

Fundamentos de engenharia genética e edição gênica: uma revisão sistemática sobre as diferentes técnicas utilizadas em fungos filamentosos

Fundamentals of genetic engineering and gene editing: a systematic review of filamentous fungi applications and developments

Nikael Souza de Oliveira¹, Fernanda Pessi Abreu¹, Scheila de Ávila e Silva¹.

¹ Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Resumo

Introdução: O advento das tecnologias de edição gênica permite modificar organismos de modo específico. Dessa forma, pode-se selecionar um organismo com potencial biotecnológico e melhorar a produção de suas enzimas e metabólitos. **Objetivo:** Este trabalho tem como objetivo elencar as técnicas de edição gênica utilizadas em fungos nos últimos cinco anos (2015-2019). **Metodologia:** Foi empregada uma revisão sistemática da literatura. Para tal, realizou-se as seguintes etapas: Elaboração das perguntas a serem respondidas; Determinação das *strings* de busca e dos bancos de dados; Definição de critérios de inclusão e exclusão de artigos; Seleção, extração, análise e interpretação dos resultados. **Resultados:** Obteve-se 32 artigos, os quais descrevem nove técnicas de edição gênica: Mutagênese Clássica; Nocaute gênico induzido por transposon (TAGK); Integração mediada por enzimas de restrição (REMI); Meganucleases; Recombinação homóloga; Nucleases efectoras do tipo ativadoras de transcrição (TALENs); Nucleases dedo de Zinco (ZFNs); Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT); e *Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats* associado a nuclease Cas9 (CRISPR/Cas9). CRISPR/Cas9 foi a tecnologia predominante nos trabalhos. **Conclusão:** Para realização da engenharia genética em um organismo, além da técnica de edição gênica é necessário a escolha de um vetor e de uma técnica de transformação, bem como conhecimento acerca do mecanismo de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) na espécie-alvo. Existem diferentes tecnologias, com diferentes fundamentos, a escolha de qual técnica utilizar dependerá da avaliação da equipe e do objetivo da pesquisa.

Palavras-chave: Engenharia Genética; Edição Gênica; CRISPR/Cas9; Fungos; Revisão sistemática.

Autor correspondente:

Nikael Souza de Oliveira

Endereço: Rua Clélia Manfro 1897 - Petrópolis - Caxias do Sul

E-mail: nsoliveira4@ucs.br

Recebido em: 09/06/2020

Revisado em: 15/06/2020

Aceito em: 14/04/2021

Publicado em: 08/07/2021

Abstract

Introduction: The advent of gene editing technologies allow humans to modify organisms according to their interest. As a matter of consequence, it is possible to select an organism with biotechnological potential and increase the enzymes and metabolites production. **Objective:** This work aims to cover the genetic editing techniques used in fungi in the last five years (2015-2019). **Methodology:** For this, a systematic review of the literature was carried out. Differing from conventional reviews, this method presents a well-defined protocol with the following steps: Definition of the questions to be answered; Determination of search strings and databases to be used; Definition of inclusion and exclusion criteria for articles; Selection, extraction, analysis and interpretation of results. **Results:** 32 articles were obtained, which describe nine techniques of gene editing: Classical Mutagenesis; Transposon-induced gene knockout (TAGK); Restriction enzyme-mediated integration (REMI); Meganucleases; Homologous recombination; Transcription activating effector nucleases (TALENs); Zinc Finger Nucleases (ZFNs); Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (ATMT); and Clustered, regularly, interspaced, short palindromic repeats associated with Cas9 nuclease (CRISPR/Cas9). Overall, CRISPR/Cas9 system was the predominant technology in the articles analysed. **Conclusion:** To perform genetic engineering in an organism, apart from the gene editing technique, it is necessary to select a vector and a transformation technique, as well as build knowledge on DNA repair mechanisms of the target species. There are different technologies with distinct fundamentals, and the choice of which to use will depend on the research team evaluation and objectives.

Keywords: Genetic Engineering; Gene Editing; CRISPR/Cas9; Fungi; Systematic Review.

