilase em 5-fluoro-UMP (HU et al.,2008). Neste trabalho, quatro mutantes de *T. harzianum* ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$ e $\Delta P13$) selecionados em meio 5'-FOA (Figura 1A) apresentaram a expressão do gene Cas9 (Figura 1B). Correspondentemente, para realizar uma comparação de mutantes de *pyr4* com *T. harzianum* selvagem (WT) foi realizada análise do sequenciamento, a qual apresentou indels (inserção: $\Delta P3$ e deleções: $\Delta P4$, $\Delta P7$ e $\Delta P13$) na região alvo do gRNA para todos os mutantes (Figura 1C); o que evidenciou a ocorrência da recombinação não-homóloga nos microrganismos, dado que a interrupção de genes tem sido uma importante alternativa para a melhoria de cepas de *T. harzianum* e estudos genômicos funcionais. No entanto, a frequência de recombinação homóloga em espécies de *T. harzianum* é tradicionalmente muito baixa e demorada (DERNTL et al.,2015; LIU et al.,2015; LIU et al.,2017; VIEIRA et al.,2018; WANG & COLEMAN,2019). Assim, a técnica CRISPR/Cas9 possibilitou a produção de linhagem de *T. harzianum* com marca auxotrófica que também expressa o gene Cas9. Do ponto de vista prático, este trabalho introduz uma poderosa abordagem de edição de genoma em mutantes mitoticamente estáveis, apresentando

mutação endógena do gene *pyr4* realizada pelo promotor constitutivo de Cas9. Esta linhagem de *T. harzianum* produzida pode ser versátil e simples para alcançar uma nova mutagênese, uma vez que é possível transformá-la novamente com um único gene da Cas9 guiado por RNA.

A mutação do *pyr4* também gera cepas auxotróficas defeituosas para síntese de uridina (uracil). Este trabalho apresenta o estabelecimento dessa marca de seleção para a transformação genética do fungo de biocontrole *T. harzianum*. De fato, os resultados de ensaios em meio BDA sem uridina demonstraram que os mutantes ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$ e $\Delta P13$) apresentaram taxas de crescimento mais baixas em comparação com a cepa do tipo selvagem (Figura 2A). Além disso, os ensaios em BDA com uridina revelaram que todos os mutantes apresentaram taxas de crescimento maior em comparação com o WT (Figura 2A). Em relação aos ensaios realizados no meio MEX, foi demonstrado que a mutação da expressão de *pyr4* também reduziu a taxa de crescimento de mutantes na ausência de uridina. No entanto, a adição de uridina ao meio MEX apenas restabeleceu a taxa de crescimento de mutantes de maneira semelhante à WT (Figura 2B). Desta forma, o sistema CRISPR/Cas9 causou inserções e deleções (indels) nas regiões alvo do gene *pyr4*, fator que ocasionou um atraso no crescimento dos mutantes em meio sem uridina. Além disso, análises fenotípicas confirmaram que esses mutantes precisam de complemento de uridina no meio para apresentarem crescimento semelhante ao do tipo selvagem, atestando a presença dessa marca de seleção auxotrófica.

Microrganismos com marca de seleção *pyr*-negativo são amplamente utilizados em processos biotecnológicos, indústrias e pesquisas (RUIZ-DÍEZ, 2002; STEIGER et al., 2011; RANTASALO et al., 2019). De fato, a pesquisa genômica com a espécie industrial *T. reesei* entrou em uma nova era após a disponibilidade de cepas *pyr*-negativas. Mesmo assim, linhagens de *T. reesei* possuindo essa marca auxotrófica foram produzidas utilizando abordagens tradicionais de engenharia genética (GRUBER et al., 1990; STEIGER et al., 2011) ou, recentemente, utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9 (LIU et al., 2015). Além disso, pesquisas aplicando o sistema CRISPR/Cas9 em *Trichoderma* spp. relatam uso exclusivo desse sistema em *T. reesei* (LIU et al., 2015; LIU et al., 2017; HAO & SU, 2019; SONG et al., 2019). Esses trabalhos aplicaram métodos de transformação de protoplastos ou agrobactérias e descreveram apenas a transcrição in vitro do RNAm (LIU et al., 2015; LIU et al., 2017; HAO & SU, 2019; SONG et al., 2019). Outros métodos de transformação, como transformação via biobalística, podem ser utilizados em *Trichoderma* spp. Biobalística é um método de entrada direta de DNA no microrganismo e um método rápido de transformação; além disso não requer a preparação

da célula para retirada da parede celular, fator que contribui para que não ocorram danos na propriedades fisiológicas da parede celular; também permite obter um número maior de mutantes e núcleos transformados com vetores, o que facilita a seleção em meio seletivo (LORITO et al., 1993; HAZELL et al., 2000; MOOKKAN, 2018). Neste trabalho foi realizado com sucesso a transformação direta via biobalística de *T. harzianum* com o complexo Cas9/gRNA e pode ser uma alternativa para a rápida mutação de genes nesta espécie, bem como, para realizar a expressão da Cas9, fato que permite acelerar a edição do genoma nesse fungo de biocontrole. Com essas vantagens, não há relatos de uso desse método de transformação para inserir Cas9 e gRNA em outras espécies de biocontrole de *Trichoderma*.

Para avaliar os efeitos da mutação de *pyr4* e expressão de Cas9 na interação micoparasitária entre *T. harzianum* e fungos fitopatógenos, foram realizados ensaios de confronto em placas de cultura na ausência e presença de uridina. Em relação aos ensaios de *S. sclerotiorum*, foi observado que a ausência de uridina não afetou a capacidade dos mutantes de micoparasitar esse patógeno em comparação com a cepa WT (Figura 3A). No entanto, ensaios de confronto realizados na presença de uridina demonstraram que os mutantes diminuíram o crescimento excessivo de *S. sclerotiorum* em comparação com o tipo selvagem (Figura 3A).

