

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**WYLLIAN FIGUEIREDO DE MORAIS**

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO USO DE VETORES EM  
COGUMELOS BASIDIOMICETOS COM O INTUITO DE MELHORAMENTO  
GENÉTICO**

**DOIS VIZINHOS**

**2022**

**WYLLIAN FIGUEIREDO DE MORAIS**

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO USO DE VETORES EM  
COGUMELOS BASIDIOMICETOS COM O INTUITO DE MELHORAMENTO  
GENÉTICO**

**Characterization and quantification of the use of vectors in basidiomycet  
mushrooms with the purpose of genetic improvement**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização  
apresentado como requisito para obtenção do título  
de Especialização em Biologia Molecular –  
Habilitação Biotecnologia da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Nédia de Castilhos Ghisi.

**DOIS VIZINHOS**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**WYLLIAN FIGUEIREDO DE MORAIS**

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO USO DE VETORES EM  
COGUMELOS BASIDIOMICETOS COM O INTUITO DE MELHORAMENTO  
GENÉTICO**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização  
apresentado como requisito para obtenção do título  
de Especialização em Biologia Molecular –  
Habilitação Biotecnologia da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 19/dezembro/2022

---

Nédia de Castilhos Ghisi  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Maristela Linhares Azevedo  
Doutorado  
Instituto de Tecnologia do Paraná

---

Jhonatan Rafael Zárate Salazar  
Doutorado  
Universidade Federal da Paraíba

**DOIS VIZINHOS**

2022

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha orientadora Dra. Nédia de Castilhos Ghisi por aceitar de última hora conduzir o meu trabalho de pesquisa.

A todos os professores do curso de Especialização em Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela excelência da qualidade técnica de cada um. Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biológicas e Biologia Molecular.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por proporcionar acesso ao Portal de Periódicos, o qual foi fundamental para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A classe Agaricomycetes em geral, contempla a maioria dos fungos que são comumente chamados de cogumelos. Sabe-se que muitas espécies apresentam propriedades bioativas em seres humanos. No entanto, possuem pouca atenção da indústria. Pois, por muitos anos, o melhoramento das linhagens foi feito por hibridização e realizados por tentativa e erro. Com a chegada de novos métodos como o Crispr/Cas9, tais manipulações puderam ser orientadas de forma mais objetiva e precisa. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar e situar o estado da arte das pesquisas sobre melhoramento genético de cogumelos basidiomicetos. A pesquisa foi realizada a partir dos dados de 1996 a 2022 oriundos da base eletrônica Web of Science, com os termos “ALL= ((Mushroom OR basidiomycete) AND (“Molecular breeding” OR “Genetic improvement” OR “genetic engineering” OR GMO OR Transgenic))”, e após um refinamento os dados foram importados e analisados através de softwares (EXCEL e CiteSpace). A partir da análise dos dados obtidos foi identificado um padrão de crescimento de publicações na área. No entanto, a distribuição mundial dos artigos encontrados, demonstra que eles se concentram em sua grande maioria em países asiáticos, cerca de 76%. Também foi possível identificar que o cogumelo *Pleurotus ostreatus* é o mais estudado, contemplando 16,67% dos artigos encontrados, quando levada em consideração a escala global. Por fim, foi possível inferir que antes da utilização do CRISPR/Cas9, não existia um vetor “padrão” comum, mesmo em estudos acerca da mesma espécie.

**Palavras-chave:** Macrofungos; biotecnologia; *Pleurotus ostreatus*; engenharia genética.

## ABSTRACT

The Agaricomycetes in general includes most of the fungi that are commonly called mushrooms. It is known that many species have bioactive properties in humans. However, they have little attention from the industry. For, for many years, the improvement of strains was done by hybridization and carried out by trial and error. With the arrival of new methods such as Crispr/Cas9, such manipulations could be guided in a more objective and precise way. Therefore, the main objective of the present work was to characterize and situate the state of the art of research on genetic improvement of basidiomycete mushrooms. The research was carried out using data from 1996 to 2022 from the Web of Science electronic database, with the terms "ALL= ((Mushroom OR basidiomycete) AND ("Molecular breeding" OR "Genetic improvement" OR "genetic engineering" OR GMO OR Transgenic))", and after refinement the data were imported and analyzed using software (EXCEL and CiteSpace). From the analysis of the data obtained, a growth pattern of publications in the area was identified. However, the worldwide distribution of the articles found shows that they are mostly concentrated in Asian countries, around 76%. It was also possible to identify that the *Pleurotus ostreatus* mushroom is the most studied, covering 16.67% of the articles found, when considered the global scale. Finally, it was possible to infer that before the use of CRISPR/Cas9, there was no common "standard" vector, even in studies of the same species.

**Keywords:** Macrofungi; biotechnology; *Pleutorus ostreatus*; Genetic engineering.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Flowchart via PRISMA. Registros obtidos a partir da plataforma de base eletrônica Web of Science (WoS) de 1988 a junho de 2021 .....	8
Figura 2 - Registro de publicações e Tendências exponencial e linear ao decorrer dos anos.....	9
Figura 3 - Distribuição mundial dos registros das publicações e colaboração entre países.....	10
Figura 4 - Frequência de publicações e centralidade em relação à distribuição mundial dos registros encontrados (1996 à 2022).....	10
Figura 5 - Frequência em porcentagem das espécies abordadas nos artigos publicados entre 1996 e 2022. ....	12
Figura 6 - Frequência das espécies estudadas em relação aos 3 países com mais publicações .....	13
Figura 7 - Frequência e centralidade em relação às 20 palavras-chaves mais utilizadas nas publicações encontradas entre 1996 à 2022. ....	15
Figura 8 - Relação das palavras-chaves com as áreas de estudo .....	17

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Critérios de pesquisa, seleção e extração de dados.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2</b>	<b>Análise de dados .....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>20</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Nos anos 60, uma nova classificação dos reinos foi proposta pelo pesquisador Whittaker (1969), a partir de então, os fungos vieram a ser reconhecidos como um reino à parte. E dentro deste reino, os fungos podem ser unicelulares ou pluricelulares, eucariontes, heterotróficos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; REIS, 2010) e que possuem glicogênio como polímero de reserva (MORAES et al., 2009).

O Reino Fungi é dividido em 8 filos distintos: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia e Zygomycota. Dentro do filo Basidiomycota se encontra a classe Agaricomycetes, onde se concentram todos os fungos que formam basidiomas com himênio definido, que são comumente chamados de cogumelos. No entanto, o termo cogumelo também é utilizado em algumas espécies do filo Ascomycota, que possuem estrutura visualmente semelhantes. O basidioma se refere ao conjunto de hifas originadas do micélio vegetativo do fungo, que se diferenciam e se tornam responsáveis pela produção de esporos de origem sexual (FONSECA et al., 2015).

Um grande número de espécies de fungos apresentam funções medicinais para os seres humanos, isso devido a uma ampla gama de moléculas bioativas produzidas por eles (WASSER, 2011), moléculas com atividade antioxidante (GENG et al., 2016), antimicrobiana, anti-inflamatória (SHIGESUE et al., 2000), imunomoduladora (GAO et al., 2013), antitumoral (FAN et al., 2011), hepatoprotetora (ZHANG et al., 2002), antidiabética (KIM et al., 2010), e propriedades prebióticas (SINGDEVSACHAN et al., 2016). E por conta disso, várias espécies são consideradas como alimentos nutracêuticos, pois apresentam benefícios à saúde (ACHARYA et al., 2015, VALVERDE et al., 2015). Por conta de seus vários benefícios, os fungos são considerados por diversas culturas ao redor do mundo como um recurso comestível e medicinal há milhares de anos, especialmente, nas culturas orientais (MILHORINI et al., 2018; MILHORINI et al., 2022).

