



真菌中 RNA 干扰的生物学功能

赵轩, 邓竞, 马潇雨, 朱旭东*, 张萍*

北京师范大学生命科学学院, 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室, 北京 100875

赵轩, 邓竞, 马潇雨, 朱旭东, 张萍. 真菌中 RNA 干扰的生物学功能. 微生物学报, 2022, 62(5): 1656–1668.

Zhao Xuan, Deng Jing, Ma Xiaoyu, Zhu Xudong, Zhang Ping. Biological functions of RNA interference in fungi. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1656–1668.

摘 要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种保守的真核生物基因调控机制, 它利用小的非编码 RNA 介导转录/转录后的基因沉默。虽然部分真菌丢失了 RNAi 系统, 但随着对真菌 RNAi 机制研究的增加, 越来越多的证据表明, 真菌的 RNAi 系统不但参与维持基因组完整性, 其在调节真菌生长发育、介导异染色质组装、促进着丝粒进化、调节真菌耐药性与毒力等方面也具有重要作用。本文主要对真菌中 RNAi 的生物学功能进行综述, 以期为进一步深入研究真菌 RNA 干扰机制提供一定的理论与研究基础。

关键词: 真菌; RNA 干扰; 非编码小 RNA; 生物学功能

Biological functions of RNA interference in fungi

ZHAO Xuan, DENG Jing, MA Xiaoyu, ZHU Xudong*, ZHANG Ping*

Beijing Key Laboratory of Genetic Engineering Drug and Biotechnology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: RNA interference (RNAi) is a conserved eukaryotic mechanism that uses small non-coding RNAs to mediate transcriptional/post-transcriptional gene silencing. Despite the deficiency of RNAi mechanism in some fungi, evidence accumulates that fungal RNAi not only maintains genome integrity but also plays a pivotal role in the regulation of fungal growth and development, heterochromatin

基金项目: 国家自然科学基金(31900130); 中央高校基本科研业务费专项资金(2019NTST12)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31900130) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2019NTST12)

*Corresponding authors. E-mail: ZHU Xudong, zhu11187@bnu.edu.cn, ZHANG Ping, zp1516@bnu.edu.cn

Received: 25 October 2021; Revised: 27 November 2021; Published online: 15 December 2021

formation, centromere evolution, and development of fungal drug resistance and pathogenicity. This review summarizes the biological functions of RNAi in fungi, which is expected to lay a basis for further research on the mechanism of fungal RNAi.

Keywords: fungus; RNA interference; small non-coding RNAs; biological function

RNA 干扰是真核生物中高度保守的基因表达调控机制, 其利用长度为 20–30 nt 的非编码小 RNA (small non-coding RNAs, sRNAs) 沉默靶基因表达。1998 年, 美国斯坦福大学的 Fire 和马萨诸塞大学的 Mello 等科学家在 *Nature* 上共同发表论文, 首次提出 RNA 干扰的概念^[1]。Fire 和 Mello 等发现线虫中外源双链 RNA 能够沉默基因表达, 因此 RNA 干扰最初被定义为外源长双链 RNA 介导的靶标 RNA 降解过程。随着研究的不断深入, 目前广义的 RNA 干扰是指由长度为 20–30 nt、具有调节功能的非编码小 RNA 参与的抑制靶基因表达的现象。根据起源、结构、效应蛋白及生物学作用的不同, 这些非编码小 RNA 主要分为 3 类: 小干扰 RNAs (short interfering RNAs, siRNAs)、微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 和 piwi 相互作用 RNAs (piwi-interacting RNAs, piRNAs)。在不同的 RNA 干扰通路中, sRNAs 调控了诸多的细胞生命活动, 例如细胞发育、RNA 加工和稳定性、宿主防御、染色体分离等。值得注意的是, 关于 RNAi 生物学功能的报道主要集中在人类、小鼠和果蝇等动物细胞中, 而首次发现 RNAi 相关的现象却是在植物和真菌中^[2–3]。

真菌中 RNAi 机制广泛存在, 大多数真菌的 sRNAs 都为 siRNAs。在真菌中, 由多种途径产生的双链 RNA (dsRNA) 被具有 RNase III 结构域的核酸内切酶剪切加工成 20–30 nt 的 sRNAs, 这些 sRNAs 可以作为基因沉默的触发器, 与一系列特异性蛋白质结合形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced interference complex,

RISC)。在转录水平上, RISC 复合物招募组蛋白甲基转移酶, 介导异染色质形成; 在转录后水平, RISC 复合物通过 sRNAs 碱基互补配对的方式识别并剪切靶标 RNA, 从而使靶标 RNA 降解, 翻译受到抑制, 最终导致特定基因的沉默。RNAi 途径的经典作用蛋白, Dicer、Argonaute 以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 在真菌中具有显著的保守性。早期研究主要揭示了真菌 RNAi 在基因组防御中的作用。真菌 RNAi 能够通过抑制转座子跳跃、病毒入侵以及外源基因转入来维持基因组的完整性。近些年来的研究结果发现, 和动物细胞中的 RNAi 途径类似, 真菌 RNAi 也具有广泛的生物学功能, 包括调节真菌生长发育、促进着丝粒进化、调节真菌耐药性和毒性等。RNAi 在不同的真菌中扮演了不同的角色。本文将针对真菌中 RNA 干扰的生物学功能作一综述, 为真菌 RNA 干扰机制的研究者提供参考。