Também foram realizados ensaios de confronto para comparar as habilidades micoparasitárias de cepas de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* (Figura 3B). Não foram observadas diferenças entre as cepas testadas quanto à inibição de *F. oxysporum* em todos os meios analisados (Figura 3B). Dessa forma, bioensaios com patógenos demonstraram que a expressão de Cas9 e o bloqueio da expressão do gene *pyr4* (OMP-descarboxilase), importante para a via de síntese da pirimidina, não reduziram a atividade micoparasita dos mutantes.

Assim, o uso do sistema CRISPR/Cas9 em *T. harzianum* possui muitas perspectivas para análise funcional de genes de biocontrole, modificações metabólicas, bem como seleção ou produção de novas linhagens para uso biotecnológico. Além de permitir a produção de linhagens que sejam mais aceitas no mercado, devido a deleção por CRISPR/Cas9 não produzir microrganismos transgênicos.

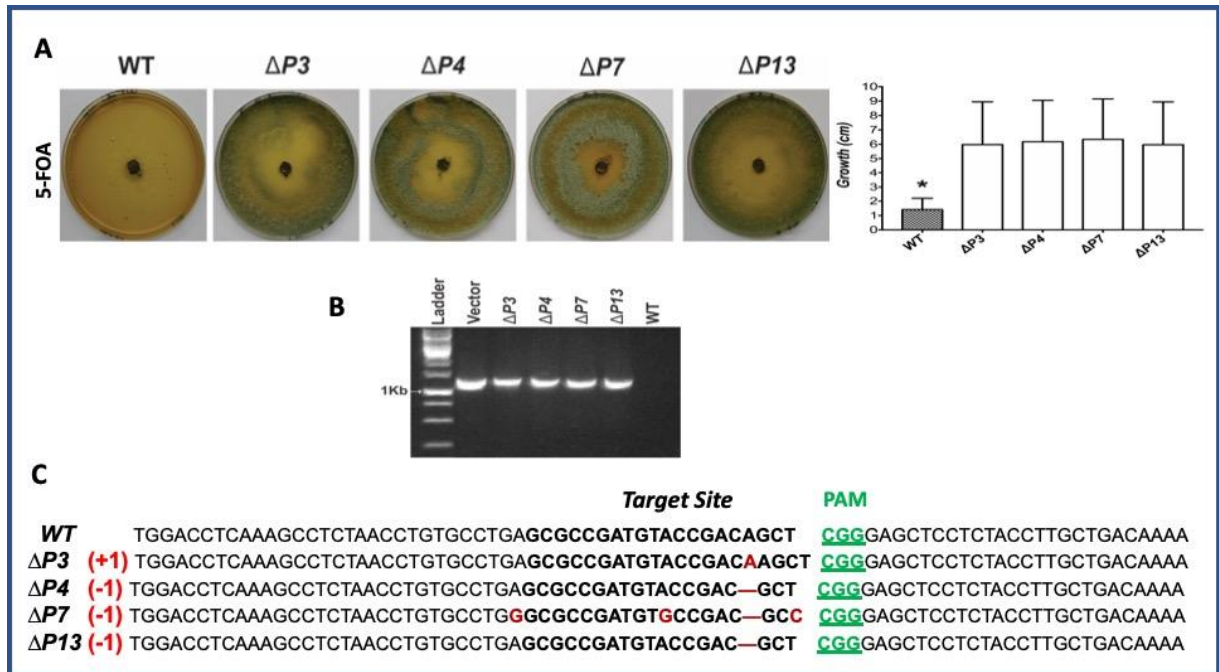


Figura 1. Linhagens de *Trichoderma harzianum* resistentes a 5'-FOA e sequenciamento.
A – Análise fenotípica de crescimento de *T. harzianum* selvagem (WT) e mutantes ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, $\Delta P13$) com deleção do gene *pyr4* em meio MEX contendo uridina e 5'-FOA após 4 dias. Gráfico de crescimento do selvagem (WT) e mutantes ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, $\Delta P13$) na presença de 5'-FOA. *Barras marcadas com asterisco diferem significativamente ($P < 0.05$). **B** – Gel de agarose com marcador de 1Kb para confirmação da presença do vetor contendo Cas9 nos mutantes de *T.harzianum* com amplificação específica de 1242 pb. **C** – Sequenciamento e caracterização indel nos mutantes de *T.harzianum* ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, $\Delta P13$). Inserção: $\Delta P3$ / Deleção: $\Delta P4$, $\Delta P7$, $\Delta P13$. As inserções e deleções estão destacadas em vermelho. A sequência alvo do gRNA está destacada em negrito. A sequência PAM está destacada em verde.