Apesar de possuírem propriedades conhecidas a tanto tempo, as pesquisas com o foco biotecnológico, acerca dos cogumelos, possuíam pouca atenção da indústria e, em consequência, um orçamento restrito e limitado, quando comparado a pesquisas que abordavam plantas e animais (SONNENBERG et al., 2005). Por muitos anos, o melhoramento das cepas era feito por hibridização e realizados por tentativa e erro. Assim, desta forma as culturas precisavam ser cultivadas para

avaliar e conferir as características adquiridas, o que demandava muito tempo (MOORE et al., 2001). No entanto, com a recente chegada de métodos de melhoramento genético mais modernos, como a utilização de vetores, tais manipulações podem ser orientadas de forma mais objetiva e precisa (STOOP & MOOIBROEK, 1999).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar e quantificar os trabalhos que abordam o melhoramento genético de cogumelos basidiomicetos, através de dados obtidos a partir de bases científicas, desta forma situando o estado da arte das pesquisas nesse campo do conhecimento. Em segundo lugar, avaliar o crescimento e definir onde se concentram as pesquisas na área. E por fim, identificar as técnicas ou vetores utilizados para este fim, e correlacioná-las as espécies estudadas. Tais informações seriam de grande importância para identificar padrões ou lacunas que possam vir a ensejar novos trabalhos de pesquisa no futuro.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Critérios de pesquisa, seleção e extração de dados**

A pesquisa foi realizada a partir dos dados da coleção principal da base eletrônica Web of Science (WoS) se utilizando dos seguintes scripts booleanos: “ALL= ((Mushroom OR basidiomycete) AND (“Molecular breeding” OR “Genetic improvement” OR “genetic engineering” OR GMO OR Transgenic))”. Os critérios de elegibilidade incluíram artigos publicados de 1945 a 2022 (pesquisados em outubro de 2022).

A fim de refinamento, foram lidos os resumos de todos os documentos que não apresentavam as palavras dos scripts booleanos no título, com o intuito de encontrar o maior número possível de trabalhos sobre o tema. Como critério essencial utilizado no processo de seleção, os artigos selecionados deveriam apresentar explicitamente o uso de vetores ou alguma outra técnica que auxiliasse no processo de melhoramento de cogumelos basidiomicetos. Os estudos que não apresentavam os dados exigidos foram excluídos, bem como publicações que não possuíam resumo dentro da plataforma Web of Science (WoS), acesso ao trabalho completo, ou mesmo, não se tratava do tema proposto nesta pesquisa. Uma vez refinados, as informações obtidas acerca de autores, ano de publicação, espécie utilizada, técnicas, e vetores, foram compiladas e apresentadas na seção de resultados.

Todos os dados e informações relacionadas aos trabalhos selecionados foram importados da plataforma Web of Science (WoS), salvos e exportados para os softwares como Microsoft Office Excel e CiteSpace para as análises de dados.

### **2.2 Análise de dados**

As análises foram realizadas nos softwares Microsoft Office Excel e CiteSpace 6.1.R3.

Para realizar as análises no “Excel”, foram utilizados dados brutos importados da plataforma eletrônica WoS e dados refinados a partir do “CiteSpace”. Com estas informações, foram construídos gráficos a partir de múltiplas perspectivas

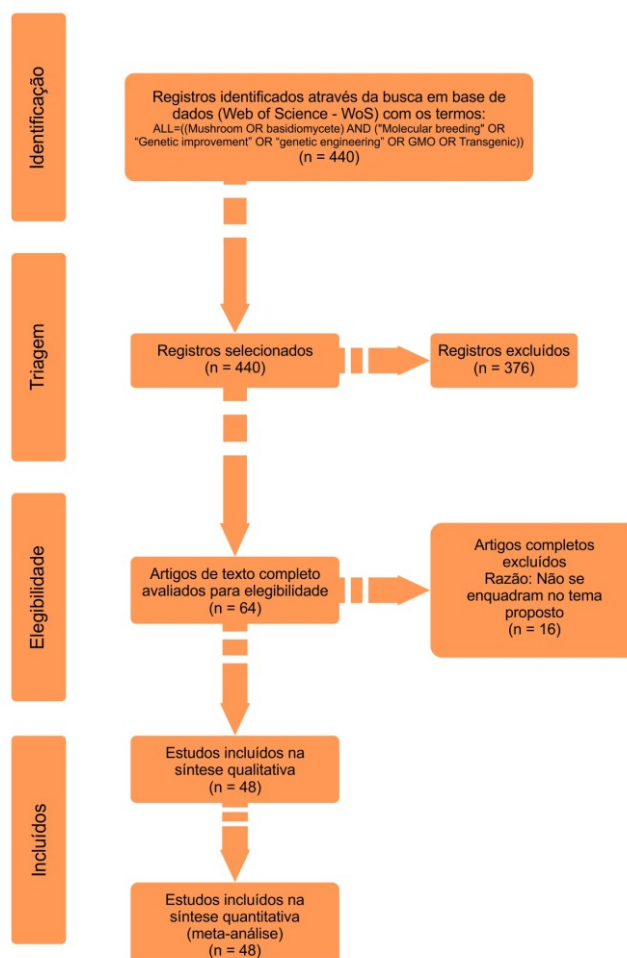
quanto à quantificação anual de registros, distribuição mundial, frequência e centralidade das publicações, frequência geral das espécies, frequência das espécies em relação aos países com mais publicações, tendências de crescimento e frequência das palavras chaves.

Para análises cienciométricas foi utilizado o software "CiteSpace". Este software foi desenvolvido em Java pelo Dr. Chaomei Chen (2006) a fim de analisar e visualizar redes de citações. Além disso, fornece várias funções para facilitar a compreensão, interpretação de padrões e identificação de pontos chaves.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na busca inicial realizada a partir dos dados WoS, buscava-se artigos publicados de 1945 a 2022, que era a o período de registros disponível dentro da plataforma, no entanto, só foram encontrados artigos relacionados com o tema a partir de 1996. Logo, a presente pesquisa relaciona artigos publicados de 1996 a 2022 (os dados referentes a 2022 não são completos, pois são dados referentes a janeiro até outubro e foram incluídos nos gráficos apenas para nível de conhecimento e não podem ser usados de base para comparação com os anos anteriores). Sendo assim, foram identificados 440 registros na plataforma WoS, dos quais 48 demonstraram-se elegíveis após o refinamento (Fig. 1).

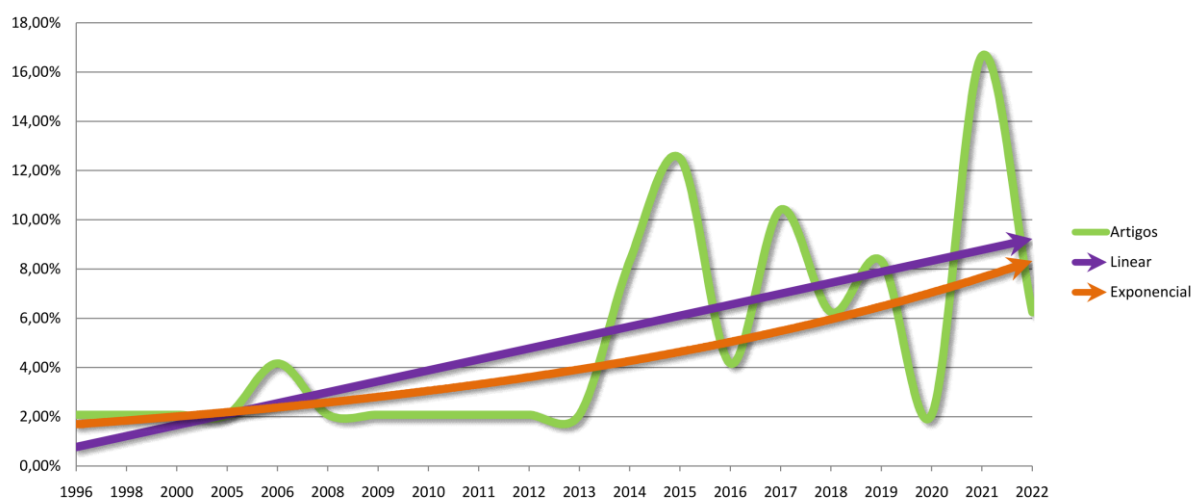
**Figura 1 - Flowchart via PRISMA. Registros obtidos a partir da plataforma de base eletrônica Web of Science (WoS) de 1988 a junho de 2021**



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS e modelo adaptado de: MOHER, 2009.