Introdução

O período de tempo entre a descoberta da estrutura de dupla hélice, em 1953¹, e a técnica de edição gênica *Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats* associado a nuclease Cas9 (CRISPR/Cas9), em 2012², é um indicativo do avanço das tecnologias relacionadas ao ácido desoxirribonucleico (DNA). As primeiras tecnologias que visavam à alteração do DNA eram baseadas em técnicas de mutagênese aleatória utilizando métodos químicos ou físicos³⁻⁶. Em um segundo momento, surgiram tecnologias que possibilitaram o silenciamento ou inserção aleatória de genes no genoma⁴. Por fim, as novas técnicas de edição gênica permitem uma alteração precisa do alvo de interesse⁷. O advento da engenharia genética possibilitou a manipulação e regulação de genes, ocasionando, por exemplo, o aprimoramento de microrganismo para produção de bioprodutos⁸.

Dentre os microrganismos biofábricas, produtores de metabólitos primários e secundários de interesse biotecnológico há destaque para os fungos

filamentosos. Por meio da engenharia de genoma, estes apresentam grande potencial para melhoria da expressão e secreção de bioprodutos. Visto isso, com o advento da engenharia genética metodologias moleculares foram desenvolvidas para os fungos filamentosos^{9,10}. Nesse sentido, este trabalho fornece uma revisão sistemática da literatura sobre os fundamentos e as técnicas de edição gênica utilizadas em fungos filamentosos nos últimos cinco anos.

Metodologia

As revisões sistemáticas de literatura são importantes ferramentas para divulgação científica, são úteis na necessidade de uma consulta rápida sobre algum campo de pesquisa e seus principais autores¹¹. Diferem de revisões convencionais por utilizarem um protocolo bem delimitado com critérios de inclusão e exclusão dos trabalhos¹². Para realização da presente revisão sistemática, foi adaptada a metodologia descrita por UMAN *et al* (2011)¹², de modo a analisar os principais fundamentos e técnicas de edição gênica utilizadas em fungos, nos últimos cinco anos (**FIGURA 1**).