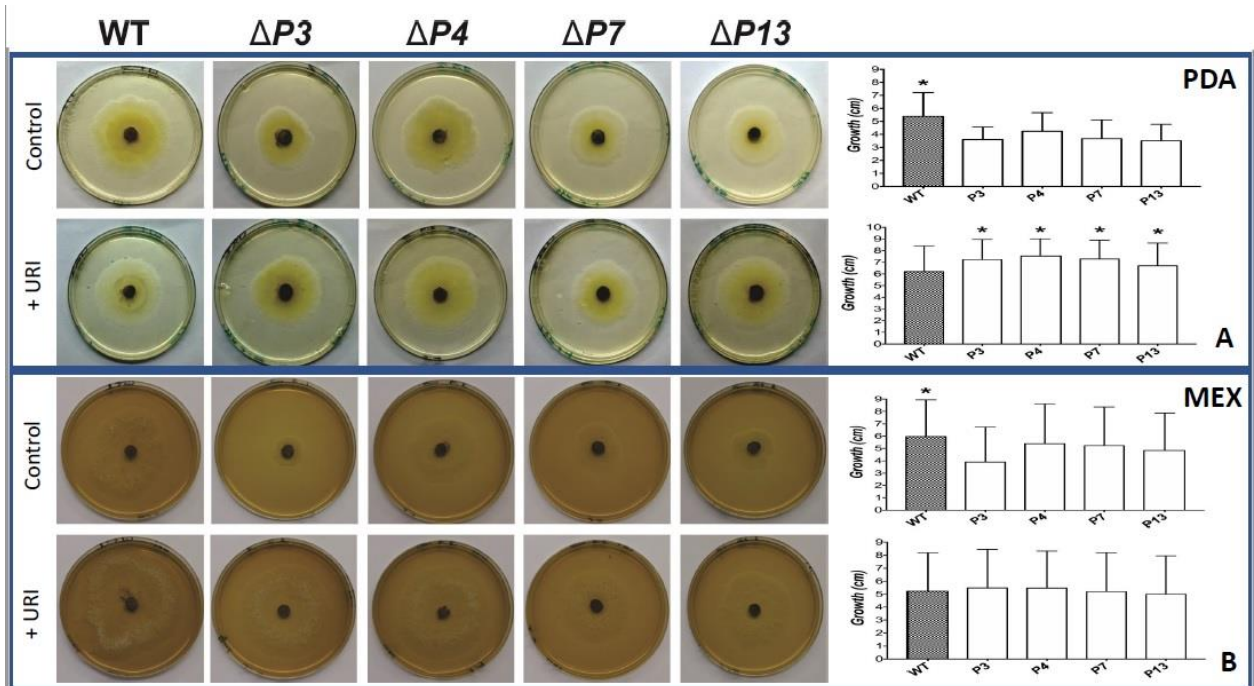


Figura 2. Análise fenotípica de crescimento dos mutantes de *Trichoderma harzianum* para auxotrofia de uridina. *T. harzianum* selvagem (WT) e mutantes ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, $\Delta P13$) foram cultivados a 28° C na ausência ou na presença de uridina. Imagens após 2 dias de bioensaios conduzidos em meios BDA (A) e MEX (B). *Barras marcadas com asterisco diferem significativamente ($P < 0.05$).

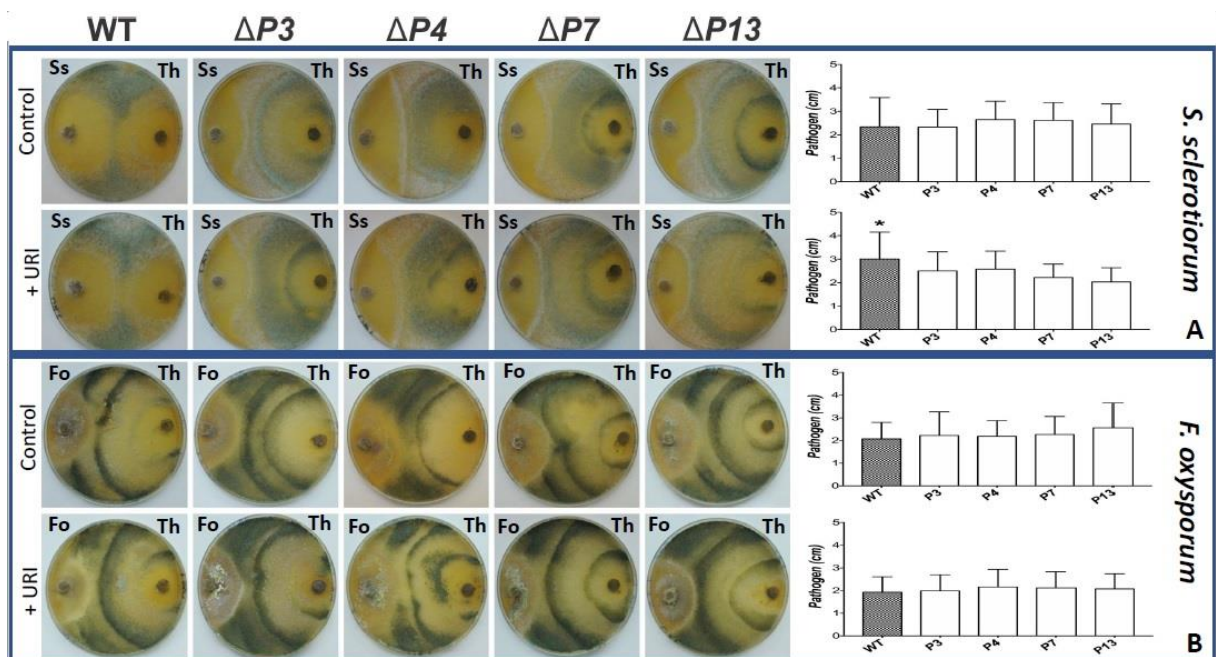


Figura 3. Atividades micoparasitárias de mutantes de *Trichoderma harzianum*. A atividade antagonística dos mutantes ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, $\Delta P13$) em comparação ao tipo selvagem de *T. harzianum* foi avaliada com ensaios de confronto em placas utilizando *Sclerotinia sclerotiorum* (A) e *Fusarium oxysporum* (B) com fungos hospedeiros (continua).

Os bioensaios foram realizados na ausência e presença de uridina. *Barras marcadas com asterisco diferem significativamente ($P < 0.05$).

CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um sistema de edição CRISPR/Cas9 para mutação do gene *pyr4* em *Trichoderma harzianum*. Além disso, foram avaliadas e confirmadas: as alterações na região alvo do gene nos mutantes de *T. harzianum* através de análises fenotípicas, moleculares e sequenciamento; as alterações de crescimento dos mutantes em meios de cultura com marcas auxotrófica (seleção negativa) e prototrófica (seleção positiva); bem como a manutenção da atividade micoparasita dos mutantes nos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Este trabalho apresenta pela primeira vez uma abordagem promissora de edição de genoma no fungo de biocontrole *T. harzianum*. Mutantes produzidos com marcas de seleção e expressão da Cas9 permitem uma ferramenta para análise funcional de genes de biocontrole, seleção de linhagens para bioformulações e geração de novas linhagens para uso biotecnológico.

REFERÊNCIAS

ADNAN, M. *et al.* Microbial Pathogenesis Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microb. Pathog.** 129, 7–18 (2019a).