A partir da análise dos dados obtidos foi identificado um padrão de crescimento de publicações na área (Fig. 2), onde podemos verificar que existe uma tendência de crescimento de publicações sobre o assunto. Essa tendência de crescimento pode estar relacionada com crescimento da produção mundial cogumelos, conforma já apontado por Royse et al. (2017), e com isso o aumento no interesse em se pesquisar na área. No entanto, a distribuição mundial dos artigos encontrados, demonstra que eles se concentram em sua grande maioria em países asiáticos, o que já era esperado por conta do histórico-cultural e da literatura (MILHORINI et al., 2018; CHAN et al, 2020), concentração essa situada basicamente em três países: Japão, Coreia do Sul e China (Fig. 3). A China e o Japão detêm a maior quantidade de artigos publicados na área. Embora, a centralidade das publicações gira em torno somente da China e Coreia do Sul, mesmo o Japão tendo mais publicações que este último (Fig. 4).

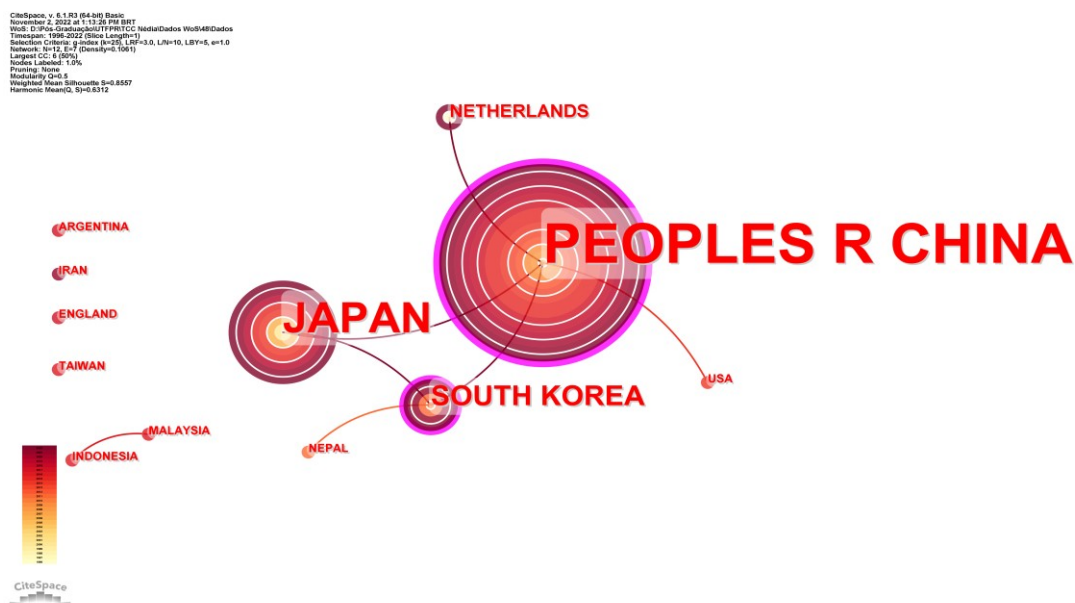
**Figura 2 - Registro de publicações e Tendências exponencial e linear ao decorrer dos anos.**



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

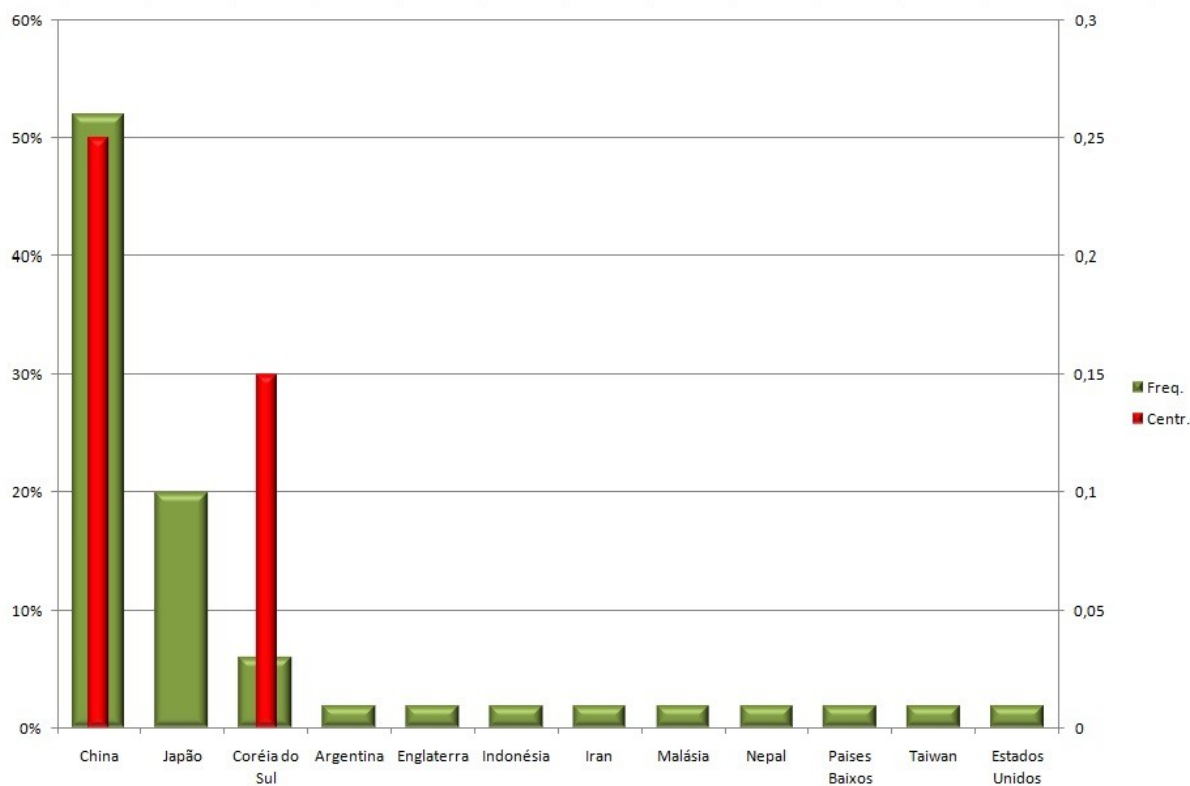
Essa centralidade em torno da China faz mais sentido quando comparamos essa informação com o volume da produção mundial de cogumelos, onde somente a China é responsável por 87% da produção mundial (ROYSE et al. 2017). Este padrão também foi encontrado por Chan et al. (2020), onde, apesar de a pesquisa não ter relação com a biologia molecular de basidiomicetos, aborda os cogumelos em geral.

Figura 3 - Distribuição mundial dos registros das publicações e colaboração entre países.



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

Figura 4 - Frequência de publicações e centralidade em relação à distribuição mundial dos registros encontrados (1996 a 2022).



