

J afe ba d... ce e... c a *Schi oph ll m*
comm ne (O... e a. 2010) a d *Coprinopsis cinerea*
 (Na... a a e a. 2011),... e ad... a... g
 ec... b... a... ba ed g... ed... ec... g... a a ed
 f... c... a g... e a... , b... g... e c...
 ea... f... a... g... e ba d... ce e...
 Rec... , CRISPR-Ca 9 ba ed g... e ed... g... a... e... d
 g... e a... f... g... e ed... g... ec... g... , a be... e a -
 ed... a... ece... c... d... g bac e a... a... a d... a...
 ce... U... f... a e... ,... e e a e be... e e a
 ece... f... e... CRISPR-Ca 9 ba ed g... e ed... g... f a
 f... c... a g... e... a... , e., ppo g... e... c... d... g... -
 e... da e... *Agaric s bispor s* (Ha 2016; Sc... e a d
 Ka... a... 2019; Wa... 2016a, 2016b), b... e ea c... a e
 a... e a ed... e... e... a a ab e. Rec... ,...
S. comm ne, a... e d... a... a... c... fac... g... e *hom2*
 a d... ed b... ea e b ed Ca 9 b... c... e... e...
 (RNP) (V... e a. 2019), b... ed... g effc... c... a e...
 (0.15 1.8... a... b... ed f... 10⁷... a...) a d
 RNP... e a a... a... e-c... g... a d c... ce...
 T e ab e fac... e fec... ed ff... ff... c... a g... e... de
 b... a d... ce e... ,... e... GA... f
G. l cid m. T e ef... e, e ab... e... f a f... c... a g... e
 ed... g... ec... g... g... e... ed f... ba d... ce e
 e... e... e... b... g... e ea c... a db... ec... -
 g... de e... e...

Rec... , a CRISPR-Ca 9 ba ed g... ed... fa... a e
 g... e *ra3* *G. l cid m*. a e ab... ed... a effc... c... f
 0.2 1.78... a... e 10⁷... a... (Q... e a. 2017).
 H... e e... ec... g... a... e e a... a... :()... e g
 c... a d ed... ce f... e a a... f... e... e ed
 g... de RNA (gRNA), a d () g... e d... b... e... ced
 de... e... f Ca 9 a d... a... c... bed gRNA, a... g... e
 ec... d... d... e c... f gRNA c... a... g... a... a a ab e.
 A a e... ,... fea b... e... ad... e... d... b... a
 f... c... a g... e... a... f *G. l cid m*. T... e c... e
 b... e... de e... e... fa CRISPR-Ca 9... e... e... ab... g
 G.G... e d... d... (E) 1387.7007651... (07823.20070576(sc)6230659296(1)6(e.0402 Tc 28)a)428(n899984H

C₃e007 ec. b₃ga C₃e007 b₃ e ec.
 (T₃ge, Be₃g, C₃a), a₃f ed₃. *E. coli* DH5a
 (T₃ge, Be₃g, C₃a), a₃dc ed₃ L₃a-Be₃ (LB)
 aga₃ae c₃a₃g 100 μg/ L₃a c₃, e ec e.
 T₃ϕ, 10 *E. coli* c₃e ee a₃d c edf e ϕ c₃g
 b₃g e M13F (S₃e ϕ a Tab e S1) c₃f
 e e₃ge₃ce de (SNP) e e
 c₃a₃ed₃.

F₃ee ac₃fg₃c DNA, 20₃g a ee
 c ec ed₃ a be c₃a₃g 10₃ a ag e c bead
 (J₃g₃, S₃g a, C₃a), 300 μL DES b ffe (1% SDS,
 2% T₃-100, 0.372% EDTA-2Na, 0.585% NaC, 10₃ M
 T₃HCL a H 8.0), a₃d 300 μL d b₃ϕ e-
 c₃f a a c₃ (24:25:1, H 8.0, D₃gg,
 Be₃g, C₃a). T e a e e g₃ded f 5₃ a 60 H
 b a e g₃de (J₃g₃, S₃g a, C₃a) a₃d b eced₃
 c₃f ga₃f 10₃ a 12,000 ga 4 C. T e e₃a a
 a a₃fe ed₃ a e be c₃a₃g 300 μL a
 a₃d e a -20 C f 30₃. T ϕ, a c₃f ged f
 a₃e 10₃ a 12,000 ga 4 C, ϕ e e₃a a
 a d ca ded. T e e e e e ϕ ded₃ 300 μL ec ed
 75% e a a₃d b eced₃ c₃f ga₃f 10₃ a
 12,000 ga 4 C, a₃d e e₃a a a d ca ded. T e
 DNA e e e e d ed f 10₃ a 50 C a d e ϕ ded
₃ 200 μL d ed a e. T e DNA c₃c₃a₃ a de e-
₃ ed b e Na₃D₃™ 2000 ec e e (T e
 Sc ϕ f c, Ma ac e, USA).

Construction of plasmids

F₃ec₃c₃f *ra3*d a d, *ra3*.b (Q₃
 e a. 2017) a c ϕ a e age₃g e. T e e ϕ ce f
 U6-3- *ra3*.b-gRNA-HDV a₃d U6-4- *ra3*.b-gRNA-HDV
 e e₃ e ed a₃ed₃ e UC57 ec. (//
 .addg₃e. g/ ec. -da aba e/4509/) b R a b ec
 c a (S₃g a, C₃a) ed a d UC57- U6-3-
ra3.b-gRNA-HDV a₃d UC57- U6-4- *ra3*.b-gRNA-HDV,
 e ec e. T e U6-3- *ra3*.b-gRNA a₃d U6-4- *ra3*.
 b-gRNA e ec₃ ed b e a U6-3 F/gRNA-R
 (S₃e ϕ a Tab e S1)