ADNAN, M. *et al.* Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microb. Pathog.** 129, 7–18 (2019b).

ARAZOE, T. *et al.* Tailor-Made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 112. p. 12, 2015. doi 10.1002/bit25662

ARENAS, O.R. *et al.* Biopreparado a base de *Trichoderma harzianum rifai* para el control biológico de hongos com origen em suelo. Depositante: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Procurador: Rosa Isela Ávalos Méndez. MX 2016012860 A. Depósito: 30/09/2016. Publicação: 30/03/2018

ATANASOVA, L. *et al.* E. The Polyketide Synthase Gene pks4 of *Trichoderma reesei* Provides Pigmentation and Stress Resistance. **Eukaryotic Cell**. v.12(11), p.1499–1508, 2013. doi:10.1128/ec.00103-13.

BOETTCHER, M.; MCMANUS, M. T. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. **Molecular Cell**. v.58(4), p.575–585, 2015. doi:10.1016/j.molcel.2015.04.028.

BRASIL; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). AGROFIT-Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (2019).

CARVALHO, D.D.C. *et al.* Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.50, n.12, p.1220-1224, dez. 2015. doi:10.1590/S0100-204X2015001200012

CHEPSERGON, J.; MWAMBURI, L.; KASSIM, M.K. Mechanism of drought tolerance in plants using *Trichoderma* spp. **International Journal of Science and Research (IJSR)**. v.3, p.1592–1595, Novembro de 2014

DARIO RAFAEL, O.-H. *et al.* Production of chitosan-oligosaccharides by the chitin-hydrolytic system of *Trichoderma harzianum* and their antimicrobial and anticancer effects. **Carbohydrate Research**. 107836, 2019. doi:10.1016/j.carres.2019.107836.

DERNTL, C.; *et al.* Novel strategies for genomic manipulation of *Trichoderma reesei* with the purpose of strain engineering. **Applied Environmental Microbiology**. 2015. doi: 10.1128/AEM.01545-15

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**. V.346(6213), p.1258096, 2014. doi:10.1126/science.1258096

DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. **Microbial Biotechnology**. v.10(6), p. 1485-1499, 2017. doi: 10.1111/1751-7915.12726

GHISALBERTI, E.L. and SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biol. Biochem**. v. 23, n. 11, p. 1011-1020, 1991.

GOMES, E.V.; *et al.* The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. **Scientific Reports**. 5: 17998. 2015. doi: 10.1038/srep17998

HAJJI-HEDFI, L.; *et al.* Biological control of wilt disease complex on tomato crop caused by *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by *Verticillium leptobactrum*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25(19), p. 18297-18302. 2017. doi: 10.1007/s11356-017-0233-6

HAO, Z.; SU, X. Fast gene disruption in *Trichoderma reesei* using in vitro assembled Cas9/gRNA complex. **BMC Biotechnology**. 2019. doi: 10.1186/s12896-018-0498-y

HARMAN, G. E.; DONI, F.; KHADKA, R. B.; UPHOFF, N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. **Journal of Applied Microbiology**. 2019. doi:10.1111/jam.14368.

HARMAN, G. E.; *et al.* *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. V.2(1), p.43–56, 2004. doi:10.1038/nrmicro797

HAZELL, B. *et al.* Rapid transformation of high cellulase-production mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. **Letters in Applied Microbiology**. v. 30(4), p. 282-286. 2000. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00715.x

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**. v.158(1), p.17–25, 2012. doi:10.1099/mic.0.052274-0

HU, H., BOONE, A. & YANG, W. Mechanism of OMP decarboxylation in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. **J. Am. Chem. Soc.** v.130, p.14493–14503, 2008.

KRAPPMANN, S. CRISPR-Cas9, the new kid on the block of fungal molecular biology. **Medical Mycology** .2016. doi: 10.1093/mmy/mtw097

LIU, P.; YANG, Q. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. **Research Microbiology**. v. 156, p. 416–423, 2005. doi: 10.1016/j.resmic.2004.10.007

LIU, R. *et al.* Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. **Cell Discovery** 1, 15007, 2015.

LIU, R. *et al.* A novel transcription factor specifically regulates GH11 xylanase genes in *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. Biofuels** 10, 1–14, 2017.

LORITO, M. *et al.* Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. **Current Genetics**. v. 24(4), p. 349-356, 1993. doi: 10.1007/bf00336788

LORITO, M.; *et al.* Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. **Annual Review of Phytopathology**. v.48(1), p.395–417, 2010. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114314

MOOKKAN, M. Particle bombardment – mediated gene transfer and GFP transient expression in *Setaria viridis*. **Plant Signaling & Behavior**. v. 13(4), 2018. doi: 10.1080/15592324.2018.1441657

MUKHERJEE, M. *et al.* *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics os Biological Control-Review Article. **Indian J. Microbiol.** 2012. doi: 10.1007/s12088-012-0308-5

MUKHERJEE, P. K. A Novel Seed-Dressing Formulation Based on an Improved Mutant Strain of *Trichoderma virens* , and Its. **Field Evaluation**. v.10, p.1–13, 2019.

NICOLÁS, C. *et al.* *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. **Plant Science**. v.228, p.71–78, 2014. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.03.005

NIHEI, K.; KISHI, T. New plasmids for the disruption and repeated use of selection markers in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Applied Microbiology**. v.63, p.199–202, 2017. doi: 10.2323/jgam.2016.09.005

NØDVIG, C. S. *et al.* CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. **Plos One**, v.10(7), 2015. doi:10.1371/journal.pone.0133085

NOVY, V. *et al.* The influence of feedstock characteristics on enzyme production in *Trichoderma reesei*: a review on productivity, gene regulation and secretion profiles. **Biotechnology for Biofuels**. v.12(1), 2019. doi:10.1186/s13068-019-1571-z

PATHAK, P.; BHARDWAJ, N. K.; SINGH, A.K. Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 172(8), p. 3776-3797. 2014. doi: 10.1007/s12010-014-0758-9.