1 控制转座子活性

转座子 (transposable element, TE) 是一类可以在染色体上或不同染色体间自由移动的 DNA, 在真菌基因组中广泛存在, 其移动可导致插入位点突变、临近基因表达失活、DNA 双链断裂等, 从而影响基因组的稳定性。为了维持基因组的完整性, 许多真菌进化出了抑制转座子活性的机制, 比如重复序列诱导的点突变 (repeat induced point mutation, RIP) 和 RNA 干扰机制。

粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) 是真菌中

研究 RNA 干扰的模式菌株, 在其营养生长阶段, 由重复的转基因序列引发的转录后基因沉默现象被称作 quelling, 首次报道于 1992 年^[3]。quelling 对于抑制转座子复制是必不可少的。Nolan 等发现粗糙脉孢霉 quelling 途径中的关键蛋白 QDE2 (Argonaute 蛋白) 和 Dicer 能够抑制类似 LINE1 的反转录转座子跃迁^[4], 但此过程不需要 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 QDE1 和 RecQ DNA 解旋酶 QDE3 的参与。另外, 在粗糙脉孢霉有性生殖阶段, 未配对 DNA 引发的减数分裂沉默(meiotic silencing by unpaired DNA, MSUD)也能够显著抑制转座子活性。MSUD 发生在减数分裂前期, 当由于基因缺失、复制和转座等原因引起同源基因未配对时便会引发 MSUD, 导致未配对 DNA 发生基因沉默。参与 MSUD 的主要蛋白元件定位于细胞核周围, 其中 *sad-1* 是 *qde-1* 的同源基因, 负责编码 RdRP。SAD-1 将未配对 DNA 产生的异常 RNA (aRNA) 合成为双链 RNA, 之后 dsRNA 被加工成与 MSUD 相关的 siRNAs (masiRNAs)^[5-6]。2015 年, Wang 等鉴定出起源于未配对转座子的 masiRNAs, 且该类 masiRNAs 的产生依赖于 SAD-1^[7], 从而揭示了 MSUD 在减数分裂过程中抑制转座子活性进而维持基因组稳定的作用。

人类条件致病真菌新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)使用不同的 RNAi 途径来抑制转座子活性, 其中有性生殖阶段由 siRNAs 介导的转录后基因沉默现象被称作有性生殖诱导的沉默(sex-induced silencing, SIS)。在有性生殖过程中, Rdp1、Ago1 及 Dcr1 蛋白表达量显著提高, 生成大量转座子起源的 siRNAs。但当 Rdp1 蛋白缺失, 转座子起源的 siRNAs 表达量降低, 转座子被激活, 子代突变率增加^[8], 说明隐球菌在有性生殖过程中使用 SIS RNAi 途径来抑制转座子活性, 达到维持子代基因组完整性的

目的, 该过程既可以发生在同性交配(α - α)也可以发生在异性交配(α - α)过程中。因此, MSUD 和 SIS 分别是不同真菌在有性生殖阶段抑制转座子表达的重要防御机制。和粗糙脉孢霉相似的是, 新生隐球菌营养生长阶段也存在类似 quelling 的基因沉默现象, 称作有丝分裂诱导的沉默(mitotic-induced silencing, MIS)^[9]。Jiang 等和 Dumesic 等通过对新生隐球菌 sRNAs 进行高通量测序, 发现其在营养生长阶段也能够产生转座子起源的 siRNAs^[10-11]。Janbon 等发现 Rdp1 缺失导致营养生长阶段转座子相关的基因表达量显著提高, 转座子跃迁能力增强^[12]。2013 年, Dumesic 等的工作揭示了隐球菌营养生长过程中转座子起源的 siRNAs 的形成机制, 即含有次优内含子的转座子基因产生的 pre-mRNA 容易在剪接体上滞留, 从而成为剪接体偶联的蛋白复合体(spliceosome-coupled and nuclear RNAi, SCANR)蛋白复合体的底物, 之后在套索分支酶 Dbr1 的作用下合成 dsRNA, dsRNA 进入经典的 RNAi 途径, 产生转座子起源的 siRNAs^[11]。这些结果说明, 在有丝分裂过程中, 新生隐球菌能够利用 RNAi 途径抑制转座子活性。最新研究结果中鉴定了 5 个参与隐球菌 RNAi 途径的新蛋白(Rde1-5), 进一步对上述结论进行了证实^[13]。

在其他真菌中, 也发现了 RNAi 途径抑制转座子活性的证据。稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)是一种农业病原微生物, 在水稻不同生育期均能引起病害。2001 年, Nakayashiki 等发现外源转入的 MAGGY 反转座子在 *M. oryzae* 细胞中受到抑制, 但该抑制现象与 DNA 甲基化无关^[14]。Nakayashiki 等推测 *M. oryzae* 中存在能够抑制 MAGGY 表达的 RNAi 机制。后续研究证实, *M. oryzae* 菌丝中确实能够产生大量靶向 LTR 反转座子的 siRNAs (LTR-siRNAs), 其