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

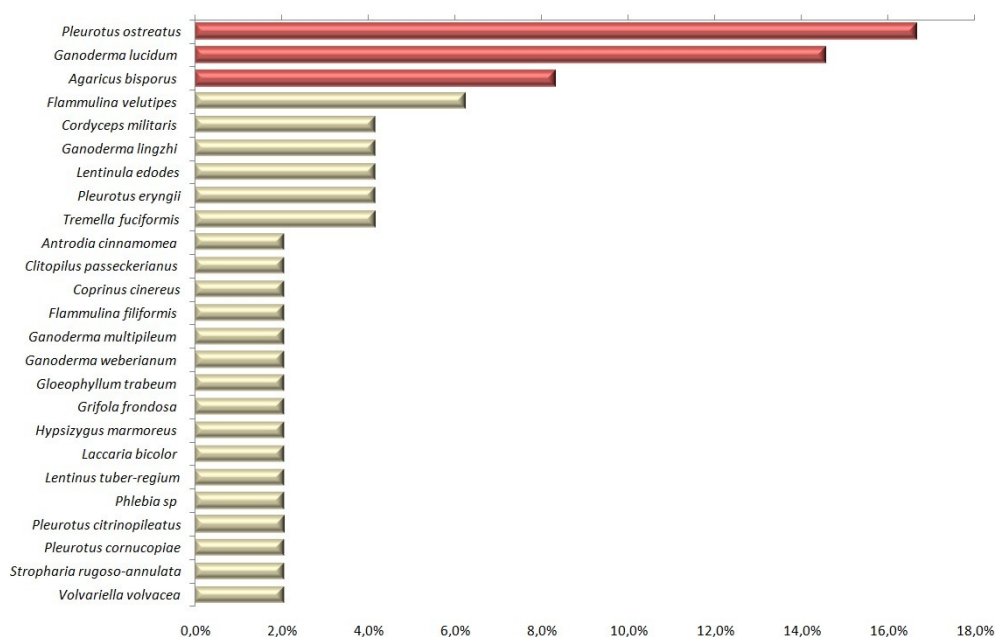
Acerca da interação sobre os países (Fig. 3), pode se observar que Japão, Coreia do Sul e China, possuem uma interação maior, quando se comparada aos outros países. E muitos deles não demonstram qualquer interação. No entanto, essa falta de interação, pode ser em decorrência da espécie trabalhada no estudo em questão, uma vez que, aparentemente são mais estudadas as espécies oriundas ou mesmo mais populares em um determinado local. Neste sentido, como podemos observar na figura 6, mesmo os três países com maiores contribuições e com um número maior de espécies listadas, não compartilham mais que uma espécie em suas listas.

Já em Chan et al (2020), uma forte interação é vista entre China e Estados Unidos, no entanto, o trabalho é focado em pesquisas gerais sobre cogumelos com fins culinários e medicinais.

Em relação à quantidade de espécies estudadas, com os dados obtidos foi possível a confecção de uma lista com todas as espécies abordadas nos artigos, bem como sua frequência (Fig. 5). A partir disso, foi possível identificar que o cogumelo *Pleurotus ostreatus* é o mais estudado, seguido respectivamente do cogumelo *Ganoderma lucidum* e do cogumelo *Agaricus bisporus*. No entanto, apesar de mais estudado, o cogumelo mais cultivado no mundo não é o *Pleurotus ostreatus*. Segundo Valverde et al. (2015), o cogumelo mais estudado é o *Agaricus bisporus*, que segundo a figura 5, é apenas o terceiro mais estudado.



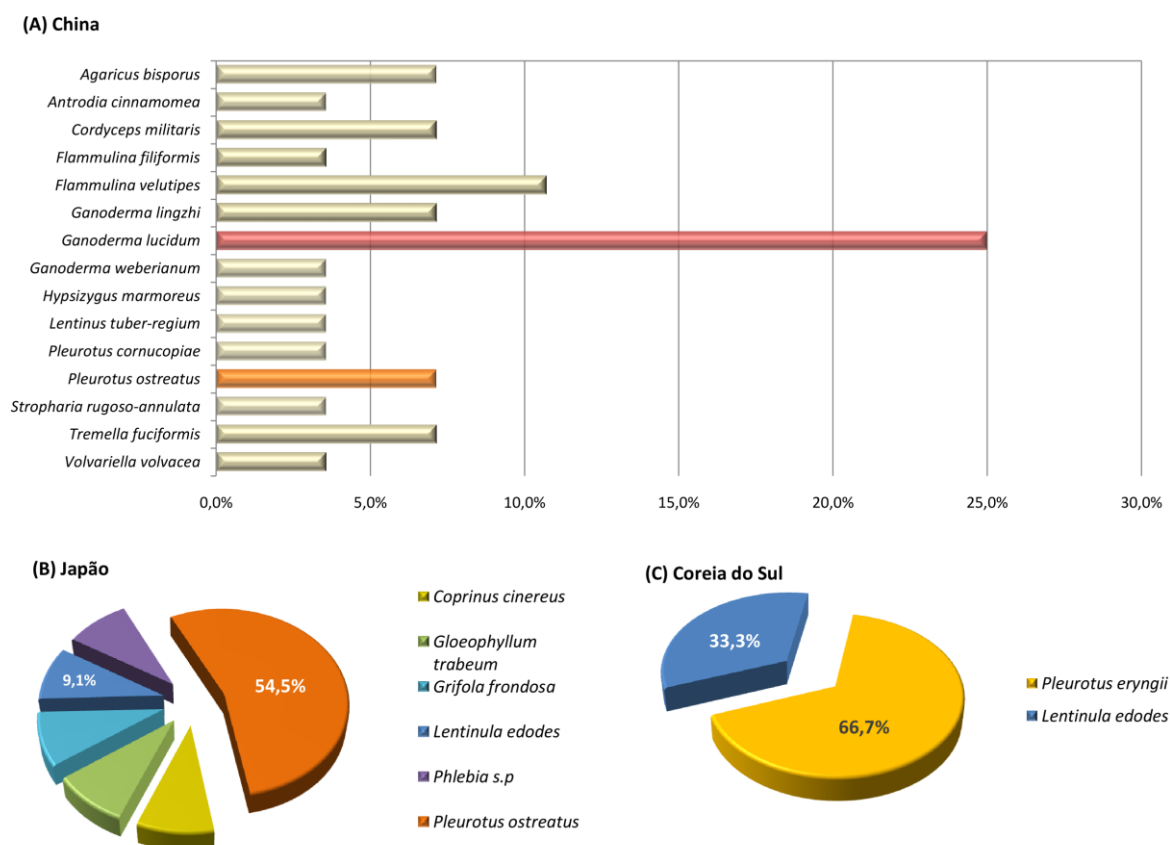
**Figura 5 - Frequência em porcentagem das espécies abordadas nos artigos publicados entre 1996 e 2022.**



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

Sendo assim, podemos entender que o cogumelo *Pleurotus ostreatus*, é o mais estudado quando se leva em consideração a escala global. No entanto, quando observamos os resultados da compilação dos dados e a separação deles entre os três países com mais publicações e mais importância, é possível verificar que a espécie *Pleurotus ostreatus*, é somente a segunda mais estudada entre os países asiáticos. Sendo o *Ganoderma lucidum* a espécie mais estudada da Ásia, e isso única e exclusivamente pela quantidade de registros reportados na China, uma vez que, não foram encontrados com os termos pesquisados, registros de artigos sobre a espécie no Japão e nem na Coreia do Sul (Fig. 6).