QUALHATO, T.F. *et al.* Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett**. 2013. doi:10.1007/s10529-013-1225-3

RAMADA, M.H.S.; *et al.* Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**. v.16(3), p.477-490, 2016. doi: 10.1002/pmic.201400546

RAMÍREZ-VALDESPINO, C. A.; CASAS-FLORES, S.; OLMEDO-MONFIL, V. *Trichoderma* as a Model to Study Effector-Like Molecules. **Frontiers in Microbiology**. v.10,2019. doi:10.3389/fmicb.2019.01030

RANTASALO, A. *et al.* Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. **Scientific Reports** .2019. doi: 10.1038/s41598-019-41573-8

ROCO, A.; PÉREZ, L.M. In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 4, n. 2, 2001

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Á. *et al.* Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Environmental Monitoring and Assessment**. 2016. doi: 10.1007/s10661-016-5719-z

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Á.; *et al.* Investigations of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* as biological control agent for *Xylotrechus arvicola*, a major insect pest in Spanish vineyards. **Journal of Economic Entomology**. 2018. doi: 10.1093/jee/toy256

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **J. Appl. Microbiol.** **92**, 189–95,2002.

SCHUSTER, A. & SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **87**, 787–99, 2010.

SCHUSTER, M.; KAHMANN, R.; CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**. v. 130. p. 43-53, 2019. doi: 10.1016/j.fgb.2019.04.016

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annual Review of Phytopathology**. v.48(1), p.21–43, 2010. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450

SILVA, R. N. *et al.* Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal Biology**. v.123, p.565-583, 2019. doi:10.1016/j.funbio.2019.06.010

SONG, R. *et al.* CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 103, 6919–6932, 2019.

STEIGER, M. G. *et al.* Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. **Appl. Environ. Microbiol.** 77, 114–21, 2011.

VIEIRA, P. M. *et al.* Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. **BMC Genomics** . v.14, p.177,2013.

VIEIRA, P.M. *et al.* Overexpression of an *aquaglyceporin* gene in *Trichoderma harzianum* affects stress tolerance, pathogen antagonism and *Phaseolus vulgaris* development. **Biological Control**. 2018. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.08.012

WANG, Q. & COLEMAN, J. J. Progress and Challenges: Development and Implementation of CRISPR/Cas9 Technology in Filamentous Fungi. **Comput. Struct. Biotechnol. J.** v.17, p.761–769, 2019.

WENDEROTH *et al.* Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 101, p. 55-60, 2017. doi: 10.1016/j.fgb.2017.03.001

ZHANG, J. *et al.* Drug inducible CRISPR/Cas systems. **Computacional and Structural Biotechnology Journal**. 2019. doi: 10.1016/j.csbj.2019.07.015

ZHANG, P. *et al.* Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soybean isoflavone content and resistance to soybean mosaic virus. **Plant Biotechnology Journal**. 2019. doi:10.1111/pbi.13302

ANEXO 1.**- Manuscrito****Generation of *Trichoderma harzianum* with *pyr4* auxotrophic marker by using
CRISPR/Cas9 system**

Amanda A. Vieira^a; Giovanni R. Vianna^b; Jessica C. Sousa^b; Francisco J. L. Aragão^b;
Pabline M. Vieira^{a,b,c*}

^a Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas, Instituto Federal Goiano, Rodovia Geraldo Silva Nascimento, km 2,5. CEP: 75790-000. Urutaí, GO, Brasil.

^b Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, CEP: 70770-900, Brasília, DF, Brazil.

^c Instituto Federal de Brasília, *Campus* Samambaia, Samambaia Sul, CEP 72320-328. Brasília, DF, Brazil.

* *Corresponding author:*

Instituto Federal de Brasília, *Campus* Samambaia, Samambaia Sul, CEP 72320-328. Brasília, DF, Brazil.

E-mail address: pablinebio@gmail.com

Abstract

Trichoderma harzianum is a filamentous fungus used as a biological control agent for agricultural pests. Genes of this microorganism have been studied and their applications are patented for use in biofungicides and plant breeding strategies. Gene editing technologies would be of great importance for genetic characterization of this species and has not yet been reported. This work registers obtaining of mutants with auxotrophic mark in this species using the CRISPR/Cas9 system. For this, sequences for a guide RNA and *Cas9* overexpression were inserted *via* biobalistics, and the sequencing approach proved mutants deletions and insertions at *pyr4* gene. Phenotypic characterization demonstrated a reduction in the growth of mutants in the absence of uridine, as well as resistance to 5-fluorotic acid; besides the gene disruption did not reduce mycoparasitic activity against phytopathogens. Thus, it was possible to demonstrate target disruption of *pyr4* gene in *T. harzianum* using the CRISPR/Cas9 system and also that endogenous expression of the system did not interfere with the biological control activity of pathogens. This work is the first report for this technique in this species of biocontrol and, the mutants expressing Cas9, represent biotechnological potential for generation of useful technologies in agricultural biotechnology.

Key-words: biocontrol, phytopathogen, gene editing, mycoparasitism.

Introduction

Species of the fungal genus *Trichoderma* are important biocontrol agents (BCAs) used in agriculture, but also industrial producers of enzymes¹⁻⁵. Several bioformulations already registered have been reported as both mycoparasites and nematode parasites^{3,6}. Additionally, there are already a number of researches on biotechnological applications of enzymes from these organisms for the production of biodiesel^{4,5,7,8} and transgenic plants resistant to biotic and abiotic stresses^{9,10}. Therefore, efficient molecular tools are essential for structural and functional genomics investigations in *Trichoderma* industrial and biocontrol species^{6,11,12}.