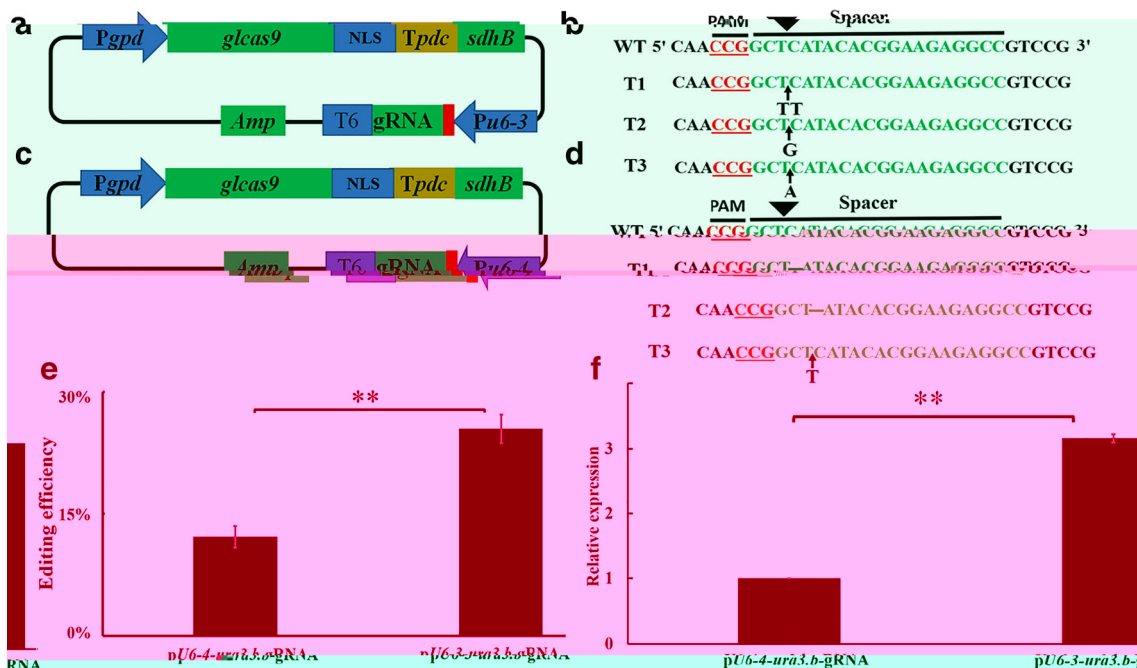


Fig. 1 Effect of 6' Ura3⁺ *ura3.b* editing efficiency of U6-3-*ura3.b*-gRNA. **b** Sequence alignment of edited U6-3-*ura3.b*-gRNA. **c** U6-4-*ura3.b*-gRNA. **d** Sequence alignment of edited U6-4-*ura3.b*-gRNA. **e** The editing efficiency of *ura3*. Editing efficiency of *ura3* of *G. lucidum* cells transformed with *ura3* edited U6-3-*ura3.b*-gRNA and U6-4-*ura3.b*-gRNA. **f** Relative expression of gRNA

G. lucidum cells transformed with U6-3-*ura3.b*-gRNA and U6-4-*ura3.b*-gRNA. **a**, **c** Red boxes indicate *ura3* sequence: GGCCTCTCCGTGTATGAGC (5'-3'), PAM sequence: "CGG (5'-3')". **b**, **d** PAM sequence is indicated, background color indicates edited *ura3* sequence. ***P* < 0.01

RNA extraction and qPCR

Plasmid DNA was extracted from *G. lucidum* cells using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Crawley, UK). Total RNA was extracted from *G. lucidum* cells using the RNeasy spin kit (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was determined using a spectrophotometer (Bio-Rad, Richmond, UK).

Total RNA (4 µg/L) from 42 cells was used for RNA extraction. The concentration of RNA was determined using a spectrophotometer (Bio-Rad, Richmond, UK). Total RNA (1.5 × 10⁷ cells) was used for TRIzol extraction (Saggs, Saggala, Chandra) according to the manufacturer's instructions. For PCR, the DNA extracted from RNA was used for cDNA synthesis using the cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Richmond, UK).