**Figura 6 - Frequência das espécies estudadas em relação aos 3 países com mais publicações**



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

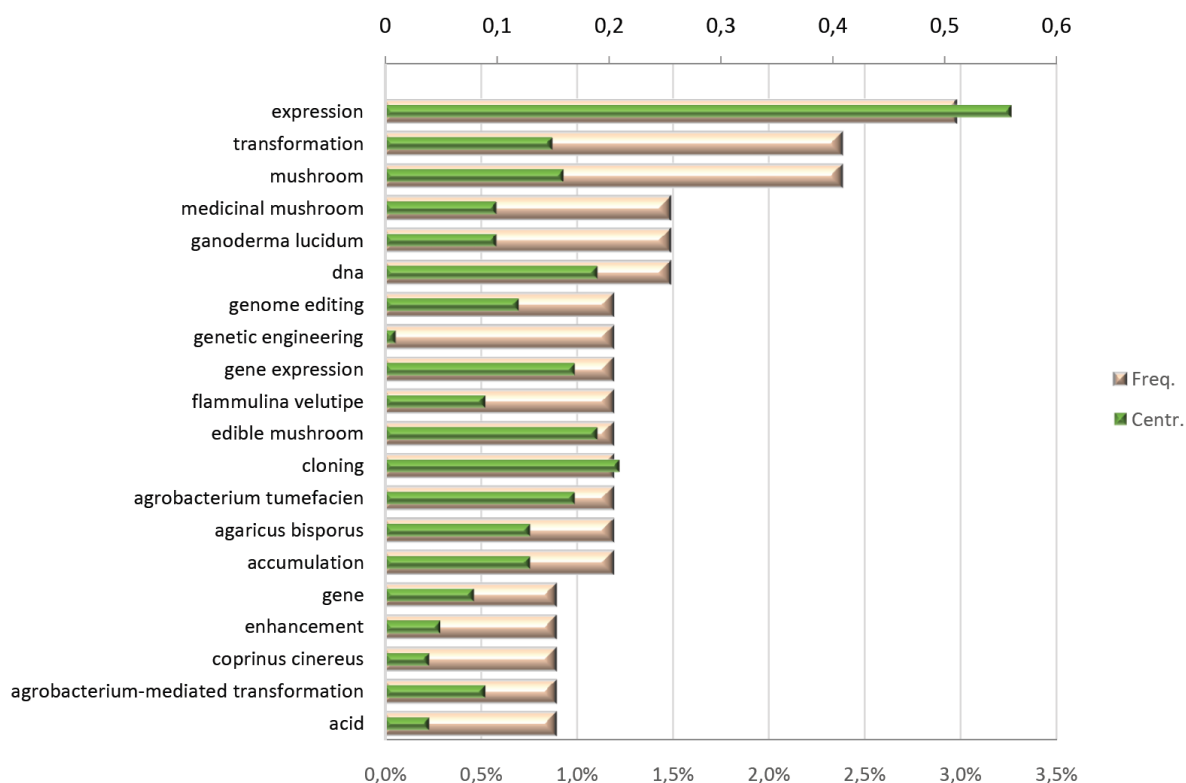
Então, observando a figura 6, pode-se identificar que o Japão possui o maior registro de pesquisas com *Pleurotus ostreatus*, espécie esta, responsável por 54,5% dos registros no país. Segundo Royse et al. (2017), a produção de cogumelos do gênero *Pleurotus* cresceu em torno perto de 200% entre 1997 e 2010 no país. Na China, a espécie com maior número de registros, é o *Ganoderma lucidum*, responsável por 25% dos registros encontrados no país, sendo também o país com maior número de publicações sobre a espécie. Já na Coreia do Sul, foram encontrados registros de somente duas espécies, e sendo o *Pleurotus eryngii* a mais estudada, com o equivalente a 66,7% dos registros, seguido da *Lentinula edodes* com 33,3% dos registros.

No entanto, quando cruzamos os dados obtidos neste trabalho com os dados de quantidade de cogumelos produzidos citados por Royse et al. (2017), identificamos que os fungos do gênero *Lentinula* e *Auricularia* são os mais produzidos na China, embora não tenham aparecido na lista individual do país. E o gênero *Pleurotus*, é o terceiro mais produzido. Este fato pode ter alguma relação

com segredo industrial, uma vez que é sabido que as pesquisas privadas são realizadas apesar de não serem publicadas. Este fato não ocorre somente nesta área, mas na esfera industrial como um todo.

Acerca das palavras-chaves, pode-se observar na figura 7, que o termo “expression” não só tem a maior frequência, como também a centralidade, e se observarmos a correlação das áreas de estudo com as palavras-chave de forma cronológica (Fig. 8), pode se observar que a palavra “expression” tem relação direta com a biotecnologia, e está presente desde o início dos registros coletados para este trabalho e se estende até o final. Isso talvez possa ser explicado, pelo fato de que a maioria dos estudos contidos neste trabalho utilizam de alguma forma, a expressão de algum composto como prova da alteração feita no código genético do organismo estudado, ou mesmo se utilizando da maquinaria do cogumelo como ferramenta de expressão para algum composto específico. A segunda e a terceira palavra-chave, estão juntas em relação a frequência, sendo elas “transformation” e “mushroom”, embora diverjam em relação a centralidade, onde a segunda fica ligeiramente a frente. No entanto, segundo os dados da figura 8, podemos observar que elas também divergem quanto a ligação a áreas de estudo, sendo que a palavra “transformation” está mais relacionada com a área de horticultura, e a palavra “mushroom” está mais ligada a área da biologia celular.

**Figura 7 - Frequência e centralidade em relação às 20 palavras-chaves mais utilizadas nas publicações encontradas entre 1996 a 2022.**



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

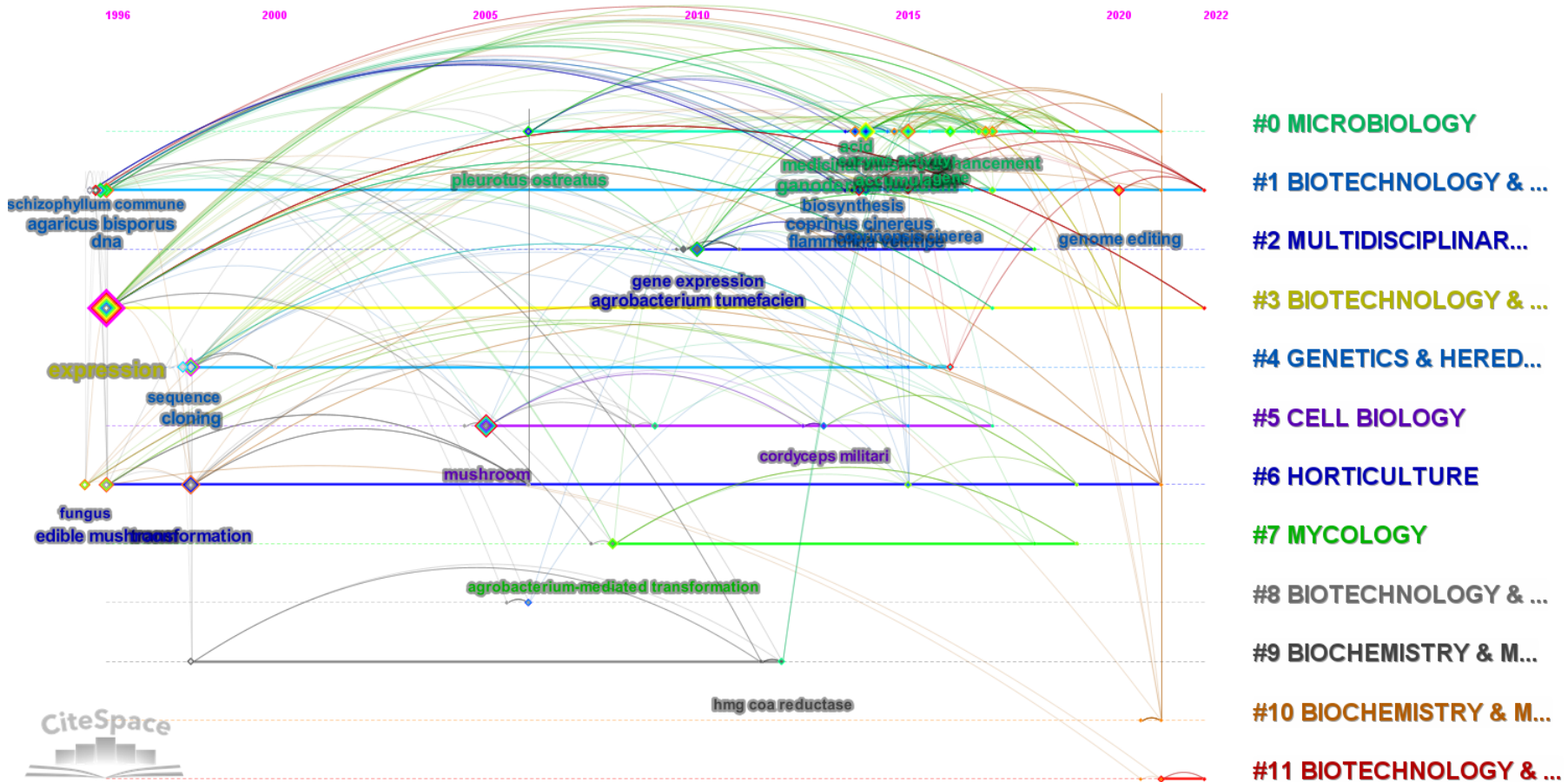
Com os dados obtidos de forma manual a partir do refinamento dos artigos, foi possível obter as informações referentes a “técnica / vetor”, utilizados para a manipulação das sequências genéticas das espécies estudadas (ver Tabela 1). E a partir destas informações, podemos inferir que não existia um vetor “padrão” em comum, mesmo se tratando da mesma espécie. Fato que só ocorreu a partir do aparecimento da utilização do CRISPR/Cas9. Esta observação faz sentido, uma vez que, segundo Adamov et al. (2018), o CRISPR/Cas9 vem sendo uma revolução na área da edição genética e desde o seu surgimento, e vêm mudando a biologia molecular como um todo. Outro motivo, pode ser em decorrência do fato de que a maioria dos trabalhos aqui contidos têm caráter experimental. Como não temos acesso aos resultados de pesquisas privadas não podemos chegar a uma conclusão definitiva somente com os dados obtidos com este trabalho, de qual vetor se enquadra melhor para cada espécie.