Based on studies in a number of filamentous fungus, it is very difficult to achieve gene deletion in *Trichoderma* biocontrol strains using traditional genetic approaches^{13,14}. They have an inefficient homologous recombination machinery and because it reproduces asexually, it prefers to perform non-homologous recombination, which results in a low frequency of correct genomic integration¹⁵⁻¹⁹. These challenges could be overcome by Crispr/Cas9 system, a gene editing technique in which nucleotides can be inserted, replaced or removed from the genome through endonucleases¹⁸⁻²⁰. To date, works on CRISPR/Cas9 gene editing system occurred exclusively in *Trichoderma reesei*, and were able to generate either selective marker or strains with increased proteins production^{15,19,20}. However, this species is an industrial producer of cellulases and hemicellulases that already present a high number of mutants produced using traditional genetic approaches, including strains with *pyr* as auxotrophic marker²¹⁻²⁴.

Trichoderma harzianum is a soil-borne fungus used in biofungicides for the biological control of agricultural diseases that affect crops of economic importance, such as: soybean, rice, corn, tomato, tobacco, and bean^{11,25,26}. This microorganism is cosmopolitan and performs biocontrol through several mechanisms of action, including: antibiosis, competition for nutrients and mycoparasitism; in addition to promoting plant growth, inducing greater tolerance to stresses and increasing seeds germination rates^{2,27,28}. These beneficial effects promoted by *T. harzianum* on plants are possible due to their ability to colonize and penetrate the roots of plants and to carry out symbiotic relationships^{2,3,12,29}.

Due the fact that *T. harzianum* is among the most used bioagents in today's agriculture throughout the world²⁹⁻³¹, there is an increasing interest to understand the modes of action of this biocontrol fungus and the underlying molecular processes in greater detail. The recent release of Crispr/Cas9 gene editing technique could form the basis for large-scale genetic

manipulations of this biocontrol fungus, but also the establishment of additional selection markers is crucial. Thus far, only a limited number of selection markers have been available for genetic transformation of *T. harzianum*, and OMP-decarboxylase deletion (*pyr-*) is proved to be a reliable auxotrophic marker for filamentous fungi^{5,13,21,32}. Also, effects of gene deletion together with Cas9 overexpression in a biocontrol fungus is innovative. The use of CRISPR/Cas9 gene editing system to disrupt *pyr4* gene in *T. harzianum* represent a promising strategy for validating the technique in this fungus, further works on gene edition and also functional analysis of this system during mycoparasitism.

Materials and Methods

Microorganisms and culture conditions

Trichoderma harzianum ALL42 (Enzymology group collection - UFG/ICB) was used for this study. *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum* were from the Embrapa – CNPAF culture collection. The microorganisms were maintained on potato/dextrose/agar (PDA) plates with periodic sampling and stored at 4°C in Embrapa/CNPAF before use.

Construction of the CRISPR/Cas9 gene edition system and genetic transformation of T. harzianum

For plasmid production, the *Cas9* gene from *S. pyogenes* was codon optimized for expression in *Trichoderma harzianum* and synthesized by Epoch Life Science, Inc. (Sugar Land, TX, USA). The *Cas9* sequence was inserted between the constitutive *A. nidulans gpdA* promoter and *trpC* terminator. The gRNA sequence for *pyr4* (JGI ID: 480432) edition was designed using the online E-CRISPR design server (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>) and inserted downstream of the constitutive *T. reesei tef1* promoter of the plasmid pLHhph1-tef1³³. For the construction of the CRISPR/Cas9 editing system, the *Cas9* gene and gRNA were inserted into the plasmid previously linearized. The final vector (Crispr/*pyr4*) was used to transform *T. harzianum* (All42) using M5 tungsten particle in accordance with¹⁷. After the bombardment, conidia from *T. harzianum* were plated on yeast extract/agar (MEX) plates containing 5-FOA (1.5 g/L; Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) and uridine (10 mM).

Screening of T. harzianum mutants and sequencing

Mutants obtained by phenotypic analysis (5'FOA resistance) were checked using primers that line up within the Cas9_RNAgCheC (CTGCAAGGCGATTAAGTTGG) and Cas9_3897F (ACAGCATAAGCACTACCTCG) vector sequence. In order to purify the mutants, three stages of alternating conidia were performed in PDA/ hygromycin medium, followed by isolation of single spore in PDA medium with uridine. 5-FOA resistant colonies were obtained after 3–4 days and transferred to PDA medium containing uridine for sporulation. Genomic DNA from the strains was isolated as described previously²¹ and the *pyr4* gene was sequenced using SP6 universal primer. DNA from the wild type (WT) strain was included as control.

Growth and direct confrontation assays

To analyze *Trichoderma* strains for uridine auxotrophy, mycelium-covered plugs were placed at the center of fresh PDA or MEX plates supplemented with 10 mM uridine and incubated at 28 °C for 7 days. Antagonism activity of *T. harzianum* WT and mutants against pathogens were performed as plate confrontation assay as described previously (GOMES et al., 2015), and colony diameter measurement for a period of 7 days. Two pathogens (*Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum*) were independently evaluated during confrontation with *T. harzianum* strains in uridine presence and absence. All experiments were conducted in independent biological triplicates.

Statistical analysis

The data were analyzed for normality (Shapiro-Wilk's tests) and for homogeneity (Bartlett's tests). Data that were not normal were transformed using $(x + 0.5)^{1/2}$. Afterwards, data were subjected to ANOVA, and means were separated by Dunnett's test at 5% probability whenever ANOVA was significant. The statistical analysis was performed using the software R, version 3.2.2 (R Core Team, 2016) and graphical work was carried out using GraphPad Prism version 7.0 software (La Jolla, CA, USA).

Results and discussion

Since genetic tools are poorly developed for most filamentous fungus, it is currently difficult to employ genetic engineering for understanding the biology of *Trichoderma* spp. and to fully exploit them industrially^{8,34}. Moreover, the frequency of homologous recombination in some species is traditionally very low, time-consuming and sometimes even troublesome^{15,18,19,32}. For these reasons, there is a demand for developing versatile methods that can be used

to genetically manipulate this biocontrol species. Therefore, gene editing technologies represent a bright and promising alternative in genetic engineering of *T. harzianum* and prompted us to establish new mutant lines for large-scale genetic manipulations. To facilitate this, we have developed a CRISPR/Cas9 based system adapted for use in this biocontrol fungus.