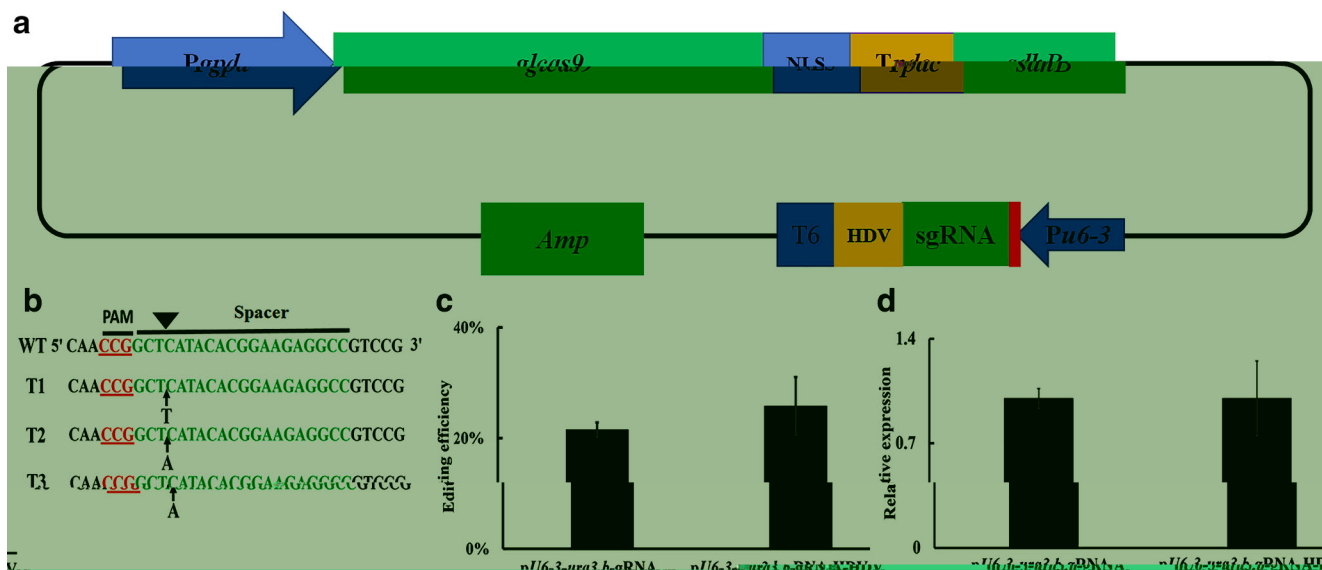
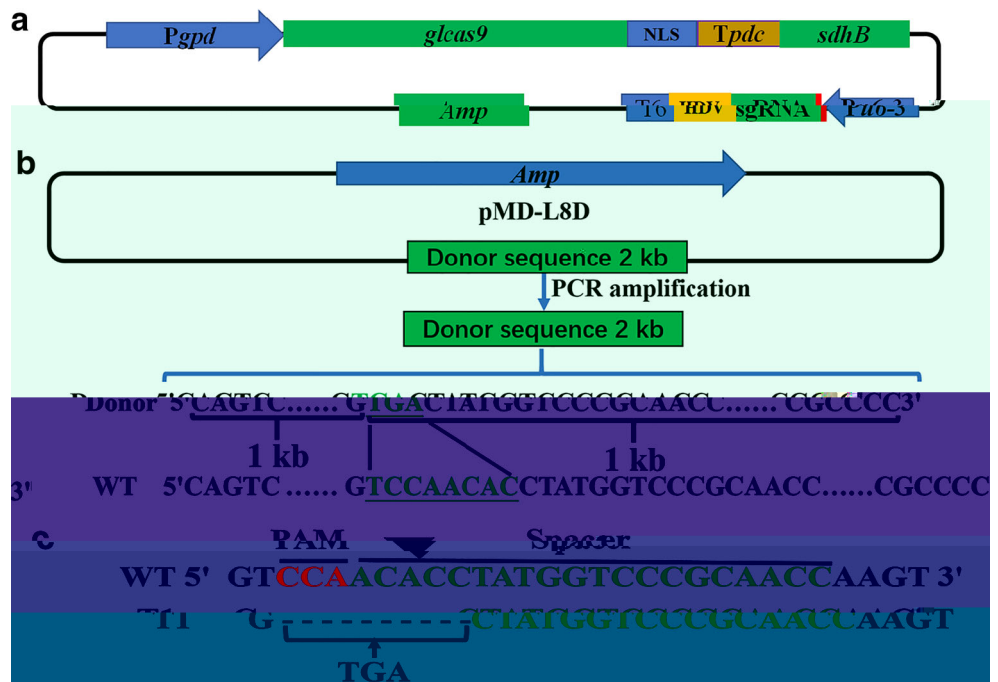


Fig. 2 Effect of HDV on *ura3* editing efficiency. **a** U6-3-*ura3.b*-gRNA-HDV; edited *ura3.b*: GGCCTCTCCGTGTATGAGC (5'-3'). **b** Sequence alignment of edited U6-3-*ura3.b*-gRNA-HDV; PAM sequence is indicated, background color indicates edited *ura3* sequence. **c** The editing efficiency of *ura3* of *G. lucidum* cells transformed with U6-3-*ura3.b*-gRNA and U6-3-*ura3.b*-gRNA-HDV. **d** Relative expression of gRNA

G. lucidum cells transformed with U6-3-*ura3.b*-gRNA and U6-3-*ura3.b*-gRNA-HDV. **a**, **c** Red boxes indicate *ura3* sequence: GGCCTCTCCGTGTATGAGC (5'-3'), PAM sequence: "CGG (5'-3')". **b**, **d** PAM sequence is indicated, background color indicates edited *ura3* sequence. ***P* < 0.01

Fig. 3 Ed₃ g₁ f c *p515018*; *G. l cid m*. **a** A c *p515018* ed₃ g₁ a d, U6-3-tl8-gRNA-HDV. Red b... e e e e c *p515018* ace (*tl8*): GGTTCGCGGACCATA GGTGT (5'-3'), PAM. a "TGG (5'-3'). **b** D₃ f e a f c *p515018*. **c** A g e e f c *p515018*... g... a d WT. PAM... ed, bac... g e e e e e c... g e. fCa9, a g e e e e ce (ace)... g e e e, a d bac... a d... bac... e d e e e e a d d e e e e, e e e e.



(dT) (T e... Sc e f c, Ma ac e, USA) a d e c f c e gRNA-R (S e e a Tab e S1)... M (T e... Sc e f c, Ma ac e, USA) acc d... g... e a fac e... c... T e PCR a e f e d... L... a PCR... (Ne E g a d B a b a, Be g, C... a). T e... e a gRNA-F1/gRNA-R1 (S e e a Tab e S1)... a e d f... e a f c a... f gRNA f *ra3*. T e... c 5 (*c p5*) g e e a e d a... e e a e f e c e (X e a. 2015).

Selection of mutants

F... c e a c d (FOA)-e... a... e e e e e d a f... : a f e... a f... f *ra3* d... a d a d RNA e... ac... e 10⁷... a... e e... e d... d CYM ed... c... a... g 4 g/L ca b... f... e f... d f e e c... a d e e c e d... a f... e e... a f e e d... d CYM ed... c... a... g 400 g/L FOA f... e e c... d... d... f e e c... T e... e e e c e d... a f... FOA ed... e e c... f e d b... e e c... g. A f e... a f... f c *p515018* d... a... d... a... e e c... e d... 1 L... d CYM ed... c... a... g 20 μM 5,6-b (b e... d e... e a...)-2- e c a... -... d... -4- f 12... a d... e... e d... d CYM ed... c... a... g 4 g/L ca b... f... e f c a... .