Posto isso, podemos observar que o presente trabalho apresenta certas limitações. Pois foram utilizados somente os dados da base de dados eletrônica

WoS, e por conta disso, pode não vir a representar uma compreensão satisfatória. Sendo assim, como perspectivas futuras, seria interessante, incluir dados de outras bases disponíveis. E como se trata de uma questão de grande interesse comercial, buscar também em bases internacionais de patentes, a fim de obter um resultado mais acurado.

Figura 8 - Relação das palavras-chaves com as áreas de estudo

CiteSpace, v. 6.1.R3 (64-bit) Basic  
 December 8, 2022 at 9:50:35 AM BRT  
 WoS: D:\Pós-Graduação\UTFPR\ITCC\Nédia\Dados WoS\48\Dados  
 Timespan: 1996-2022 (Slice Length=1)  
 Selection Criteria: g-index (k=25), LRF=3.0, L/N=10, LBY=5, e=1.0  
 Network: N=228, E=913 (Density=0.0353)  
 Largest CC: 220 (96%)  
 Nodes Labeled: 1.0%  
 Pruning: None  
 Modularity Q=0.6834  
 Weighted Mean Silhouette S=0.8726  
 Harmonic Mean(Q, S)=0.7665



Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

Tabela 1 – Lista das espécies e os respectivos vetores utilizados

Autores	Espécie	Vetor / Técnica
vanderHee, MD et al, 1996	<i>Agaricus bisporus</i>	pAN7-1
Ogawa, K et al, 1998	<i>Coprinus cinereus</i>	pLC1-mnp / pLC2-mnp.
Honda, Y et al, 2000	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pKF18k
Yan, OS & Jiang, JH, 2005	<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	RAPD
Zhu, H et al, 2006	<i>Tremella fuciformis</i>	pBI-VHb
Tsukihara, T et al, 2006	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pTM1 / pGEM
Wang, J et al, 2008	<i>Volvariella volvacea</i>	pBlu-gfp / pTHP / pLg-afp235
Sun, SJ et al, 2009	<i>Tremella fuciformis</i>	pCB-TEGFP
Kim, S et al, 2010	<i>Pleurotus eryngii</i>	pDNR-LIB / pCAMBIA1304
Chung, SJ et al, 2011	<i>Pleurotus eryngii</i>	pCAMBIA1304
Xu, JW et al, 2012	<i>Ganoderma lucidum</i>	pCAMBIA1301 / pMD18TCBX
Xiong, CH et al,	<i>Cordyceps militaris</i>	pDht-gpd-bar
Yamasaki, Y. et al, 2014	<i>Phlebia s.p</i>	pPbGPD-HPT / pPbGPD-EGFP / pPbGPD-MGmnp2
Han, F. et al, 2014	<i>Flammulina velutipes</i>	pgFvs-mfc
Lu, ZL et al, 2014	<i>Agaricus bisporus</i>	pBHg
Yu, XY et al, 2014	<i>Ganoderma lucidum</i>	pJW-EXP
Arimoto, M et al, 2015	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	pAH / pGL
Zhou, YP et al, 2015	<i>Ganoderma weberianum</i>	pBI-35S:uidA / CaMV 35S
Sato, M. et al, 2015	<i>Grifola frondosa</i>	pGFpsd-hph / pGFcyp1-hph / pGFtef3-hph / pGFgapdh-hph / pGFchs-hph
Yin, CM et al, 2015	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pMD18-T
Xu, JW et al, 2015	<i>Ganoderma lucidum</i>	pJW-EXP-PGM
Zhang, JJ. et al, 2015	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	SEFA-PCR
Chou, TH et al, 2016	<i>Ganoderma multipileum</i>	pBS-GmSdhBm
Rosnina, AG. et al, 2016	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	hibridização manual
Zhang, DH. et al, 2017	<i>Ganoderma lingzhi</i>	pJW-EXP-SE
Mattos-Shiple, KMJ. et al, 2017	<i>Clitopilus passeckerianus</i>	pYES-hph-004iGFP
Stephan, Bl. et al, 2017	<i>Laccaria bicolor</i>	pHg/pBks
Zhang, DH. et al, 2017	<i>Ganoderma lingzhi</i>	pJW-EXP-LS
Shi, L. et al, 2017	<i>Flammulina velutipes</i>	pFV-GPD (pCAMBIA 1300)
Liu, JY. et al, 2018	<i>Agaricus bisporus</i>	pYN6981
Yang, XQ. et al, 2018	<i>Flammulina velutipes</i>	pevs-4cl-vrs2
Liu, DM. et al, 2018	<i>Lentinus tuber-regium</i>	pPEH - ATMT
Sato, T. et al, 2019	<i>Lentinula edodes</i>	REMI
Fei, Y. et al, 2019	<i>Ganoderma lucidum</i>	pJW-EXP
Qi, Y. et al, 2019	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pCAMBIA1300
Lou, H. et al, 2019	<i>Cordyceps militaris</i>	pCAMBIA0390-Bar-KO7
Wang, P. et al, 2020	<i>Ganoderma lucidum</i>	CRISPR/Cas9
Tu, J. et al, 2021	<i>Ganoderma lucidum</i>	CRISPR/Cas9
Moon, S. et al, 2021	<i>Lentinula edodes</i>	CRISPR/Cas9
You, H. et al, 2021	<i>Ganoderma lucidum</i>	pJW-EXP-opgus / pJW-EXP-in-opgus
Boontawon, T. et al, 2021(1)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cas9/sgRNA
Boontawon, T. et al, 2021(2)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	CRISPR/Cas9
Liu, X. et al, 2021	<i>Antrodia cinnamomea</i>	pCT74-gpd-ubiA / pCT74-gpd-CoQ2
Harfi, T. et al, 2021	<i>Agaricus bisporus</i>	Radiação gama
Yamasaki, F. et al, 2021	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pBS-Δmer3
Yamasaki, F. et al, 2022	<i>Pleurotus ostreatus</i>	CRISPR/Cas9
Liu, X. et al, 2022	<i>Flammulina filiformis</i>	CRISPR/Cas9
Zhang, Y. et al, 2022	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	qPCR, SNPs

Fonte: Elaboração própria a partir de dados encontrados na plataforma WoS

## 4 CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, podemos concluir que existe uma tendência de crescimento de pesquisas sobre o melhoramento genético de cogumelos basidiomicetos, e este crescimento tem relação com o aumento na procura e na produção em escala comercial.

A China detém o maior número de publicações e representa 52% dos artigos encontrados, bem como a produção no que tange a esfera mundial. No entanto, o cogumelo *Pleurotus ostreatus* é a espécie mais manipulada geneticamente no Japão e a nível mundial, seguida pelo *Ganoderma lucidum* na China e o cogumelo *Pleurotus eryngii* na Coreia do Sul. E esta regionalização está estritamente ligada com a cultura e hábitos locais. Além disso, podemos inferir que antes da utilização do CRISPR/Cas9, não existia um vetor “padrão” em comum, mesmo em estudos acerca da mesma espécie, quando o intuito era manipulá-las geneticamente.

No entanto, não podemos chegar a uma conclusão definitiva somente com os dados obtidos com este trabalho. Seria interessante em um trabalho futuro, abranger outras bases de dados e ampliar gama de dados extraídos dos artigos, a fim de preencher melhor as lacunas.