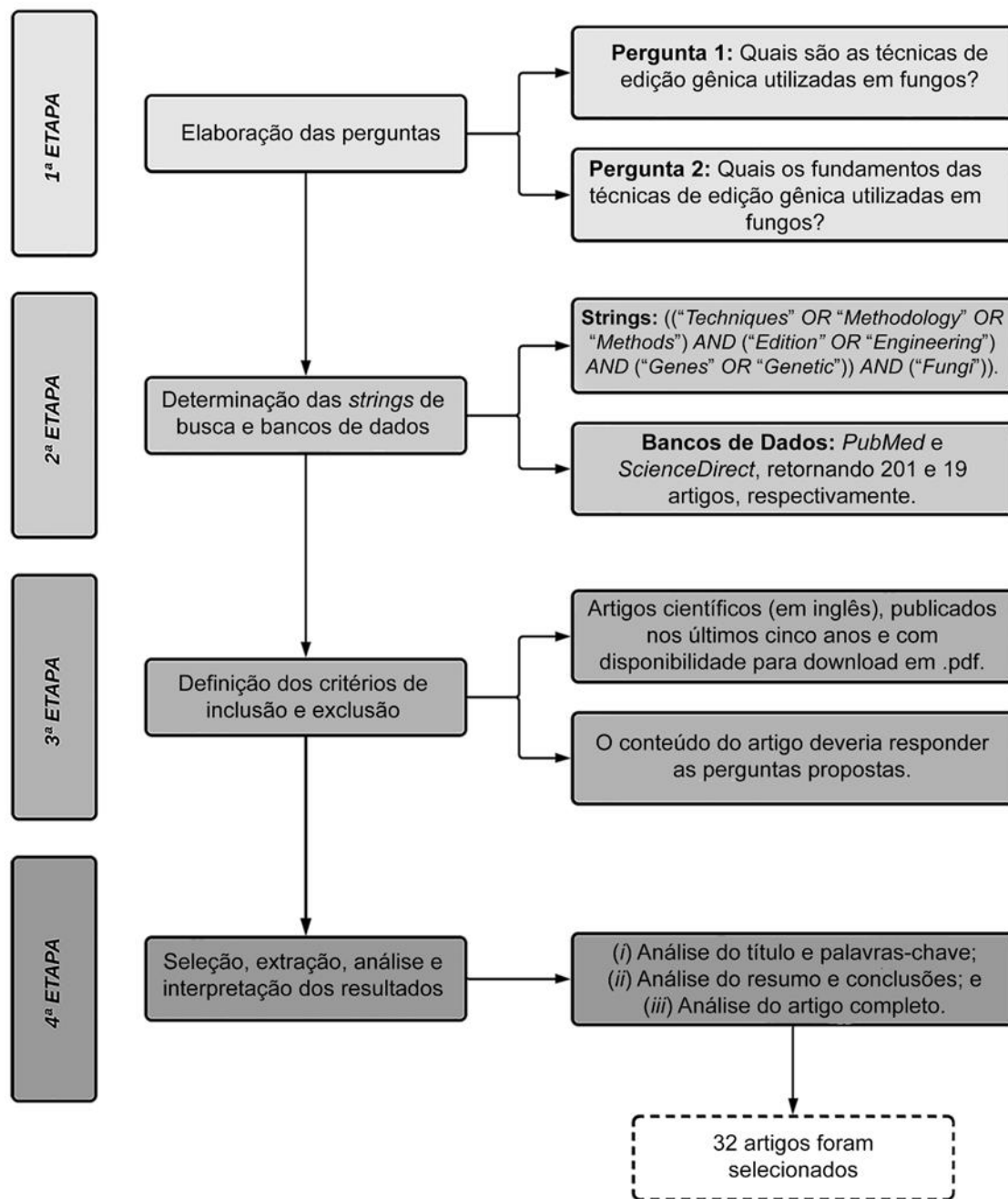


FIGURA 1 - Workflow das etapas metodológicas utilizada na revisão sistemática da literatura. A metodologia foi composta por quatro etapas: (i) elaboração das perguntas; (ii) determinação das *strings* de busca e bancos de dados; (iii) definição dos critérios de inclusão e exclusão; e (iv) seleção, extração, análise e interpretação dos resultados

Resultados

Durante o processo de obtenção dos artigos, a partir das *strings* de busca, foram obtidos 220 artigos, destes, 201 do banco de dados *PubMed* e 19 do banco de

dados *ScienceDirect*. Após análise descrita na etapa 4, eliminaram-se os artigos que não respondiam às perguntas, remanescendo 32 artigos^{3-7,13-39} (Tabela comparativa dos artigos está disponível no material suplementar).

Destes 32 artigos selecionados, identificou-se a presença de nove técnicas de edição gênica: (i) Técnicas de Mutagênese Clássica; (ii) Nocaute gênico induzido por transposon (TAGK); (iii) Integração mediada por enzimas de restrição (REMI); (iv) Meganucleases; (v) Recombinação homóloga; (vi) Nucleases efetoras do tipo ativadoras de transcrição (TALENs); (vii) Nucleases dedo de Zinco (ZFNs); (viii) Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT); e (ix) *Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats* associado a nuclease Cas9 (CRISPR/Cas9).

O número de trabalhos em que cada técnica foi descrita está disposto na **TABELA 1**, percebe-se que a soma dos trabalhos é 37, isso ocorre, pois mais de uma técnica é descrita por trabalho. Realizou-se a estatística descritiva das frequências relativas entre o número de trabalhos em que cada técnica é citada, e o número total de trabalhos selecionados após a etapa de inclusão e exclusão (32)

FIGURA 2.

TABELA 1 - Técnicas de edição gênica X número de trabalhos.

| Técnica | Número de trabalhos |
|-----------------------|---------------------|
| Mutagênese | 2 |
| TAGK | 1 |
| REMI | 1 |
| Meganucleases | 1 |
| Recombinação Homóloga | 2 |
| TALENs | 3 |
| ZFNs | 2 |
| ATMT | 5 |
| CRISPR/Cas9 | 20 |

Técnicas de edição gênica e número de trabalhos em que são descritas nos artigos selecionados por esta revisão sistemática.