中便包括起源于 MAGGY 的 LTR-siRNAs, 说明 *M. oryzae* RNAi 的生物学功能之一便是调控转座子活性^[15-16]。2013 年, Yamanaka 等在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中报道了起源于 *Tf2* 反转座子的 siRNAs, 该类 siRNAs 的产生受到经典 RNAi 蛋白的调控, Ago1 和 Dcr1 功能缺失均会导致 *Tf2* 表达活性增强, 相应地, *Tf2* 起源的 siRNAs 消失^[17]。芽殖酵母(*Saccharomyces castellii*)、小麦锈菌(*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*)中也报道了转座子起源的非编码 sRNAs^[18-19]。

近期研究表明, 毛霉菌中存在非经典的 RNAi 途径来维持基因组的完整性。前期研究对卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)转座子起源的内源小 RNA (endogenous short RNAs, esRNAs)进行了报道^[20], 发现这部分 esRNAs 的表达受到经典 RNAi 途径调控, 其中便包括起源于着丝粒附近区域 Grem-LINE1 反转座子的 siRNAs^[21]。2015 年, Trieu 等发现卷枝毛霉中存在非经典 RNAi 途径(non-canonical RNAi pathway, NCRIP)^[22]。NCRIP 途径依赖于 RdRP 和 R3B2 新型核糖核酸酶 III 类似物。最新研究发现, NCRIP 在调节毒力和转座子迁移方面发挥重要作用。在没有 NCRIP 的情况下, 经典的 RNAi 机制会产生更多的 esRNAs 来抑制 Grem-LINE1 反转座子^[23], 说明 NCRIP 与 RNAi 经典途径的核心元件相互作用, 通过控制着丝粒反转座子的表达来保护基因组的稳定性。NCRIP 作为一种新的调控机制, 目前所知较少, 它在真菌生理学中的作用还有待进一步阐述。

2 参与病毒防御

RNA 干扰对于细胞防御病毒入侵具有重要意义, 是细胞对抗病毒复制的一种天然免疫机制, 这一结论在多种生物体内都得到了证明,

包括动物、植物以及真菌中^[24-25]。真菌的 RNAi 系统通过产生起源于病毒的干扰性小 RNA (virus-derived small RNAs, vsRNAs)介导入侵病毒失活^[26], 该机制在丝状子囊菌板栗疫病菌(*Cryphonectria parvica*)中研究得较为清楚。

板栗疫病菌是引起板栗疫病的病原真菌, 可以被 5 种不同的病毒感染, 因而是真菌中研究 RNAi 系统抵抗病毒入侵机制的模式菌株。真菌中 RNAi 参与病毒防御的现象首先发现于板栗疫病菌中。2007 年, Segers 等发现板栗疫病菌 *dcl-2* 基因突变和 *dcl-1/dcl-2* 基因双突变均会导致菌株对病毒感染的敏感性增强, 且 $\Delta dcl-2$ 突变株中病毒 RNA 的表达水平显著提高, 首次证明了真菌 RNAi 蛋白能够调控病毒入侵过程^[27]。进一步研究发现, 在 *dcl-2* 的作用下, 真菌低毒病毒 RNA 能够被加工为 vsRNAs^[28]。板栗疫病菌编码的 4 个 Argonaute 类似蛋白中只有 AGL2 参与抗病毒的防御反应^[29]。与 *dcl-2* 基因类似, 病毒感染时 *agl2* 的转录水平也显著提高。低毒病毒编码的 RNAi 抑制蛋白 p29 缺失时, *agl2* 和 *dcl2* 的转录本均有较高程度的积累^[29], 说明在病毒入侵真菌的过程中, p29 能够抑制 RNAi 关键蛋白的表达, 这为 RNAi 参与病毒防御提供了间接证据。

构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中的研究进一步证明了真菌中 RNAi 途径对病毒的抑制作用, 丰富了人们对真菌——病毒相互作用方式的认识。在构巢曲霉中, 带有反向重复序列的外源转基因能够引发细胞内强烈的 RNA 干扰现象, 但该过程不依赖 RdRP^[30-31]。构巢曲霉基因组中分别含有 2 个能够编码 Argonaute、Dicer 以及 RdRP 蛋白的基因, 但在 RNAi 过程中, 参与靶标 RNA 沉默的只有一个 Argonaute 和一个 Dicer 蛋白^[32], 两个 *rdp* 基因缺失均不会影响 sRNAs 的产生^[30]。通过构巢曲霉的病毒

感染实验, Hammond 等发现曲霉病毒 1816 能够抑制构巢曲霉细胞内反向重复序列引发的 RNAi 现象, 说明 1816 病毒中存在 RNAi 抑制蛋白^[33]。此外, 构巢曲霉病毒 341 入侵细胞时, 细胞中能够检测到起源于 341 病毒的 siRNAs, 充分说明构巢曲霉 RNA 干扰系统能够以病毒序列作为靶基因, 沉默病毒基因的表达^[33]。这些研究结果表明, 与板栗疫病菌类似, 构巢曲霉的 RNA 干扰系统也能够介导病毒防御机制, 同时一些病毒能够通过表达 RNAi 抑制蛋白因子来应对宿主的 RNA 沉默系统, 这是病毒与宿主之间相互作用、相互进化的结果。