Verification of transformants

T e f... *ra3*, *c p515018*, a d *c p505d13* d... a... e... e a g e e e c e... e e a f e d b... e a URA3 F/URA3 R (S e e e a Tab e S1), *CYP5150L8*

F/CYP5150L8 R (S e e e a Tab e S1), a d *CYP505D13* F/CYP505D13 R (S e e e a Tab e S1) g g e... c DNA. f c e... d... g... a f... a... a... e... a e... T e... e... e e b e c e d... e e e c... g... f... c... f... a... .

A b a d... c e e... c... d... g *G. l cid m* a e d a... c, f... e e f c a... f... e g e e -e d e d... a f... a... e e c a... e e c... a... a... c *p515018*... a... F... a... a... f... e... a e f d a... c... a... e e e a e d, a d... e... a c... a... a d... - a... e a a... e e e f e d a... e... e d (Q... e a. 2017). P... a... f 10³... e e c... e d... 1 L... d CYM f... 12... a d... e d... d CYM ed... c... a... g 4 g/L ca b... f... e e c... . A f e 7 d a... 20 c... e... e e a d... c e d... a d... a f... e d... a... e... d CYM ed... 4 g/L ca b... . T e... e e e c e d... a f... a... e e e f e d a a b... e... e... e d. I f... e c *p515018* e d... g e g... - a... - f e d a d... c... e... e... e PCR d... (L8D), e c *p515018* e e c e... f c e... d... g... a... a c... e d... C... e 007 e c... a d e... e... g... c... f... a... - a... a... d... e. I f... e e... e... g... e... f a 10 c... e... e... e a e a L8D, e e e e c e d... c *p515018*... a... a... b e c e d... f... c... c... e... e a... a... a d e c b e d b e... ,... c... f... e... e... a... a... a... .

The microscopic examination of mycelia

T e... c e a... e e... c... b a e d... a... a... e f a... a 28 C f... 48... a d... b e c e d... O... CX43... c... c... e (O... , T... , Ja...) f... d e c... f... c a... c... g... e c... . F... e... b... e... a... f... c e, a b... 10 g... c e a... e e f... e d... a 200 μL e... a... /a c e c a c d (3:1)... f... 30... a 4 C.

T₁, e f e d a e e e a₃ e d . 4,6-d a d₃ -2-
 e₃ d e (DAPI) 150 μL PBS b f f e . 3.3 μg/ L
 f₃ a c₃ c₃ a₃ f 10₃ , a e d c e . PBS b f f e ,
 a d b e c e d . a Ze A . I a g e M2 f e c e c e -
 c . c e (Ze , J e a , G e a) . a DAPI e c a₃
 a a a .

Analyses of cell growth and GA

F e e a₃ f *G. lucidum* a e f e d a d e c b e d e a -
 e (X e a . 2013). T e c e c e c e d f . c e a a a d
 a e a c e a a a a e d f e d c e e g . (DCW),
 a d e a c₃ f GA a e f e d a e . e e d
 (X e a . 2013). T e e a c e d GA a e e e b e c e d .
 g - e f a c e d c . a g a - (HPLC) (A g e
 T e c₃ . g e 1200 e e , C a f₃ a , USA), e e d . a
 ZORBOX 300SB-C18 c₃ (5 μ , 4.6 250).
 T e b e a e A c₃ a₃ e d e a . /f c a c d
 (100:0.1 /) a d b e a e B . a 100% a e . A₃ e a
 g a d e f . 80% A . 100% A₃ 20₃ a l L/₃ a
 a d e d .

Re

Disruption of *ura3* by identifying a suitable promoter for in vivo expression of gRNA in *G. lucidum*

T₁ f₃ d a . e c a a b e f d₃ g e e₃ f gRNA
 e 6 g e a c b e d b . III e e e e d e d .
 b e d e e₃ e d₃ *G. lucidum* a f . A g c₃ e a e
 e e c e a b e e d b e e c e a g e e . 6 g e e
 f . *Schizosaccharomces pombe* (G e B a N . X14196.1),
Trichophyton rebrum (G e B a N . KC353131.1),
Aspergillus niger (G e B a N . AY136823.1), *Arabidopsis*
thaliana (G e B a N . X52527.1), a d *Homo sapiens*
 (G e B a N . NR_004394.1) (S e e a F g . S1A). F e
 g e e₃ a e d a *gl 6a*, *gl 6b*, *gl 6c*, *gl 6d*, a d *gl 6e*
 (S e e a F g . S1C), e e c e . e e e d c e d a 6
 g e e (S e e a F g . S1B) b b a₃ g . c₃ e a e
 e e c e . e e g e . c e e c e f *G. lucidum*, c
 a e e d e . (C e e a . 2012). T e e e c e
 a₃ g a f e e . c d₃ f e a g e e a d e d₃ g b e f e
 e e d c e d a c₃ a₃ e f 6 e e a c c d₃ g
 e e c e d a . e a d e e e a e d a *U6-0*, *U6-1*,
U6-2, *U6-3*, a d *U6-4*, e e c e . F e e , e e
U6-3 a d *U6-4* e e a d . c e e e e gRNA
 e e . (F g . 1a, c). S₃ c e₃ SNP a b e e d₃ e a g e
 e g₃ f *ura3* (S e e a F g . S2A), a c d₃ e d
 Ca 9 a d a gRNA (e *ura3.b*) a g e₃ g 591 b d₃ e a
 f e a c d₃ f *ura3* e e a d e d f e₃ g *ura3* d -
 e₃ e f f c e c e e (F g . 1a, c).