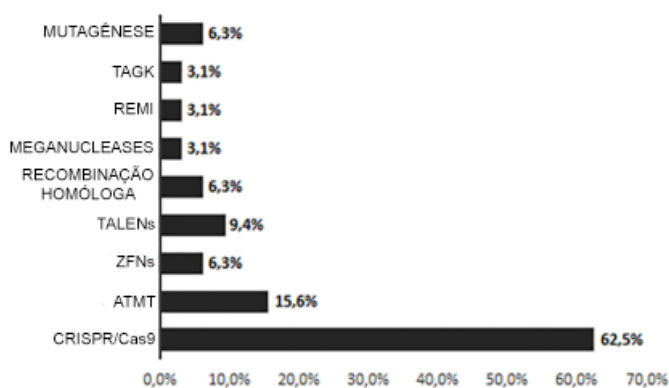


FIGURA 2 - Frequências relativas. O gráfico apresenta as frequências relativas das técnicas de edição gênica utilizadas em fungos nos últimos cinco anos ($FR = Ni/32 * 100$).

Discussão

As diversas tecnologias de edição gênica utilizadas na atualidade possuem suas características e particularidades. Tanto técnicas mais antigas que utilizam de alterações inespecíficas do DNA, como técnicas mais refinadas com alterações sítio-dirigidas são descritas na literatura como utilizadas em fungos nos últimos cinco anos. A escolha de qual técnica será utilizada dependerá da avaliação da equipe bem como do objetivo da pesquisa.

Durante a leitura dos artigos selecionados na revisão sistemática, foram encontradas algumas lacunas no quesito fundamentos. De modo a complementar a discussão, essas lacunas foram preenchidas com outras referências bibliográficas, citadas no texto e dispostas na seção referências.

Mutagênese Clássica

Os processos de mutagênese têm sido utilizados para melhorar potenciais biotecnológicos em microrganismos⁵, e como forma de testar funções gênicas⁴. Consistem em causar mutações aleatórias no genoma, de modo a produzir variabilidade genética.

Outro método agrupado na classificação de mutagênese clássica é o embaralhamento do genoma (*Genome Shuffling*), uma técnica mais conveniente e econômica⁵⁻⁶. Consiste em rodadas de fusão de protoplastos, o que permite a recombinação do genoma das populações iniciais. Os processos de mutagênese criam variabilidade genética, podendo melhorar a produção do produto de interesse, mas também podem ser prejudiciais ao organismo³.

Recombinação homóloga

A tecnologia de substituição gênica por recombinação homóloga auxilia na manipulação de sequências específicas⁴. Foi relatada baixa eficiência em fungos devido à predominância do mecanismo de integração NHEJ, com exceção de *Saccharomyces cerevisiae*^{4,18}. Para essa metodologia, é necessária a identificação de um gene de interesse, seja para silenciamento, seja para assimilação. Em sequência, é necessário a construção de um DNA vetor, geralmente um

plasmídeo, com regiões de homologia flanqueando a região do gene selecionado^{4,40}.

Nocaute gênico mediado por transposon

Transposon ou elementos transponíveis são longas sequências de DNA capazes de modificar seu local no genoma, mediados por uma transposase^{40,41}. Estes podem se inserir no interior de um gene funcional, ocasionando um nocaute gênico⁴.

A técnica de nocaute gênico induzido por transposon foi utilizada para avaliação da função gênica, principalmente em *Arabidopsis thaliana*⁴⁰ e estabelecida em fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium griseoroseum*, *Fusarium oxysporum* e *Mycosphereella graminiciola*⁴. Nesta revisão sistemática, foi encontrado apenas em 1 artigo, indicando uma possível baixa frequência de utilização dessa técnica em fungos filamentosos.

Integração mediada por enzimas de restrição (REMI)

As endonucleases de restrição foram descobertas em 1970 por Hamilton Smith e Daniel Nathans⁴⁰. Essas enzimas possuem capacidade de clivar o DNA em regiões específicas, geralmente palindrômicas. Existem vários tipos de enzimas de restrição, algumas podem reconhecer o sítio de clivagem e deixar as quebras com pontas cegas, outras podem deixar extremidades coesivas. O melhor exemplo é a enzima *EcoRI* que reconhece a sequência 5'-GAATTC-3' e 3'-CTTAAG-5' realizando o corte sempre entre os nucleotídeos G e A, permitindo a formação das pontas coesivas. Quando realizado corte no DNA vetor e no DNA do organismo com o as mesmas enzimas de restrição, as pontas coesivas são complementares, permitindo o pareamento e reparo por substituição gênica^{4,41}.