随着高通量测序技术的发展, RNAi 系统参与病毒防御的功能在更多真菌中得到揭示。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)与陆生植物形成共生体, 是土壤微生物群落的重要组成部分。通过 sRNAs 高通量测序发现, 菌根真菌珠状巨孢囊霉能够产生大量靶向病毒基因组的非编码 sRNAs, 这些 sRNAs 也可能参与调控共生植物的基因表达, 在真菌与植物的互作中发挥作用^[34]。尽管尚未发现能够感染粗糙脉孢霉的病毒^[35], 粗糙脉孢霉细胞中引入 dsRNA 却能够激活抗病毒基因和干扰素相关基因的表达。

3 调节真菌生长与发育

早期研究中并未观察到真菌 RNAi 缺陷菌株的表型变化, 而且酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)等真菌完全丢失了 RNAi 系统^[18], 这导致在相当长一段时间内, 研究者们认为 RNAi 机制并不参与调控真菌的生长发育过程, 然而, 粗糙脉孢霉和卷枝毛霉中的研究推翻了这一结论。2010 年, 粗糙脉孢霉中发现了类似 miRNAs 的 sRNAs (microRNA-like RNAs, milRNAs)^[36]。milRNAs

以类似于动植物 miRNAs 的方式调节基因表达, 但 milRNAs 缺陷菌株并没有表现出显著的营养生长缺陷, 它们似乎不参与调控粗糙脉孢霉营养生长及发育过程^[37]。然而, 在粗糙脉孢霉有性生殖阶段, 未配对 DNA 引发的减数分裂沉默缺陷时, DCL-1 缺陷菌株表现出纯合子杂交不育的表型, 而 Dicer 蛋白对 milRNAs 的形成至关重要, 揭示了 milRNAs 参与调控脉孢霉有性生殖过程^[38]。

卷枝毛霉(*M. circinelloides*)是一种人类条件致病接合菌, 能够引发严重的毛霉菌病, 其 RNA 沉默现象首次报道于 2003 年^[39]。卷枝毛霉基因组中编码 2 个 Dicer 蛋白(Dcl1-2), 3 个 Argonaute 蛋白(Ago1-3)以及 3 个 RdRP 蛋白(RdRP1-3)^[40], 不同的 RNAi 蛋白相互组合, 通过产生不同类型的 esRNAs 调节内源基因的表达, 其中研究最为清楚的是起源于外显子的 siRNAs (exonic siRNAs, ex-siRNAs)。根据产生途径不同, 目前已确认的 324 个 ex-siRNAs 可以分为 4 类(图 1)^[38]。第一类 ex-siRNAs 的形成依赖于 Dcl-2 和 RdRP-2; 第二类依赖于 Dcl-2 和 RdRP-1; 第三类同时依赖于 Dcl-1、Dcl-2、RdRP-1 以及 RdRP-2; 第四类 ex-siRNA 的数量最少, 其产生需要 Dcl-1、RdRP-1、RdRP-2。另外, Ago-1 同时参与 4 类 ex-siRNAs 的生成。Dcl-1 缺失导致卷枝毛霉营养生长速率减慢、菌丝形态异常^[41], Dcl-2 缺失导致无性孢子产量显著降低^[42], 预示着卷枝毛霉 RNAi 系统参与调节营养生长过程。RNAi 基因缺失带来的显著表型变化促使卷枝毛霉成为真菌中研究 RNAi 生物学功能的模式菌株。2015 年, Nicolás 等通过转录组分析发现, 卷枝毛霉中约 700 个基因的表达受到 RNAi 途径调控^[43], 这些基因涉及信号转导、糖/脂代谢和能量产生等多种代谢途径。RNAi 缺失菌株的表型分析结果与转录组测

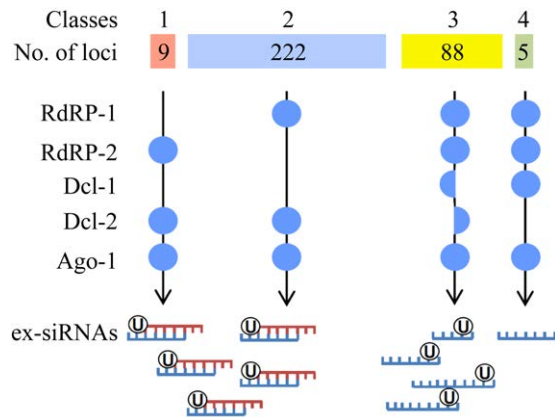


图1 卷枝毛霉中依赖 Dicer 的 ex-siRNAs 分类示意图^[38]

Figure 1 Proteins involved in the biogenesis of the four classes of Dicer-dependent ex-siRNAs in *M. circinelloides*.