W e a f e d . a d *U6-3-ura3.b*-gRNA, 6
 FOA- e a . e e b a₃ e d f . 28 c a b₃ -
 e a a f a a d e e e c e g e . f e e
 a d . c e d FOA- e a . e d a a
 e e e e d e e d e₃ e 3 b . e a f . a c e -
 a d a c e . f (PAM) (F g . 1b), c a c₃ e e
 c e a a g e e f Ca 9 (C₃ g e a . 2013; M a e a . 2013). F
 d . f *ura3* g a d *U6-4-ura3.b*-gRNA, e e
 FOA- e a . e e b a₃ e d f . 27 c a b₃ -
 e a a f a a d a₃ e e e 3 b .
 e a f PAM . e e a d e e d e₃ e e a d . c e d
 FOA- e a . a (F g . 1d). A a e . , e *ura3* e d₃ g
 e f f c e c (a . f *ura3* d . e . c a b₃ -
 e a a f a) g *U6-3-ura3.b*-gRNA a d
U6-4-ura3.b-gRNA a 21.5% a d 11.4%, e e c e .
 (F g . 1e), e e a a e d a b e e d f . e e
 e f e e e (S e e a T a b e S2). B e d e , e e -
 e e e f gRNA f . a a f e d . a
 d *U6-3-ura3.b*-gRNA a 3.16-f d g e a a f
 a a a f e d . *U6-4-ura3.b*-gRNA (F g . 1f),
 c a b e e e a₃ f g e e d₃ g e f f c e c₃ e
 f e c a e .

Effect of HDV on *ura3* disruption efficiency

A e e d , a c e c e f gRNA c c a f a g
 e f f c e c f CRISPR-Ca 9 e d a e d g e e d₃ g (G a a d
 Z a 2014; Z a g a d M a a e 2015). T a c e e e
 e c e a c₃ a e₃ a₃ , e e e HDV b . e a
 e 3' e d f gRNA a c . a e d , a d e c₃ c e d
U6-3-ura3.b-gRNA-HDV d . a d a e d .
 e e e e e *ura3* e d₃ g e f f c e c c d b e₃ c e a e d
 e₃ . (F g . 2a). A a e . , a a f 8 FOA- e a . a
 e e b a₃ e d f . 31 c a b₃ - e a a f a a d
 a₃ e e e e d e e d e₃ 3 b . e a f PAM₃
 e e a d . c e d FOA- e a . a (F g . 2b). T e
ura3 e d₃ g e f f c e c . a d . HDV . e e 25.8%
 a d 21.5%, e e c e . (F g . 2c). M e a . e , e e c e
 e d₃ g gRNA e e e e e e a . e e a e
 (F g . 2d). I a . e e f e e e . e a e g e e d
 f *ura3* e d₃ g e f f c e c . *U6-3-ura3.b*-gRNA-HDV
 a g a₃ . *U6-3-ura3.b*-gRNA a b a₃ e d (32.0% . .
 25.5%, *p* < 0.05, S e e a T a b e S2).

Editing of two functional genes (*cyp515018* and *cyp505d13*) by applying the abov599TD961.esfuphighed(t)

addition of HDV antigen (p515018) gene expression efficiency (data not shown). To achieve efficient HR-mediated gene editing (NHEJ), a 2-bp spacer was designed to target the PAM sequence “TCCAACAC” and the “TGA” start codon (Fig. 3b). A 68-bp *c p515018* gene was inserted into the CRISPR-Cas9 system (see Fig. S3), and the *G. lindberghii* strain was transformed with the CRISPR-Cas9 system. The edited *G. lindberghii* strains were cultured in the presence of the donor DNA (Hege et al. 2016), and the edited strains were confirmed by PCR (Ye et al. 2010). After 24 h of culture (Fig. 4a) and 24 h of culture (Fig. 4b), the edited WT (WT-eg) and ML8-eg strains were observed.

The efficiency of WT-eg and ML8-eg strains was determined by HPLC. A 100% efficiency was observed (MS data not shown). GA (GA-M, T, S, and Me) was used for WT-eg and ML8-eg strains (see Fig. S4). A 100% efficiency was observed (Fig. 5a), but the efficiency of GA (Fig. 5b), i.e., GA-M, T, S, and Me, was significantly decreased in ML8-eg compared to WT. The efficiency of GA-M was 0.01 g/g DCW, compared to WT (1.33 g/g DCW), and the efficiency of GA-T was 0.56 g/g DCW, compared to WT (0.14 g/g DCW). The efficiency of GA-T and GA-M was significantly higher than that of WT (Wage et al. 2018), i.e., 3-d-8, 24-d-8, 24-d-26 (HLDO), 3-d-8, 24-d-8, 24-d-26-a (HLDA), and 3-d-8, 24-d-26-cac d (HLDOA), compared to WT and ML8-eg.

The efficiency of gene expression was determined by the expression of *G. lindberghii* CYP51018 (*c p515018*) gene expression. The efficiency of WT-eg and ML8-eg strains was determined by HPLC. A 100% efficiency was observed (MS data not shown). GA (GA-M, T, S, and Me) was used for WT-eg and ML8-eg strains (see Fig. S4). A 100% efficiency was observed (Fig. 5a), but the efficiency of GA (Fig. 5b), i.e., GA-M, T, S, and Me, was significantly decreased in ML8-eg compared to WT. The efficiency of GA-M was 0.01 g/g DCW, compared to WT (1.33 g/g DCW), and the efficiency of GA-T was 0.56 g/g DCW, compared to WT (0.14 g/g DCW). The efficiency of GA-T and GA-M was significantly higher than that of WT (Wage et al. 2018), i.e., 3-d-8, 24-d-8, 24-d-26 (HLDO), 3-d-8, 24-d-8, 24-d-26-a (HLDA), and 3-d-8, 24-d-26-cac d (HLDOA), compared to WT and ML8-eg.