Disruption of *pyr4* confers 5-fluoroorotic acid (5-FOA) resistance to *T. harzianum*. Mutants which are defective in *pyr4* are prototrophic strains resistant to 5-FOA, which is converted by orotidine-5'-monophosphate (OMP)-decarboxylase to the toxic intermediate 5-fluoro-UMP³⁵. In our work, four *T. harzianum* mutants ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$ and $\Delta P13$) selected in 5-FOA medium (Fig. 1A) showed the codon-optimized *Cas9* gene (Fig. 1B). Correspondingly, sequencing approaches were utilized to carry out a comparative *pyr4* analysis with wild-type and it was shown indels at gRNA target for all mutants (Fig. 1C). Thus, CRISPR/Cas9 technique enabled the production of *T. harzianum* strains with auxotrophic marker that also express *Cas9* gene. From a practical perspective, our work introduces a powerful genome-editing approach in mitotically stable mutants with endogenous *pyr4* gene disruption accomplished by *Cas9* constitutively expression. This system could be versatile and simple, as new mutagenesis can be achieved in *T. harzianum* lines by re-transforming with a single RNA guided plasmid.

Disruption of *pyr4* also generates auxotrophic strains defective for uridine (uracil). In our work, we present the successful establishment of this selection marker for the genetic transformation of the biocontrol fungus *T. harzianum*. Indeed, results from assays in PDA medium without uridine demonstrated that mutants ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$ and $\Delta P13$) presented lower growth ratios compared to wild-type strain (Fig. 2A). Moreover, assays in PDA with uridine revealed that all mutants showed higher growth ratios compared to WT (Fig. 2A). In relation to assays conducted in MEX medium, it was demonstrated that *pyr4* disruption also reduced mutants growth ratio in uridine absence. However, addition of uridine to MEX medium only reestablished mutants growth ratio similarly to WT (Fig. 2B). In this way, CRISPR/Cas9 system caused insertions and deletions (indels) in target regions of *pyr4* gene and successfully interrupted gene function. In addition, phenotypic analyzes confirmed that these mutants need complement of uridine in the medium to present similar growth to the wild-type, thus certifying the presence of this convenient selection marker.

Microorganisms with *pyr*-negative marker are widely used in biotechnological processes, industries and research^{13,20,24}. Indeed, genomic research with the industrial *T. reesei*

has entered a new era after pyr-negative strains became available. Nevertheless, *T. reesei* with this auxotrophic marker have been produced using both traditional genetic approaches^{21,24} or, recently, CRISPR/Cas9 technology¹⁹. Also, researches using CRISPR/Cas9 system reveal that they are exclusively to *T. reesei*^{14,15,19,36}. These works used protoplast or agrobacterium transformation methods and described only *in vitro* transcription of gRNA^{14,15,19,36}. Our work was successfully carried out by biolistic direct transformation of *T. harzianum* with Cas9/gRNA complex and may be an alternative for fast gene disruption, as well as overexpression of a codon-optimized *Cas9* provides a means to speed up genome editing on this biocontrol fungi. With these advantages, nevertheless, there was no report of using such a technique in other *Trichoderma* biocontrol species.

Trichoderma harzianum is a cosmopolitan filamentous fungus that displays a remarkable range of applications in agricultural biotechnology^{2,3}. Because of its ability to antagonize plant-pathogens as well as stimulate plant growth and defense responses, some strains are used in bioformulation for biological control^{2,11,25,26}. In this way, gene disruption has been a critical technique for improvement of *T. harzianum* strains and biocontrol studies.

The effects of *pyr4* disruption and *Cas9* overexpression on the mycoparasitic interaction between *T. harzianum* and hosts fungus were assessed in plate confrontation assays. In relation to *S. sclerotiorum* assays, we observed that uridine absence did not affected mutants ability to mycoparasite this pathogen compared to WT strain (Figure 3A). However, confrontation assays carried out in uridine presence demonstrated that mutants decreased *S. sclerotiorum* overgrowth compared to wild-type (Figure 3A).

Confrontation assays were also performed to compare mycoparasitic abilities of *T. harzianum* strains against *F. oxysporum* either in uridine absence or presence (Figure 3B). No differences between the tested strains were observed for inhibition of *F. oxysporum* in all media analyzed (Figure 3B). In this manner, bioassays with pathogens demonstrated that *pyr4* gene disruption (OMP-decarboxylase), important for the pyrimidine synthesis pathway, in addition to Cas9 expression, did not reduce the mycoparasite activity of mutants. Thus, the use of the CRISPR/Cas9 system in *T. harzianum* has many perspectives for functional analysis of biocontrol genes, metabolic modifications, as well as the selection or production of new strains for biotechnological uses.

Conclusion

This work presents for the first time a promising approach of genome editing in the biocontrol fungus *T. harzianum*. Mutants produced with auxotrophic marker and Cas9 overexpression enable a tool for functional analysis of biocontrol genes, selection of strains for bioformulations, as well as generation of new strains for biotechnological uses.

Authors contributions

Designed the vectors and planned the experiments: PMV, GRV, and FJLA. Fungal transformation: PMV and GRV. Molecular analyses: PMV, AAV, JCS. Performed fungal bioassays: AA and PMV. Analyzed the data: PMV and AA. Contributed reagents/materials/analysis tools: FJLA, GRV, and PMV. Wrote the paper: PMV and AA. All authors read and approved the final manuscript

Acknowledgements

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- 433198/2018-4).

Legends

Figure 1. Screening of *T. harzianum* mutants resistant to 5'-FOA. **A.** Phenotype and growth of *T. harzianum* wild-type (WT) and FOA-resistant mutants ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, and $\Delta P13$). *Bars marked with asterisk differ significantly ($P < 0.05$). **B.** Genomic DNA was isolated and screened by PCR for the presence of the *Cas9* gene which yielded a specific amplicon of 1242-bp. **C.** A fragment from *pyr4*, which was used for sequencing, confirm mutants indels at target region. The sgRNA guiding sequence is highlighted in bold.