## REFERÊNCIAS

- ACHARYA K, KHATUA S, SAHID S. **Pharmacognostic standardization of *Macrocybe crassa*: An imminent medicinal mushroom**. Research Journal of Pharmacy and Technology, v. 8, n. 7, p. 860-866, 2015.
- ADAMOV, N; GEORGIEV, V.; DANEVA, T. **Crispr/Cas9 System - A Revolution in Gene Editing**. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. 2018.
- ARIMOTO, M., YAMAGISHI, K., WANG, J. **Molecular breeding of lignin-degrading brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* by homologous expression of laccase gene**. AMB Expr 5, 81 .2015.
- BOONTAWON T, NAKAZAWA T, XU H, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y, **Gene targeting using pre-assembled Cas9 ribonucleoprotein and split-marker recombination in *Pleurotus ostreatus***, FEMS Microbiology Letters, Volume 368. 2021.
- BOONTAWON T, NAKAZAWA T., INOUE, C. **Efficient genome editing with CRISPR/Cas9 in *Pleurotus ostreatus***. AMB Expr 11, 30. 2021.
- CHAN, X. H., SABARATNAM, V., ABDULLAH, N., & PHAN, C.-W. **A 53-Year Bibliometric and Scientometric Analysis of Research in Culinary and Medicinal Mushrooms**. International Journal of Medicinal Mushrooms, 22(6), 521–534. 2020.
- CHEN, C.M. **Citespace II: detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature**. J. Am. Soc. Inf. Sci. Technol. 57 (3), 359–377. 2006.
- CHOU, T.H., TZEAN, S.S. **Protoplasting, regeneration and transformation of medicinal mushroom *Ganoderma multipileum* using succinate dehydrogenase mutation gene as a selection marker**. Ann Microbiol 66, 111–120. 2016.
- CHUNG, S.J., KIM, S., SAPKOTA, K. **Expression of recombinant human interleukin-32 in *Pleurotus eryngii*** Ann Microbiol 61, 331–338. 2011.
- FAN M.J, LIN Y.C, SHIH H.D, YANG J.S, LIU K.C, YANG S.T. **Crude extracts of *Agaricus brasiliensis* induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway**. In Vivo Journal, v. 25, p. 355–366, 2011.
- FEI, Y., LI, N., ZHANG, D.H. **Increased production of ganoderic acids by overexpression of homologous farnesyl diphosphate synthase and kinetic modeling of ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum***. Microb Cell Fact 18, 115. 2019.
- FONSECA, M.D.P., OLIVEIRA C.C.L.S., SOUZA A.Q.L., GIBERTONI T.B., SOUZA A.D.L, RODRIGUES M.O., PEREIRA J.O., AZEVEDO J.L. **Diversidade de**

**Macrofungos da Família Polyporaceae (Basidiomycotina) no Estado do Amazonas.** Editora INPA, 2015.

GAO W, SUN Y, CHEN S, ZHANG J, KANG J, WANG Y. **Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice.** Vaccine Journal, v. 31, p. 2273–2280, 2013.

GENG X, TIAN G, ZHANG W, ZHAO Y, ZHAO L, WANG H. **A tricholoma matsutake peptide with angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats.** Scientific Reports, v. 6, p. 24130, 2016.

HAN, F., KANG, L. Z., ZENG, X. L., YE, Z. W., GUO, L. Q., & LIN, J. F. **Bioproduction of baccatin III, an advanced precursor of paclitaxol, with transgenic *Flammulina velutipes* expressing the 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase gene.** Journal of the science of food and agriculture, 94(12), 2376–2383. 2014.

HARFI, T., MOTALLEBI-AZAR, A., RASOULI, F. ., & ZAREE NAHANDI, F. **Genetic improvement of white button mushrooms for qualitative and quantitative traits.** Progress in Nutrition, 23(4), e2021152. 2022.

HONDA, Y., MATSUYAMA, T., IRIE, T. **Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*.** Curr Genet 37, 209–212 .2000.

KIM, S., SAPKOTA, K., CHOI, B. & KIM, S. **Expression of human growth hormone gene in *Pleurotus eryngii*.** Open Life Sciences, 5(6), 791-799. 2010.

LIU, D., ZHU, H., CHEN, Y., ZHENG, L., CHEN, L., & MA, A. **Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of the King Tuber Medicinal Mushroom *Lentinus tuber-regium* (Agaricomycetes).** International journal of medicinal mushrooms, 20(8), 791–796. 2018.

LIU, X, XIA Y, ZHANG Y, LIANG L, XIONG ZQ, WANG G, SONG X, AI L. **Enhancement of antroquinonol production via the overexpression of 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase biosynthesis-related genes in *Antrodia cinnamomea*.** Phytochemistry. 2021.

LIU, X.; DONG, J.; LIAO, J.; TIAN, L.; QIU, H.; WU, T.; GE, F.; ZHU, J.; SHI, L.; JIANG, A.; YU, H.; ZHAO, M.; REN, A. **Establishment of CRISPR/Cas9 Genome-Editing System Based on Dual sgRNAs in *Flammulina filiformis*.** J. Fungi. 2022.

LOU HW, YE ZW, YU YH, LIN JF, GUO LQ, CHEN BX, TANG H, WEI T, CHEN LT, YUN F. **The efficient genetic transformation of *Cordyceps militaris* by using mononuclear protoplasts.** Scientia Horticulturae. 2018.

LU Z, KONG X, LU Z, XIAO M, CHEN M, ZHU L. **Para-Aminobenzoic Acid (PABA) Synthase Enhances Thermotolerance of Mushroom *Agaricus bisporus*.** PLoS ONE 9(3): e91298. 2014.

MATTOS-SHIPLEY, K., FOSTER, G. D., & BAILEY, A. M. **Insights into the Classical Genetics of *Clitopilus passeckerianus* - the Pleuromutilin Producing Mushroom.** *Frontiers in microbiology*, 8, 1056. 2017.

MILHORINI S.S., SIMAS F.F., SMIDERLE F.R., DE JESUS L.I., ROSADO F.R., LONGORIA E.L., IACOMINI M.  **$\beta$ -Glucans from the giant mushroom *Macrocybe titans*: Chemical characterization and rheological properties.** *Food Hydrocolloids*, v. 125, p. 107392, 2022.

MILHORINI SS, SMIDERLE FR, BISCAIA SMP, ROSADO FR, TRINDADE ES, IACOMINI M. **Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration.** *Carbohydrate polymers*, v. 190, p. 50-56, 2018.

MOON S, YOUNG JA, CHOI YJ, OH YL, RO HS & RYU H. **Construction of a CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing System in *Lentinula edodes*,** *Mycobiology*, 49:6, 599-603. 2021.

MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG, **The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement.** *PLoS Med* 6(7): e1000097. 2009.

MOORE A.J., CHALLEN M.P., WARNER P.J. **RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars,** *Appl. Environ. Microbiol.* 55 742–749. 2001.

MORAES A.M.L., PAES R.A., HOLANDA V.L. **MICOLOGIA.** In: MOLINARO E.M., CAPUTO L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Vol. 1, Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

OGAWA, K., YAMAZAKI, T., HASEBE, T. **Molecular breeding of the basidiomycete *Coprinus cinereus* strains with high lignin-decolorization and -degradation activities using novel heterologous protein expression vectors.** *Appl Microbiol Biotechnol* 49, 285–289. 1998.

QI Y., CHEN H., ZHANG M., WEN Q., QIU L., SHEN J. **Identification and expression analysis of *Pofst3* suggests a role during *Pleurotus ostreatus* primordia formation.** *Fungal Biology*. 2018.

REIS, F. S. D. **Crescimento e caracterização química de fungos micorrízicos e plantas de *Pinus pinaster* na presença e ausência do simbionte.** 85 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2010.

ROSNINA, A.G., TAN, Y.S., ABDULLAH, N. **Morphological and molecular characterization of yellow oyster mushroom, *Pleurotus citrinopileatus*, hybrids obtained by interspecies mating.** *World J Microbiol Biotechnol* 32, 18. 2016.