Meganucleases

Meganucleases, ou “*homing endonucleases*” são enzimas com sítio de reconhecimento de 14 a 40 pares de base (pb), o que as torna enzimas de restrição altamente específicas⁷. Conforme os resultados estatísticos desta revisão sistemática, meganucleases não apresentaram

baixa frequência de utilização em fungos nos últimos cinco anos, já que foi encontrado apenas em 1 artigo.

Nucleases dedo de zinco (ZFNs)

Nucleases dedo de zinco (ZFNs) são enzimas que possuem dois domínios: uma proteína dedo de zinco (ZFP) fundida a uma nuclease *FokI*^{7,30}. *FokI* é uma enzima de restrição isolada de *Flavobacterium okeanokoites*, atua sempre como dímero, necessitando de uma enzima na fita molde e uma enzima na fita complementar. Reconhece a sequência 5'-GGATG-3' realizando a clivagem nove nucleotídeos *downstream*, e a sequência complementar 3'-CCTAC-5', realizando a clivagem 13 nucleotídeos *upstream*^{7,42}. ZFP é a parte da enzima que vai dar especificidade a técnica, é um conjunto de motivos que reconhecem 3 pb. Em cada ZFP, são utilizados de 3 a 6 motivos, reconhecendo de 9 a 18 pb o que concede especificidade⁷. ZFNs fazem possível a manipulação do genoma de forma específica¹⁷, e tem sido utilizada nos últimos anos^{22,24}.

(VII) Nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs)

Da mesma forma que ZFNs, as Nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) possuem 2 domínios, 1 deles é o *FokI*^{4,7,30}. O segundo domínio é uma proteína efetora do tipo ativador transcricional (TALE), constituída de vários domínios, de 33 a 35, e cada domínio reconhece apenas 1 pb⁷. Esse reconhecimento de base única oferece uma maior flexibilidade que ZFNs para a construção da enzima, com regiões homólogas a da sequência de interesse^{4,7,30}, portanto a manipulação e construção do TALE é o desafio para determinar a especificidade dessa técnica.

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) é uma tecnologia completa, sendo a técnica de edição, o vetor e a técnica de transformação. *A. tumefaciens* é uma bactéria Gram-negativa, presente no solo e causadora de galha-de-coroa em plantas^{14,20}. Naturalmente, *A. tumefaciens* possui um plasmídeo com T-DNA, ladeado por sequências repetitivas imperfeitas, e uma região com os genes de virulência (*vir*). A região *vir*

possui genes que codificam as enzimas necessárias para excisão, transferência e integração do T-DNA que, por sua vez, apresenta genes atuantes na rota metabólica de fito-hormônios, responsáveis pela formação dos tumores celulares na galha-de-coroa⁴⁰.

A técnica foi identificada e utilizada, primeiramente em plantas, devido ao seu mecanismo natural de transferência de genes⁴⁰, mas sua capacidade em fungos já foi comprovada. Na tecnologia de edição gênica, é utilizado um vetor binário: um plasmídeo contendo os genes *vir* e um segundo contendo o gene de interesse no interior do T-DNA^{4,29}. ATMT realiza integração de forma aleatória no genoma e possui uma alta taxa de eficiência. Além disso, a capacidade de ser utilizada em qualquer tipo de tecido (conídios, micélio ou corpo de frutificação) sem necessidade da preparação de protoplastos^{13,20}.

Clustered regularly interspaced shor palindromic repeats (CRISPR)

A sistema *Clustered regularly interspaced shor palindromic repeats* (CRISPR) é uma forma de imunidade adaptativa contra invasões por fagos⁷. Após infecção pelo bacteriófago, um complexo Cas1/Cas2 identifica o DNA alvo a partir de uma sequência conservada denominada de PAM (este sistema PAM é diferente entre as várias CRISPR/Cas⁷). A região PAM e uma sequência imediatamente seguida a ela, são utilizadas como “espaçadores” das “repetições curtas”. Pode-se descrever essa fase, como a imunização da célula¹⁴.

Quando a defesa antifágica é estimulada, o complexo CRISPR é sintetizado. O RNA da região espaçadora adquirida somada à repetição curta já disposta no genoma é chamado de crRNA e atua como guia de direção. Um gene de tracrRNA também é transcrito, e pareia sua região de homologia com a região de repetição curta do crRNA formando um complexo, auxiliando também no processamento do transcrito. Esse complexo crRNA/tracrRNA (sgRNA)¹⁶⁻¹⁷, por sua vez, associa-se à endonuclease Cas9, formando um novo complexo capaz de realizar a clivagem do DNA de forma específica, geralmente em nucleotídeos *upstream* a região PAM⁴⁰.