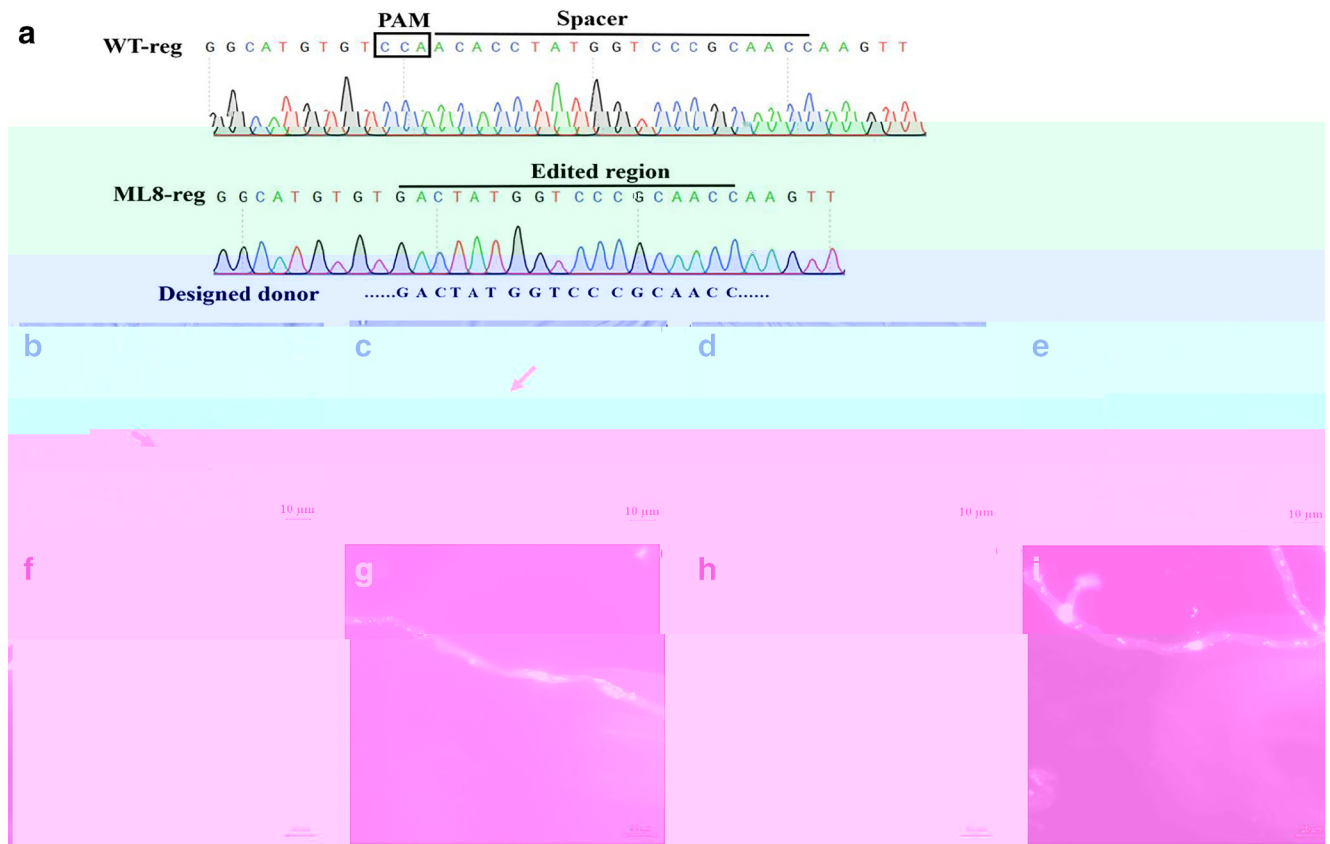


Fig. 4 Microscopy images of WT-eg and ML8-eg strains. (a) Schematic of the CRISPR-Cas9 system. (b-e) Microscopy images of WT-eg and ML8-eg strains stained with DAPI. (f-i) Microscopy images of WT-eg and ML8-eg strains stained with DAPI. Scale bars are 10 μm.

201 b d... ea... f... e... a... c... d... f... c... p505d13... a... e...
ec ed. Afe... a... f... a... a... d... e... c... c... f... a... ,...
... f... eca b... -e... a... a... f... a... e... e... b...
a... ed (F g. 6),... e... ed... g... eff... c... c... f 22.2%.
S... c... e... f... d... f... c... p505d13... a... a... g... e... d... c...
... g... a... e... e... deed... e... f... f... c... a... g... e...
... d... e... f... G. l... cid... m.

D c

F... c... a... g... e... d... a... b... c... a... c... g... g...
ba... d... c... e... T... d... e... ()... e... eff... c...
c... f... b... g... e... d... e... a... d... HR, a... d... ()... e... ac... f... e...
c... a... c... e... d... e... e... f... e... c... g... e... f... c... a... f...
g... e... ed... g... f... ba... d... c... e...

CRISPR-Ca9 efficiency of gene deletion in *G. l cid m* a
 bea... g... d... ceed... g... ec... (Q...
 e a. 2017), the CRISPR-Ca9... f... *G. l cid m* a
 ed... g... ed... g... c... c... *G. l cid m* a
 c... ced. The... e... d... e... e... gRNA e-
 a... d... a... e... d... e... c... f... d... a... b...
 g... e... e... c... e... a... e... f... g... a... ed CRISPR a-
 d. I... add... Ca9... d... gRNA... g... e... a... e... c... g...
 e... e... ed... de... e... ce... c... a... a... d... e... de... e...
 eff... c... c... a... d... RNA... deg... ada... d... g... a... f... a... f...
 g... c... bed... gRNA, a... d... e... c... a... c... b... e... a...
 g... e... c... ea... age... eff... c... c... b... CRISPR-Ca9. C... a... ed...
 e... e... ba... d... ce... (Table 1),
 a... e... g... b... ed... a... e... a... e... g... ed... g... eff... c... c... f... a... e...
 g... e... a... d... e... a... a... e... CRISPR-Ca9 a... ed... f... c...
 a... g... e... d... a... d... ec... e... g... e... ed... g... g...
 e... e... c... ce... f... ac... e... ed.