序结果一致, 比如, *ago-1*、*dcl-2* 以及 *rdrp-2* 突变株均表现出了产孢量降低、自溶作用加快的表型(图 2A)^[44]。

除了经典的依赖 Dicer 的 RNAi 途径之外, 卷枝毛霉中还存在非经典的不依赖 Dicer 但依赖 RdRP 的 esRNAs 产生途径(即 NCRIP), 这类 esRNAs 被称作 rdRNAs (*rdrp*-dependent degraded RNAs) (图 2B)^[44]。rdRNAs 绝大部分起源于基因的外显子区, 与 mRNA 序列一致, 实际上是 mRNA 特异的降解产物, 其产生依赖于 RdRP1、RdRP2 以及 R3B2 新型核糖核酸酶 III 类似物^[22]。RdRP 突变导致 rdRNAs 表达量降低, 而对应的 mRNA 表达量升高。真核同源蛋白簇(eukaryotic

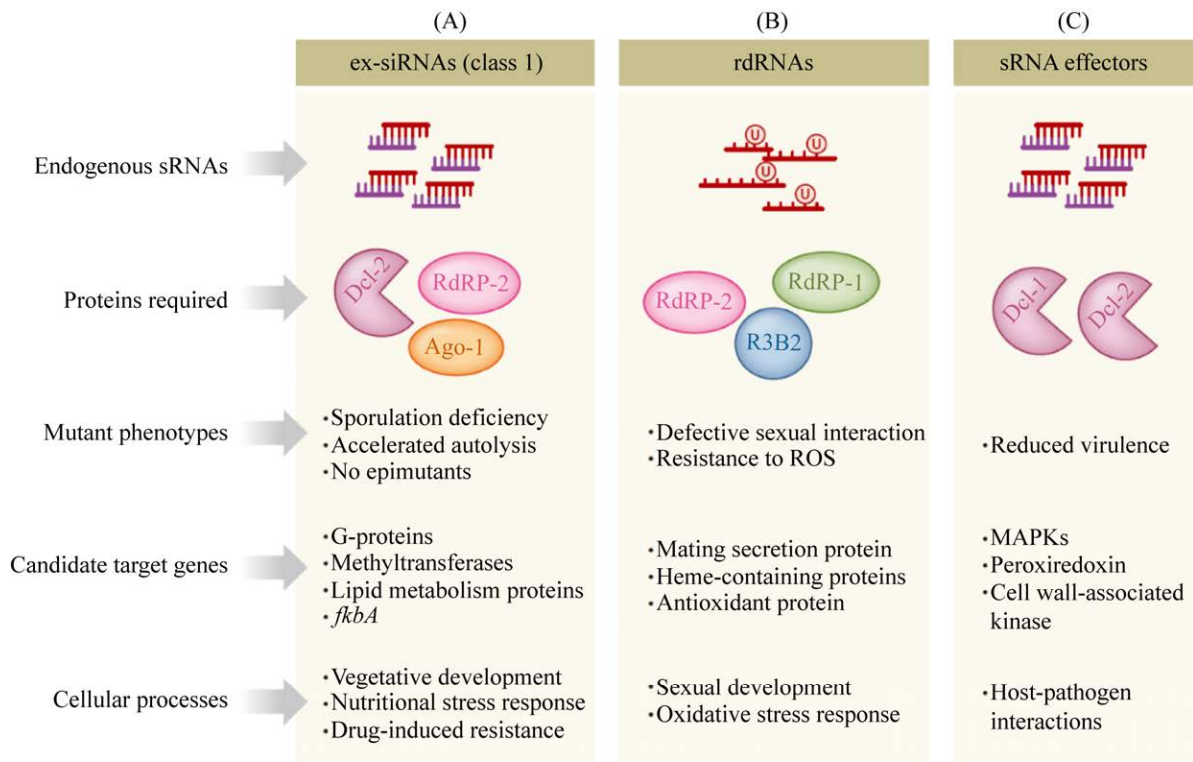


图2 卷枝毛霉和灰霉菌中 RNAi 机制及其生物学功能^[44]

Figure 2 Physiological processes regulated by RNAi pathway in *M. circinelloides* and *Botrytis cinerea*^[44]. A: *M. circinelloides* canonical ex-siRNAs (class 1) generated by RdRP-2, Dcl-2 and Ago-1 play important roles in vegetative development, nutritional stress response and drug-induced resistance. B: *M. circinelloides* rdRNAs produced by RdRP-1, RdRP-2 and R3B2 are vital for sexual development and oxidative stress response. C: cross-kingdom RNAi regulates virulence and host-pathogen interactions in *B. cinerea*.

orthologous group, KOG)分析结果表明 rdRNAs 富集的区域集中于辅酶运输与代谢、细胞骨架、离子转运、次级代谢产物合成等相关基因^[22], 充分说明卷枝毛霉 rdRNAs 参与调控多种细胞生命活动进程。最新研究发现, 卷枝毛霉基因组中 3 187 个基因(超过基因组的 25%)受到 NCRIP 途径的调控。在非压力条件下, NCRIP 途径抑制抗吞噬作用相关基因的表达, 但在面临巨噬细胞吞噬时, NCRIP 的抑制作用解除, 抗吞噬基因表达量显著提高, 进一步证明了卷枝毛霉的 RNAi 途径能够对环境信号做出应答^[23]。