A endonuclease Cas9 possui atividade como helicase e nuclease²², realizando o corte da dupla fita a 3 nucleotídeos (nt) da região PAM⁷, ocasionando fragmentos de pontas cegas dependentes, principalmente, da via de reparo por NHEJ¹⁶. Uma mutação de troca de aspartato por alanina (D10A) no domínio catalítico, ocasionou a nickase ou Cas9n que, em vez de clivar a dupla fita, realiza o corte em apenas uma fita, minimizando a atuação fora de alvo da Cas9 selvagem. Há também uma variante da enzima chamada de Cas9 morta (Cas9d) que não possui atividade catalítica, portanto apenas se liga no local alvo impedindo a transcrição⁷.

Para transformação do sistema CRISPR, geralmente se utiliza como vetor um plasmídeo ou um vírus²², já tendo sido relatado a utilização de ATMT para plantas¹⁹. Segundo os dados obtidos nesta revisão sistemática, essa tecnologia é a que mais tem sido relatada em fungos, nos últimos cinco anos, e foi demonstrada com eficiência em diversas espécies de fungos lignocelulolíticos³.

Conclusão

Com base nos artigos selecionados, pode-se perceber que a engenharia genética em fungos envolve quatro aspectos básicos: (i) uma tecnologia de edição gênica; (ii) um vetor; (iii) uma técnica de transformação; e (iv) conhecimento acerca de mecanismos de reparo de DNA existentes nos organismos alvo. Nos últimos cinco anos, foram descritas na literatura diferentes metodologias para edição gênica de fungos, essas com grau de eficiência variada. As técnicas mais relatadas foram ATMT e CRISPR/Cas9. Por fim, apesar de ser grupo de organismos filogeneticamente próximos, as técnicas apresentam diferentes graus de eficiência em espécies distintas, não apresentando um padrão. Cabe à equipe de pesquisa investigar e avaliar a melhor técnica disponível para a modificação do seu organismo específico, levando em consideração o objetivo do trabalho.

Conflito de interesses

Os autores do artigo afirmam que não se encontram em situações de conflito de interesse que possam influenciar o desenvolvimento do trabalho, tais como emissão de pareceres, propostas de financiamento, promoções ou participação em comitês consultivos ou diretivos, participação em estudos clínicos e/ou experimentais subvencionados; atuação como palestrante em eventos patrocinados; participação em conselho consultivo ou diretivo; comitês normativos de estudos científicos; recebimento de apoio institucional; propriedade de ações; participação em periódicos patrocinados, assim como qualquer relação financeira ou de outra natureza com pessoas ou organizações que possam influenciar o trabalho de forma inapropriada.

Referências bibliográficas

1. WATSON, J. D.; CRICK, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**. v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.
2. JINEL, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**. v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.
3. KUN, R.; GOMES, A.C.S.; HILDÉN, K.S.; CEREZO, S.S.; MÄKELÄ, M.R.; VRIES, R.P. Developments and opportunities in fungal strain engineering for the production of novel enzymes and enzyme cocktails for plant biomass degradation. **Biotechnology Advances**. v. 37, n. 6, 2019.
4. WANG, S.; CHEN, H.; TANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, W.; CHEN, Y.Q. Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 101, n. 22, p. 8063-8075, 2017.
5. ZHANG, Y.; YOSHIDA, M.; VADLANI, P.V.