I... a... ed... a... e... c... *p515018* d... eff... c... c... a...
 e... a... e... f... *ra3* a... d... c... *p505d13* (0.67... a... /10⁷
 a... 5.3... a... /10⁷... a... a... d... 2... a... /10⁷
 a...),... c... a... be... a... b... ed... e... a... ge... g...
 e... de... c... de... effec... f... CRISPR-Ca9 (C... e... a... 2017;
 Ga... e... a... 2017; Je... e... a... 2017). I... e... e... g... e...
 c... *p515018*... a... e... b... ed... a... ec... e... e... a... de... c... a...
 g... HR... d... (2 b). a... ad... ed... I... a... e... ed... c... a... f... -
 a

2018). I d be a d ed a f GA ca be de-
 ec ed c p515018 d a , gge g a a e a -
 a f a e , GA b a g CYP5150L8 a e -
 , a d a be e e e g e de GA
 b e c a a a d e a e d f c a g e e a d
 e e .
 c c e a a ce fCRISPR-Ca 9 ca abe
 f gRNA e e , a f c a g e e c p515018
 e ad a ed a G. l cid m a be c-
 ce f d ed. Q e a d , c d e e a a a
 a f f e ab c e g e e g f G. l cid m a d -
 de e g e c e g e e g f e ba d ce e
 , a e e d d a c g a (J a g
 e a . 2017) a d a a d c e (Lee e a .
 2015). Q e e a d , e a b e b e c
 ec a de a d ac e e a e de a d g a d
 a g a . T e de e ed a d e a e d -
 f a d a be a abe de e ba d -
 ce e

Acknowledgments We a M. H a L f e a a ce e a e
 age ffe e a e e e a d M. We -F a g W a g f d -
 c g HPLC da a a d GA b e c a a .

Funding information T a a ed b Na a Ke
 Re e a c a d De e e P. g a f C a (N . 2018YFA0901904),
 Na a Na a Sc e ce F da f C a f . 31770037 a d
 31971344), a d S a g a M c a Na a Sc e ce F da f .
 17ZR1448900 a d 18ZR1420300).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest JJZ, PAW, a d HX a e e c e . f a f c -
 a g e e d g ec g L g c c e e d de a
 C e e a e (A ca N . 201811522445.0) a a da e
 Dec. 13, 2018.

Ethical approval T a c e d e c a a d e . a
 a c a a e e e .

Reference

A a e T, M . K, Ya a T, Oga a T, O a S, A e T, K a a S
 (2015) Ta - ade CRISPR/Ca e f g e f c e
 a ge ed g e e ace e e ce b a f g . B . ec .
 B e g 112(12):2543 2549. //d . g/10.1002/b .25662
 B . DA, G . e C (1988) S . ce a RNA U6 e a ab c -
 e ed f . e a a a . Na e 334(6179):213 218. //d
 . g/10.1038/334213a0
 C e SL, X J, L C, Z YJ, Ne . DR, Z . SG, L CF, W a g LZ,
 G X, S . YZ, L . HM, L Y, S . g JY, H e a B, L e a e A,
 Q a J, L JQ, L . X, S . LC, He L, X a g L, X XL, N YY, L
 QS, H a MV, Y a HX, Z a g J, C e HM, L AP, W a g Z, L
 MZ, Sc . a DC, S . C (2012) G e e e e ce f e de
 ed a Ganoderma l cid m. Na C . 3:913.
 //d . g/10.1038/c . 1923

C e YR, Z e g SY, H RK, W a g XX, H a g WL, L . JF, W a g LY, L
 GF, Ca Y, Z a g Y (2017) U g ca c a g e e .
 e CRISPR/Ca 9 eff c e c e b a f . PL S Q e 12(8):
 e018 2528. //d . g/10.1371/ a . e0182528
 C e BX, We T, Ye ZW, Y . F, K a g LZ, T a g HB, G . LQ, L . JF
 (2018) Eff c e CRISPR-Ca 9 g e d e e e d be
 ed a Cordiceps militaris. F . M c b . 9:1157.
 //d . g/10.3389/f cb.2018.01157
 C . g L, R a FA, C . D, L . SL, Ba e . R, Habb N, H . PD, W XB,
 J a g WY, Ma aff . LA, Z a g F (2013) M e g e e g -
 e e g g CRISPR/Ca e . Sc e ce 339(6121):819 823.
 //d . g/10.1126/ c e ce.1231143
 Ga YB, Z a YD (2014) Se f ce g f b e f a ed RNA
 g de RNA a d f CRISPR- ed a e d g e e
 ed g . J . eg P a B . 56(4):343 349. //d . g/10.1111/
 b.12152
 Ga W, L . g L, T a XQ, X FC, L . J, S . g PK, B e a JR, S . g CP
 (2017) G e e e d g c e e CRISPR/Ca 9 e .
 F . P a Sc 8:1364. //d . g/10.3389/F .2017.01364
 Ga Z, He e a-Ca . E, Be . B (2018a) De e a e f e e ac
 a c e a g a f e 3 e a e III. M T e
 N c e c Ac d 10:36 44. //d . g/10.1016/ . 2017.11.
 006
 Ga Z, He e a-Ca . E, Be . B (2018b) RNA e a e II ac
 e f e 3 P III e . M T e N c e c Ac d 12:135
 145. //d . g/10.1016/ . 2018.05.001
 G BS, Na gee, K a S (2016) G a . de c a d a g e g e e
 e ce c a ce : in silico a d in itro d . T . B .
 37(10):14271 14290. //d . g/10.1007/ 13277-016-5291-8
 Ha SS (2016) Ed g e . Sc A 314(3):56 63.
 He a de N (2001) S a g ce a RNA g e e a de e d
 f da e a ec a f a c e . J B . C e 276(29):
 26733 26736. //d . g/10.1074/ bc.R100032200
 He g R, S . e a I, R a M, T e M, H e c e F (2016)
 D a . c f g b d de e e a g e d a f
 Agroc. be aegerita a d e ec f a . c f g e
 a . c g e . M c P . g 15(9):947 957. //d
 . g/10.1007/ 11557-016-1221-9
 J e e KT, F e L, P e e TS, H a g JR, X FP, B . d L, L . YL,
 L . L (2017) C a g ac ce b a d g de e e ce e da
 c e affec CRISPR-Ca 9 g e e d g e f c e c . FEBS Le
 591(13):1892 1901. //d . g/10.1002/1873-3468.12707
 J a g Y, Q a FH, Y a g JJ, L . YM, D . g F, X CM, S . BB, C e B,
 X XS, L Y, W a g RX, Y a g S (2017) CRISPR-C fl a ed
 g e e d g f Cornebacteri m. gl tamic m. Na C . 8:
 15179. //d . g/10.1038/c . 15179
 K . S, Ha BS, R HS (2015) C e ec g e a d e a e d e f
 a f a . M c b . g 43(1):1 8. //d . g/
 10.5941/M c .2015.43.1.1
 Lee JS, Ga LM, Le . NE, K degaa d HF (2015) CRISPR/Ca 9-
 ed a e d g e e g e e g f CHO ce fac e : a ca
 a d e ec e . B . ec . J 10(7):979 994. //d . g/10.
 1002/b .201500082
 Ma P, Y a g LH, E e KM, Aac J, G e M, D Ca . JE, N e JE,
 C c GM (2013) RNA-g ded a g e e g e e g a
 Ca 9. Sc e ce 339(6121):823 826. //d . g/10.1126/ c e ce.
 1232033
 Na a a T, A d Y, K aa K, Na a . K, Ka ada T (2011) Eff c e
 g e a g e g De aCc. k 70 . De aCc.lig4 a f e
 aga c ce e Coprinopsis cinerea. F . ga G e B . 48(10):
 939 946. //d . g/10.1016/ fgb.2011.06.003
 O . RA, de J . g JF, Be e d E, W a g F, W e HA, L g e LG
 (2010) A eff c e g e de e e ced e f e
 f g ba d ce e Schi oph ll m comm ne. W d J M c b
 B . 26(10):1919 1923. //d . g/10.1007/ 11274-010-0356-
 0