Figure 2. Phenotype analysis of *T. harzianum* mutants for uridine auxotrophy. *T. harzianum* wild-type and mutants ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, and $\Delta P13$) were grown at 28°C in uridine absence or presence. Pictures after 2 days from bioassays conducted in PDA (A) and MEX (B) media. *Bars marked with asterisk differ significantly ($P < 0.05$).

Figure 3. Mycoparasitic abilities of uridine auxotrophic mutants. The antagonistic activity of mutants ($\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P7$, and $\Delta P13$) in comparison to the *T. harzianum* wild-type was assessed in plate confrontation assays using *Sclerotinia sclerotiorum* (A) or *Fusarium oxysporum* (B) as host fungus. Bioassays were conducted in uridine presence and absence. *Bars marked with asterisk differ significantly ($P < 0.05$).

References

1. Druzhinina, I. S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 749–59 (2011).
2. Adnan, M. *et al.* Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microb. Pathog.* **129**, 7–18 (2019).
3. Harman, G. E. & Uphoff, N. Symbiotic Root-Endophytic Soil Microbes Improve Crop Productivity and Provide Environmental Benefits. **2019**, (2019).
4. Novy, V., Nielsen, F., Seiboth, B. & Nidetzky, B. Biotechnology for Biofuels The influence of feedstock characteristics on enzyme production in *Trichoderma reesei* : a review on productivity , gene regulation and secretion profiles. *Biotechnol. Biofuels* 1–16 (2019). doi:10.1186/s13068-019-1571-z
5. Druzhinina, I. S. & Kubicek, C. P. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb. Biotechnol.* **10**, 1485–1499 (2017).
6. Naranjo-Ortiz, M. A. & Gabaldón, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biol. Rev.* **94**, 1443–1476 (2019).
7. Jiang, D. *et al.* Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi : Recent advances and new strategies. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1562–1574 (2013).
8. Schuster, A. & Schmoll, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 787–99 (2010).
9. Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K. & Monte, E. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance- status and prospects. *Plant Sci.* **228**, 71–78 (2014).
10. Vieira, P. M. *et al.* Overexpression of an aquaglyceroporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol. Biochem.* **121**, 38–47 (2017).
11. Silva, R. N. *et al.* *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biol.* **123**, 565–583 (2019).
12. Adnan, M. *et al.* Microbial Pathogenesis Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microb. Pathog.* **129**, 7–18 (2019).
13. Ruiz-Díez, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 189–95 (2002).

14. Song, R. *et al.* CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 6919–6932 (2019).
15. Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zou, G. & Zhou, Z. A novel transcription factor specifically regulates GH11 xylanase genes in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* **10**, 1–14 (2017).
16. Zeilinger, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr. Genet.* **45**, 54–60 (2004).
17. Vieira, P. M. *et al.* Overexpression of an aquaglyceroporin gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma harzianum* affects stress tolerance, pathogen antagonism and *Phaseolus vulgaris* development. *Biol. Control* **126**, 185–191 (2018).
18. Wang, Q. & Coleman, J. J. Progress and Challenges: Development and Implementation of CRISPR/Cas9 Technology in Filamentous Fungi. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **17**, 761–769 (2019).
19. 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.* **1**, 1–11 (2015).
20. Rantasalo, A. *et al.* Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Sci. Rep.* **9**, 5032 (2019).
21. Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C. P. & de Graaff, L. H. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Curr. Genet.* **18**, 71–6 (1990).
22. Jørgensen, M. S., Skovlund, D. A., Johannesen, P. F. & Mortensen, U. H. A novel platform for heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* (Teleomorph *Hypocrea jecorina*). *Microb. Cell Fact.* **13**, 1–9 (2014).
23. LONG, H., WANG, T. hong & ZHANG, Y. kuan. Isolation of *Trichoderma reesei* *pyrG* Negative Mutant by UV Mutagenesis and Its Application in Transformation. *Chem. Res. Chinese Univ.* **24**, 565–569 (2008).
24. Steiger, M. G. *et al.* Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 114–21 (2011).
25. Vieira, P. M. *et al.* Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological

- application. *BMC Genomics* **14**, 177 (2013).
26. Mukherjee, P. K. A Novel Seed-Dressing Formulation Based on an Improved Mutant Strain of *Trichoderma virens*, and Its Field Evaluation. **10**, 1–13 (2019).
 27. Guzm, P., Porrás-troncoso, D., Olmedo-monfil, V. & Herrera-estrella, A. *Trichoderma* Species : Versatile Plant Symbionts. 6–16 (2019). doi:10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW
 28. Mendoza-Mendoza, A. *et al.* Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biol. Rev.* **32**, 62–85 (2018).
 29. Silva, R. N. *et al.* *Trichoderma* / pathogen / plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biol.* **123**, 565–583 (2019).
 30. Kubicek, C. P. *et al.* Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* **12**, R40 (2011).
 31. Mukherjee, M. *et al.* *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian J. Microbiol.* **52**, 522–529 (2012).
 32. Derntl, C., Kiesenhofer, D. P., Mach, R. L. & Mach-Aigner, A. R. Novel strategies for genomic manipulation of *Trichoderma reesei* with the purpose of strain engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 6314–6323 (2015).
 33. Akel, E., Metz, B., Seiboth, B. & Kubicek, C. P. Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryot. Cell* **8**, 1837–44 (2009).
 34. Lorito, M., Woo, S., Harman, G. & Monte, E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 395–417 (2010).
 35. Hu, H., Boone, A. & Yang, W. Mechanism of OMP decarboxylation in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14493–14503 (2008).
 36. Hao, Z. & Su, X. Fast gene disruption in *Trichoderma reesei* using in vitro assembled Cas9/gRNA complex. *BMC Biotechnol.* **19**, 1–7 (2019).