- Biosynthesis of D-lactic acid from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letter**. v. 40, n. 8, p. 1167-1179, 2018.
6. ZHU, Z.; WU, X.; LV, B.; WU, G.; WANG, J. JIANG, W. A new approach for breeding low-temperature-resistant *Volvariella volvacea* strains: Genome shuffling in edible fungi. **Biotechnology And Applied Biochemistry**. v. 63, n. 5, p. 605-615, 2016.
7. EL-SAYED, A. S. A.; ABDEL-GHANY, S. E.; ALI, G. S. Genome editing approaches: manipulating of lovastatin and taxol synthesis of filamentous fungi by CRISPR/Cas9 system. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 101, n. 10, p.3953-3976, 2017.
8. REN, J.; LEE, J.; NA, D. Recent advances in genetic engineering tools based on synthetic biology. *Journal of Microbiology*. v. 58, n. 1, p. 1-10, 2020.
9. KLUGE, J.; TERFEHR, D.; KÜCK, U. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 102, n. 15, p. 6357-6372, 2018.
10. WANG, Q.; ZHONG, C.; XIAO, H. Genetic engineering of filamentous fungi for efficient protein expression and secretion. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**. v. 8, 2020.
11. APPOLINÁRIO, F. **Dicionário de metodologia científica: Um guia para a produção de conhecimento científico**. 2. ed. São Paulo: Atlas, 2011.
12. UMAN, L.S. Systematic reviews and meta-analyses. **Journal Of The Canadian Academy Of Child And Adolescent Psychiatry**. v. 20, n. 1, p. 57-59, 2011.
13. CAO, F.; CHENG, J.; CHEN, X.; LI, Y.; MAO, X. Development of an efficient genetic system in a gene cluster-rich endophytic fungus *Calcarisporium arbuscula* NRRL 3705. **Journal Of Microbiological Methods**. v. 151, p. 1-6, 2018
14. CARROLL, M.; ZHOU, X. Panacea in progress: CRISPR and the future of its biological research introduction. **Microbiological Research**. v. 201, p. 63-74, 2017.
15. CENARK, P.; ESTRELA, R.; PODDAR, S.; SKERNER, J.M.; CHENG, Y.; CARLSON, A. K. *et al.* Engineering *Kluyveromyces marxianus* as a robust synthetic biology platform host. **Mbio**. v. 9, n. 5, p. 1-16, 2018.
16. CSÖRGÖ, B.; NYERGES, Á.; PÓSFAL, G.; FEHÉR, T. System-level genome editing in microbes. **Current Opinion in Microbiology**. v. 33, p. 113-122, 2016.
17. DING, Y.; WANG, K.; WANG, W.; MA, Y.; SHI, T.; HUANG, H.; JI, X. Increasing the homologous recombination efficiency of eukaryotic microorganisms of enhanced genome engineering. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 103, n. 11, p. 4313-4324, 2019.
18. GOARIN, A.; SILAR, P.; MALAGNAC, F. Gene replacement in *Penicillium requeforti*. **Current Genetics**. v. 61, n. 2, p. 203-210, 2015.
19. GOULINS, E.H.; GALDENO, D.M.; GRANATO, L.M.; MATSUMURA, E.E.; DALIO, R.J.D.; MACHADO, M. A. RNA interference and CRISPR: Promising approaches to better understand and control citrus pathogens. **Microbiological Research**. v. 226, p. 1-9, 2019.
20. HE, L.; FENG, J.; LU, S.; CHEN, Z.; CHEN, C.; HE, Y. *et al.* Genetic transformation of fungi. **The International Journal Of Developmental Biology**. v. 61, p. 375-381, 2017.