- Q₃ H, X a H, Z₃ G, Z₃ ZH, Z₃ gJJ (2017) CRISPR-Ca 9 a ed ge e d [//d . g/10.1016/ cb .2017.02.012](#)
- Sa₃ N, Z₃ g Q, Ma CM, Ha₃ M (2009) A₃ - a₃ def- c₃ c₃ -l [//d . g/10.1248/c b.57.1076](#)
- Sc₃ e M, Ka₃ R (2019) CRISPR-Ca 9 ge e ed₃ g a - ac e₃ f a₃ [//d . g/10.1016/ .fgb.2019.04.016](#)
- Sc₃ e M, Sc₃ e e G, Re₃ S, Ka₃ R (2016) Ge₃ e ed₃ g₃ *Ustilago ma dis* [//d . g/10.1016/ .fgb.2015.09.001](#)
- S₃ a₃ QW, W₃ g YP, L₃ J, Z₃ g Y, C₃ KL, L₃ g Z, Z₃ g K, L₃ JX, X₃ JJ, Q₃ JL, Ga₃ CX (2013) Ta ge ed ge e [//d . g/10.1038/ b.2650](#)
- S₃ g X, X a H, L₃ SW, W₃ g XZ, W₃ g WF, L₃ SJ (2019) B₃ [//d . g/10.1186/ 40643-019-0256-6](#)
- S₃ ga₃ SS, S₃ H, S₃ a E, C₃ ba H, N₃ S, O₃ a abe Y, O₃ a abe K (2017) Ge₃ e ed₃ g₃ e [//d . g/10.1038/ S41598-017-00883-5](#)
- S₃ X, H₃ Z, C₃ R, J₃ g Q, S₃ g G, Z₃ g H, X₃ Y (2015) Ta ge ed age e₃ [//d . g/10.1038/ e 10342](#)
- V₃ PJ, E₃ c ba N, W₃ HAB, L₃ g₃ e LG, O₃ RA (2019) H g - [//d . g/10.1038/ 41598-019-44133-2](#)
- Wa₃ E (2016a) CRISPR-ed ed c [//d . g/10.1038/ b 0616-582](#)
- Wa₃ E (2016b) Ge₃ e-ed ed CRISPR [//d . g/10.1038/ a e.2016.19754](#)
- W₃ g WF, X a H, Z₃ g JJ (2018) B₃ [//d . g/10.1002/b .26583](#)
- X a H, Z₃ g JJ (2016) P [//d . g/10.1016/ . b ec .2015.12.007](#)
- X₃ K, L₃ g X, Ga₃ F, Z₃ g JJ, L₃ JW (2010a) A₃ [//d . g/10.1016/ . cb .2010.04.013](#)
- X₃ JW, X₃ YN, Z₃ g JJ (2010b) P [//d . g/10.1007/ 00253-009-2106-5](#)
- X₃ JW, Z a W, Z₃ g JJ (2010c) B [//d . g/10.1007/ 00253-010-2576-5](#)
- X₃ JW, X₃ YN, Z₃ g JJ (2012) E₃ [//d . g/10.1128/AEM.01263-12](#)
- X₃ YN, X a XX, Z₃ g JJ (2013) I₃ d ced effec [//d . g/10.1002/b .24852](#)
- X₃ ZC, X₃ J, J A, Z₃ Y, Z₃ g X, H₃ Y, S₃ g JY, C₃ SL (2015) Ge₃ e- de e ec₃ [//d . g/10.1016/ .gg e.2015.08.025](#)
- Y RR, M a a a H, Tac a a T, S₃ a N, A₃ T (2010) A - a₃ g- e ge ee e [//d . g/10.1128/Ec.00374-09](#)
- Z₃ g WW, Ma a e G (2015) CRISPR-Ca 9-med a ed ge₃ e ed₃ g₃ *Leishmania dono ani* [//d . g/10.1128/ B .00861-15](#)
- Z₃ g JJ, T₃ g YJ (2004) S b e ged c [//d . g/10.1007/b94367](#)
- Publisher's note** S₃ ge Na e e a₃ e a [//d . g/10.1002/b .26583](#)