此外, 在子囊菌深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)中, 起源于外显子的 esRNAs 也能够发挥调节功能。深绿木霉是一种常见于土壤和根系生态系统中的真菌, 能够引起植物防御反应并刺激植物生长^[45], 其基因组中编码 2 个 Dicer 蛋白(*dcr1-dcr2*), 3 个 Argonaute 蛋白(*ago1-ago3*)以及 3 个 RdRP 蛋白(*rdr1-rdr3*)。为了探究深绿木霉 RNAi 机制的生物学功能, Carreras-Villaseñor 等在深绿木霉中构建了多种 RNAi 缺陷菌株^[46], 并对缺陷菌株的表型和转录组进行深入分析。在光信号和机械损伤刺激下, 野生型深绿木霉会由营养生长转为无性生殖过程, 产生大量分生孢子。但在 $\Delta dcr2$ 、 $\Delta dcr1\Delta dcr2$ 及 $\Delta rdr3$ 突变株中, 光信号引发的分生孢子产生量显著降低。 $\Delta dcr2$ 、 $\Delta dcr1\Delta dcr2$ 突变株菌丝生长速率降低, 菌丝细胞结构发生改变。对 WT、 $\Delta dcr1$ 、 $\Delta dcr2$ 和 $\Delta dcr1\Delta dcr2$ 的转录组进行分析, 发现 Dicer 蛋白控制着发育或代谢等不同的生物学过程, 这可能是 Dicer 缺失菌株中产孢量降低的原因^[46]。此外, Dcr2 缺失菌株中 sRNAs 表达量变化与转录组差异表达数据相一致, 这些研究结果证明, 除了防御侵入性核酸之外, RNAi 途径及其产生的 sRNAs 通过调节基因表达在深绿木霉的生长和发育中

发挥重要作用。

除了参与真菌的无性生殖过程, RNAi 机制还参与了一些真菌的有性发育, 比如前文提到的粗糙脉孢霉。近年来的研究也证实了 RNAi 机制对真菌有性发育的影响。禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是小粒谷物赤霉病的主要病原菌, 该真菌通过有性孢子(子囊孢子)和无性孢子(分生孢子)繁殖。Son 等发现禾谷镰刀菌 FgDicer1 和 FgAgo2 蛋白通过产生 ex-siRNAs 调控子囊孢子形成, 而 FgDicer2 和 FgAgo1 主要参与发夹 RNA 诱导的 RNAi 途径^[47]。随后, Zeng 等确认禾谷镰刀菌在有性生殖期间也能够产生 miRNAs, FgDicer1 和 FgDicer2 能够利用 miRNAs 调控有性发育^[48]。灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)是研究高等担子菌发育过程的模式菌株。研究者在灰盖鬼伞中验证了 22 个新的 miRNAs, 靶基因预测发现灰盖鬼伞 miRNAs 能够调控子实体的发育过程^[49]。

4 介导异染色质组装

异染色质最初是用细胞学染色方法定义的, 指的是在整个细胞周期中保持浓缩外观的染色体区域。在细胞分裂间期, 常染色质呈伸展状态且被碱性染料着色较浅, 异染色质处于凝聚状态且被碱性染料着色较深。裂殖酵母 *S. pombe* 的染色体含有大量重复的 DNA 序列, 特别是在着丝粒上, 这些重复的 DNA 序列常被包装成异染色质。

早在 2002 年, Volpe 等发现当裂殖酵母的 RdRP、Dicer 及 Argonaute 等 RNAi 作用元件缺失后, 异染色质区域恢复转录, 细胞内异染色质 mRNA 水平提高, 且组蛋白 H3K9 甲基化丢失, 突变体在染色体分离中显示出缺陷, 这通常与异染色质组装中的缺陷有关^[50], 这一研究

结果提示 RNAi 机制影响着染色体的组装。RNA 介导染色体形成的标志是 RNAi 的介入和 H3K9 的甲基化。简单来说, siRNAs 和它们的 Argonaute 结合蛋白组装成 RNA 诱导的转录沉默复合体(RITS), 并在染色体互补区域指导染色体的遗传修饰和染色体的形成。通过对 RITS 复合物进行鉴定, 确定了 siRNAs 与染色体装配体之间的联系^[51]。染色体的形成需要 DNA 结合因子的帮助, 该 DNA 结合因子在裂殖酵母中是 otr (outermost)重复区域的重复序列。RITS 复合物由 Ago1、Chp1 和 Tas3 蛋白组成, 其中 Chp1 是包含染色质域的蛋白, 能够募集 RITS 复合物结合到 otr 重复序列, 激活的 Ago1 蛋白与 siRNAs 引导链相结合也增强了 RITS 对 otr 的结合能力。成熟的 RITS 复合物招募组蛋白甲基转移酶, 甲基化 H3K9, 从而激活 Swi6 蛋白, 染色质压缩形成染色体^[50,52], 从转录水平上抑制该区域基因的表达。除此之外, 裂殖酵母细胞内还检测到了起源于着丝粒区域的非编码 sRNAs, 并且 Rdp1 在着丝粒处富集^[50]。这些研究结果皆说明, 裂殖酵母染色体的形成与 RNAi 途径密切相关, RNAi 与染色体组装的交集将基因调控的两个领域结合在一起。