21. HUANG, L.; DONG, H.; ZHENG, J.; WANG, B.; PAN, L. Highly efficient single base editing in *Aspergillus niger* with CRISPR/Cas9 cytidine deaminase Fusion. **Microbiological Research**. v. 223-225, p. 44-50, 2019.
22. JAVED, M.; NOMAN, M.; SHAHID, M.; AHMED, T.; KHURSHID, M.; RASHID, M. H. *et al.* Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells. **Microbiological Research**. v. 219, p. 1-11, 2019.
23. KATAYAMA, T.; NAKAMURA, H.; ZHANG, Y.; PASCAL, A.; FUJII, W.; MARUYAMA, J. Forced recycling of an AMA1-Based genome-editing plasmid allows for efficient multiple gene deletion/integration in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 85, n. 3, p. 1-16, 2018.
24. LI, D.; TANG, Y.; LIN, J.; CAI, W. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. **Microbial Cell Factories**. v. 16, n. 168, p. 1-13, 2017.
25. LOVETT, B.; LEGER, R. J. S. Genetically engineering better fungal biopesticides. **Pest Management Science**. v. 74, n. 4, p. 781-789, 2017.
26. NGUYEN, K.T.; HO, Q. N.; PHAM, T. H.; PHAN, T.; TRAN, V. The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**. v. 32, n. 12, p. 1-9, 2016.
27. NODVIG, C.; HOOF, J. B.; KOGLE, M. E.; JARCZYNSKA, Z. D.; LEHMBECK, J.; KLITGAARD, D. K.; MORTENSEN, U. H. Efficient Oligo Nucleotide Mediated CRISPR-Cas9 Gene Editing in *Aspergilli*. **Fungal Genetics And Biology**. v. 115, p. 78-89, 2018.
28. NODVIG, C. S.; NIELSEN, J. B.; KOGLE, M. E. MORTENSEN, U. H. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. **PLoS One**. v. 10, n. 7, p. 1-18, 2015.
29. NORA, L. C.; WESTMANN, C. A.; MARTINS-SANTANA, L.; ALVES, L. F.; MONTEIRO, L. M. O.; GUAZZARONI, M.; SILVA-ROCHA, R. The art of vector engineering: Towards the construction of next-generation genetic tools. **Microbial Biotechnology**. v. 12, n. 1, p. 125-147, 2018.
30. SCHNEIDER, S.; KIRCHNER, M. CRISPR-Cas: From the bacterial adaptive immune system to a versatile tool for genome engineering. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 54, n. 46, p. 13508-13514, 2015.
31. SHAPIRO, R. S.; CHAVEZ, A.; COLLINS, J. J. CRISPR-based genomic tools for the manipulation of genetically intractable microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**. v. 16, n. 6, p. 333-339, 2018.
32. SHI, T.; LIO, G.; JI, R.; SHI, K.; SONG, P.; REN, L. *et al.* CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: The state of the art. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 101, n. 20, p. 7435-7443, 2017.
33. THEOBALD, S.; VESTH, T. C.; RENDSVING, J. K.; NIELSEN, K. FOG.; RILEY, R. *et al.* Uncovering secondary metabolite evolution and biosynthesis using gene cluster networks and genetic dereplication. **Nature: Scientific Reports**. v. 8, p. 1-12, 2018.
34. VYAS, V. K.; BUSHKIN, G. G.; BERNSTEIN, D. A.; GETZ, M. A.; SEWASTIANIK, M.; BARRASA, M. I. *et al.* A new CRISPR

- mutagenesis strategies reveal variation in repair mechanisms among fungi. **mSphere**. v. 3, n. 2, p. 1-14, 2018.
35. WANG, W.; CHEN, Y.; WEI, D. Copper-mediated on-off control of gene expression in filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Journal Of Microbiological Methods**. v. 143, p. 63-65, 2017.
36. WEYDA, I.; YANG, L.; VANG, J.; AHRING, B. K.; LÜBECK, M.; LÜBECK P. S. A comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation and protoplast-mediated transformation with CRISPR-Cas9 and bipartite gene targeting substrate, as effective gene targeting tools for *Aspergillus carbonarius*. **Journal Of Microbiological Methods**. v. 135, p. 26-34, 2017.
37. WILKEN, S.E.; SWIFT, C. L.; PODOLSKY, I. A.; LANKIEWICZ, T. S.; SEPPÄLÄ, S.; O'MALLEY, M.A. Linking 'omics' to function unlocks the biotech potential of non-model fungi. **Current Opinion In System Biology**. v. 14, p. 9-17, 2019.
38. YAMATO, T.; HANDA, A.; ARAZOE, T.; KUROKI, M.; NOZAKA, A.; KAMAKURA, T. *et al.* Single crossover-mediated targeted nucleotide substitution and knock-in strategies wit CRISPR/Cas9 system in the rice blast fungus. **Nature: Scientific Reports**. v. 9, n. 7427, p. 1-8, 2019.
39. ZHANG, C.; MENG, X.; WEI, X.; LU, L. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics And Biology**. v. 86, p. 47-57, 2016.
40. SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
41. GRIFFITHS, A. J.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S.B.; DOEBLEX, J. **Introdução a genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
42. WAH, D. A.; BITINAITE, J.; SCHILDKRAUT, I.; AGGARWAL, A. K. Structure of fokI has implications for DNA cleavage. **Proceedings Of the National Academy of Sciences**. v. 95, n. 18, p. 10564-10569, 1998.