ROYSE D.J, BAARS J., TAN Q. **Current overview of mushroom production in the world.** In: Zied DC, Arturo PG (eds) **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**, 1st. Wiley, New York, pp 5–13. 2017.

SATO T, SUZUKI Y, NAITO M, MINAMI A, SUZUKI N, YAEGASHI K, HIRANO T. **Overexpression of the laccase gene, *lcc1*, in *Lentinula edodes* using the pChG vector.** Mycoscience. 2019.

SHI, L., CHEN, D., XU, C., REN, A., YU, H., & ZHAO, M. **Highly-efficient liposome-mediated transformation system for the basidiomycetous fungus *Flammulina velutipes*.** The Journal of general and applied microbiology, 63(3), 179–185. 2017.

SHIGESUE K, KODAMA N, NANBA H. **Effects of maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice.** The Japanese Journal of Pharmacology, v. 84, p. 293–300, 2000.

SINGDEVSACHAN SK, AUROSHREE P, MISHRA J, BALIYARSINGH B, TAYUNG K, THATTOI H. **Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: a review.** Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, v. 7, p. 1–14, 2016.

SONNENBERG A.S.M., BAARS J.J.P., HENDRICKX P.M., KERRIGAN R.W. **Breeding mushroom: State of the art,** Acta Edulis Fungi (Suppl.), 12 163–173. 2005.

STEPHAN, B.I., ALVAREZ CRESPO, M.C., KEMPPAINEN, M.J. **Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*.** Curr Genet 63, 215–227. 2017.

STOOP, J., MOOIBROEK, H. **Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*.** Appl Microbiol Biotechnol 52, 474–483. 1999.

SUN, S. J., CHEN, D. X., XIE, B. G., HU, F. P., & ZHENG, J. G. **Isolation of GPD promoter from *Tremella fuciformis* and driving expression of EGFP gene.** DNA and cell biology, 28(2), 65–70. 2009.

TRABULSI, L.R & ALTERTHUM F. **Microbiologia.** 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TSUKIHARA, T., HONDA, Y., WATANABE, T. **Molecular breeding of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by homologous expression of its versatile peroxidase MnP2.** Appl Microbiol Biotechnol 71, 114–120. 2006.

TU, J. L., BAI, X. Y., XU, Y. L., LI, N., & XU, J. W. **Targeted Gene Insertion and Replacement in the Basidiomycete *Ganoderma lucidum* by Inactivation of Nonhomologous End Joining Using CRISPR/Cas9.** Applied and environmental microbiology, 87(23), e0151021. 2021.

VALVERDE M.E., HERNANDEZ-PEREZ T., PAREDES-LOPEZ, O. **Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life.** International Journal of Microbiology, v. 2015, p. 1-14. 2015.

VAN DE RHEE, M.D., GRAÇA, P.M.A., HUIZING, H.J. **Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance.** Molec. Gen. Genet. 250, 252–258. 1996.

WANG, J., GUO, L., ZHANG, K., WU, Q., & LIN, J. **Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*.** Bioresource technology, 99(17), 8524–8527. 2008.

WANG, P.A., XIAO, H. & ZHONG, J.J. **CRISPR-Cas9 assisted functional gene editing in the mushroom *Ganoderma lucidum*.** Appl Microbiol Biotechnol 104, 1661–1671. 2020.

WASSER S.P. **Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 89, p. 1323-1332. 2011.

WHITTAKER R.H. **New concepts of Kingdoms of organisms.** Science, v. 163, p. 150-160. 1969.

XIONG, C., XIA, Y., ZHENG, P., & WANG, C. **Increasing oxidative stress tolerance and subculturing stability of *Cordyceps militaris* by overexpression of a glutathione peroxidase gene.** Applied microbiology and biotechnology, 97(5). 2013.

XU, J.W., JI, S.L., LI, H.J., ZHOU, J.S., DUAN, Y.Q., DANG, L.Z., & MO, M.H. **Increased polysaccharide production and biosynthetic gene expressions in a submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the overexpression of the homologous  $\alpha$ -phosphoglucomutase gene.** Bioprocess and biosystems engineering, 38(2), 399–405. 2015.

XU, J.W., XU, Y.N., & ZHONG, J.J. **Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum*.** Applied and environmental microbiology, 78(22), 7968–7976. 2012.

YAMASAKI F., NAKAZAWA T., OH M., BAO D., KAWAUCHI M., SAKAMOTO M., HONDA Y. **Gene targeting of dikaryotic *Pleurotus ostreatus* nuclei using the CRISPR/Cas9 system,** FEMS Microbiology Letters, Volume 369, Issue 1, fnac083. 2022.

YAMASAKI, F., NAKAZAWA, T., SAKAMOTO, M. **Molecular breeding of sporeless strains of *Pleurotus ostreatus* using a non-homologous DNA end-joining defective strain.** Mycol Progress 20, 73–81. 2021.

YAMASAKI, Y., YAMAGUCHI, M., YAMAGISHI, K., HIRAI, H., KONDO, R., KAMEI, I., & MEGURO, S. **Expression of a manganese peroxidase isozyme 2 transgene in the ethanologenic white rot fungus *Phlebia* sp. strain MG-60.** SpringerPlus, 3, 699. 2014.

YAN, P.S., JIANG, J.H. **Preliminary research of the RAPD molecular marker-assisted breeding of the edible basidiomycete *Stropharia rugoso-annulata*.** World J Microbiol Biotechnol 21, 559–563. 2005.

YANG X, ZHENG Q, KANG L, LI Q, YE Z, LIN J, GUO L, WEI T. **Production of resveratrol in *Flammulina velutipes* by combinatorial expression of its biosynthetic genes,** Industrial Crops and Products, Volume 112, Pages 755-761. 2018.

YIN C, ZHENG L, ZHU J, CHEN L, MA A. **Characterization of the highly active fragment of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter for recombinant protein expression in *Pleurotus ostreatus*,** FEMS Microbiology Letters, Volume 362, Issue 5, fnv010. 2015.

YOU, H., SUN, B., LI, N. **Efficient expression of heterologous genes by the introduction of the endogenous glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene intron 1 in *Ganoderma lucidum*.** Microb Cell Fact 20, 164. 2021.

YU, X., JI, S.L., HE, Y.L., REN, M.F., & XU, J.W. **Development of an expression plasmid and its use in genetic manipulation of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes).** International journal of medicinal mushrooms, 16(2), 161–168. 2014.

ZHANG G.L., WANG Y.H., NI W, TENG H.L., LIN Z.B. **Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice.** World Journal of Gastroenterology, v. 8, p. 728–733, 2002.

ZHANG, D.H., JIANG, L.X., LI, N., YU, X., ZHAO, P., LI, T., & XU, J.W. **Overexpression of the Squalene Epoxidase Gene Alone and in Combination with the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Gene Increases Ganoderic Acid Production in *Ganoderma lingzhi*.** Journal of agricultural and food chemistry, 65(23), 4683–4690. 2017.

ZHANG, D.H., LI, N., YU, X., ZHAO, P., LI, T., & XU, J. W. (2017). **Overexpression of the homologous lanosterol synthase gene in ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lingzhi*.** Phytochemistry, 134, 46–53. 2017.

ZHANG, J., CHEN, H., CHEN, M., REN, A., HUANG, J., WANG, H., ZHAO, M., & FENG, Z. **Cloning and functional analysis of a laccase gene during fruiting body formation in *Hypsizygus marmoreus*.** Microbiological research, 179, 54–63. 2015.

ZHANG, Y., HUANG, C., VAN PEER, A. F., SONNENBERG, A., ZHAO, M., & GAO, W. **Fine Mapping and Functional Analysis of the Gene PcTYR, Involved in Control of Cap Color of *Pleurotus cornucopiae*.** Applied and environmental microbiology, 88(7), e0217321. 2022.

ZHOU, Y.P., CHEN, M.H., LU, J.J. **A simple and efficient genetic transformation method of *Ganoderma weberianum*.** Folia Microbiol 60, 417–423. 2015.

ZHU, H., WANG, T.W., SUN, S.J. **Chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene and its physiological actions in *Tremella fuciformis*.** Appl Microbiol Biotechnol 72, 770–776. 2006.