5 促进着丝粒进化

着丝粒是一个特殊的 DNA 位点, 它是组蛋白复合体(动粒)所必需的, 由串联重复的卫星 DNA 和转座子序列组成, 有助于真核生物中染色体的准确分离。着丝粒可以分为点着丝粒和区域着丝粒, 其中点着丝粒通常是小于 400 bp 的短 DNA 序列(如酿酒酵母), 区域着丝粒的范围从几千个碱基(如庞氏裂殖酵母)到几百万个碱基(如人和植物)不等。不同物种中着丝粒的功能具有绝对的保守性, 但着丝粒区域的 DNA 序

列在不同物种中的长度和碱基组成上相差较大, 呈现快速趋异进化的趋势。

前文提到, 裂殖酵母染色体的形成与 RNAi 途径密切相关, 而着丝粒是染色体形成的关键区域, 那么 RNAi 机制对于着丝粒结构和功能的维持是必不可少的吗? 研究表明, RNAi 关键基因缺失会导致着丝粒区域的染色体形成异常, H3K9 甲基化消失, 以及染色体错误分离^[53], 即裂殖酵母 RNAi 途径通过控制着丝粒区域转座子的表达来调节着丝粒功能。最新研究发现, 除了裂殖酵母之外, 在隐球菌和黑粉菌中也存在类似的机制。2018 年, Yadav 等对真菌界担子菌的着丝粒进化机制进行了研究^[54]。Yadav 团队选择了 3 种隐球菌作为研究对象, 其中新生隐球菌 H99 菌株和 JEC21 菌株含有完整的 RNAi 系统, 格特隐球菌(*Cryptococcus deuterogattii*) R265 菌株的 RNAi 系统丢失。利用保守的着丝粒蛋白 CENP-A 和 CENP-C 对隐球菌的着丝粒进行鉴定, 发现新生隐球菌和格特隐球菌着丝粒的位置、组成元件等没有显著差异, 但 R265 菌株中着丝粒的长度明显短于拥有 RNAi 系统的 H99 菌株和 JEC21 菌株, CHIP-seq 结果显示 R265 菌株 CENP-C 蛋白所结合的序列也较短。此外, RNAi 缺失的 R265 菌株在着丝粒区域丢失了全长的逆转录因子, 只残留了部分转座子序列, 而 RNAi 完整的 H99 菌株和 JEC21 菌株留有全长的逆转录因子, 且着丝粒区域的胞嘧啶伴随着甲基化修饰。当 H99 菌株和 JEC21 菌株的 RNAi 途径缺失时, 突变株在传代过程中也会偶尔出现着丝粒缩短的情况。进一步利用黑粉菌重复上述实验, 得到了类似结果。着丝粒区域转座子的驯化会导致功能区域或重复序列的产生, 从而促进着丝粒的进化^[55]。这一系列的研究结果表明, RNAi 和胞嘧啶 DNA 甲基化的丢失导致转座子跃迁

能力增强,着丝粒区域转座子缺失,从而导致了进化过程中着丝粒长度的缩短。RNAi 系统通过抑制着丝粒区域转座子的活性,促进转座子驯化,进而导致着丝粒结构和功能的快速进化。

6 调节耐药性与毒力

卷枝毛霉(*M. circinelloides*)对临床上常用的抗真菌药物常表现出耐药性,这使得毛霉菌病难以治愈且死亡率较高,深入了解真菌耐药性机制对于改善治疗至关重要。2014 年,Calo 等发现 RNAi 能够以表观遗传突变的方式引发卷枝毛霉对抗真菌药物 FK506 和雷帕霉素产生耐药性^[56]。该团队发现 RNAi 导致的表观突变株中携带针对 *fkba* 基因的反义小 RNA,可以触发 *fkba* mRNA 降解,从而阻止药物靶标 FKBP12 的产生。该过程需要多个经典的 RNAi 蛋白参加,包括 Dcl1、Dcl2、Ago1 和 RdRP2。Dcl2、Ago1 或者 RdRP2 缺失均会导致 *fkba* 沉默现象消失。有趣的是,NCRIP 途径的关键蛋白 R3B2 和 RdRP3 缺失均会提高表观遗传突变速率,促进了抗性菌株的产生,即 NCRIP 途径负调控依赖 RNAi 的表观突变过程^[57]。这些发现揭示了卷枝毛霉中固有的 RNAi 途径能够以可逆的方式抑制药物靶标的表达,从而调控真菌抗药性(图 2A)。另外,研究者们对另一种抗真菌药物 5-氟乳清酸(5-FOA)进行检测,同样筛选到了抗 5-FOA 的表观突变体。与 FK506 抗性突变株相似的是,5-FOA 抗性突变株中相关 sRNAs 的产生也是暂时的,在没有药物存在的环境中,表观突变体在传代过程中会逐渐恢复对 5-FOA 的敏感性^[58]。这些研究结果进一步证实,表观突变是一种普遍现象,它可以影响卷枝毛霉中的多个遗传位点,并诱导对多种抗真菌药物的耐药性。

显然,致病真菌耐药性的产生能够增强毒

力,促进其对宿主的感染,但 RNAi 对真菌毒力的影响不仅如此,还体现在其对致病真菌-宿主相互作用的调节方面。真菌的非编码 sRNAs 可以突破物种界限,跨界转运。转运到宿主细胞内的跨界 sRNAs 能够对靶标基因进行沉默,从而调节宿主的免疫反应,这种机制被称作跨界 RNA 干扰(cross-kingdom RNAi)。该机制在大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)等致病真菌中均有发现。大豆疫霉菌产生 2 种靶向宿主 RNAi 系统的效应蛋白,PSR1 和 PSR2,其中 PSR1 能够抑制宿主 miRNAs 和 siRNAs 的合成,PSR2 则特异性地打断 siRNAs 积累过程,从而减弱植物宿主的免疫应答反应,促进真菌自身感染^[59]。灰霉菌在感染过程中产生跨界 sRNAs 转运到宿主细胞内,这些跨界 sRNAs 与宿主 Argonaute 蛋白结合,劫持宿主的 RNAi 系统,沉默宿主免疫应答基因,比如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、氧化物酶、细胞壁相关的激酶等(图 2C),从而增强自身毒力。研究发现,拟南芥灰霉菌(*Arabidopsis thaliana* B. *cinerea*) RNAi 蛋白缺失会导致致病真菌毒力降低,但拟南芥 Ago1 蛋白缺失则会增强突变株对灰霉菌的抵抗力^[60]。此外,对于一些植物病原真菌,如胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[61],RNAi 蛋白缺失导致真菌刺穿叶片的能力显著降低,从而降低真菌致病性。

7 总结和展望

地球上真菌种类约 150 万种,是自然界第二大生物类群,这预示着真菌中的代谢通路和基因表达调控机制都较为复杂,比如有些真菌在进化过程中丢失了 RNAi 系统,而保留 RNAi 系统的真菌在典型的 RNAi 途径之外,还出现了非典型 RNAi 途径。自然界中的真菌会面临

各种环境压力,有效的能量代谢对其至关重要, RNAi 机制对真菌的作用是什么呢,这是促使我们开展相关研究的初衷。此外, RNAi 机制在不同物种中的进化历程,以及工业生产中 RNAi 是否能够发挥一定功能,这些也是值得探索的方向。尽管目前关于 RNAi 作用机制和生物学功能的研究已经取得了一些进展,但仍有许多问题有待解决。

(1) 首先,对于新型干扰性 sRNAs 的挖掘有待进一步深入。纵观 RNAi 研究领域, sRNAs 高通量测序是必不可少的一种研究手段。高通量测序结果中揭示了大量起源于转座子、外显子、内含子的 sRNAs,而起源于 rRNA 或 tRNA 的 sRNAs 通常会被当作随机降解片段而忽略,但少数研究发现线虫、小鼠以及人类细胞中部分 rDNA 起源的 sRNAs 受到 RNAi 途径调控^[62-64],具有特定的生物学功能,真菌的 RNAi 机制能否将 rRNA 或 rRNA 反义链加工为具有调节功能的 sRNAs,又是否参与调节真菌特定的生命活动,比如调节 rRNA 稳态,有待进一步验证。

(2) 此外,传统的高通量测序技术通常利用末端连接接头的方式对 sRNAs 进行反转录并测序,对于携带特殊修饰或者不具有 5'-P/3'-OH 的 sRNAs 来说,现有的接头连接方法很可能会略过特殊的 sRNAs 序列,使测序结果产生偏差,这无疑阻碍了研究者们对 RNAi 机制的全面探索。2021 年, Shi 等报道的 PANDORA-seq 通过联合酶处理的方式去除 RNA 修饰^[65],扩大了 sRNAs 测序的范围。实验方法的更新能够大大促进该领域的研究进展,未来的研究工作中应努力探索适用于真菌领域的 sRNAs 技术。

(3) 最后,真菌中分子生物学工具的匮乏也是限制该领域发展的一大原因,值得注意的是, CRISPR 技术是一项很好的尝试,目前在脉孢霉、曲霉、隐球菌、木霉等真菌中均已建立了

成熟的 CRISPR 系统^[66-68],有助于推动真菌领域 RNAi 生物学功能的研究进展。

参考文献

- [1] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811.
- [2] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric *Chalcone synthase* gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 1990, 2(4): 279–289.
- [3] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 1992, 6(22): 3343–3353.
- [4] Nolan T, Braccini L, Azzalin G, De Toni A, Macino G, Cogoni C. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(5): 1564–1573.
- [5] Shiu PKT, Raju NB, Zickler D, Metzenberg RL. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, 2001, 107(7): 905–916.
- [6] Hammond TM, Xiao H, Boone EC, Decker LM, Lee SA, Perdue TD, Pukkila PJ, Shiu PKT. Novel proteins required for meiotic silencing by unpaired DNA and siRNA generation in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 2013, 194(1): 91–100.
- [7] Wang YZ, Smith KM, Taylor JW, Freitag M, Stajich JE. Endogenous small RNA mediates meiotic silencing of a novel DNA transposon. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2015, 5(10): 1949–1960.
- [8] Wang XY, Hsueh YP, Li WJ, Floyd A, Skalsky R, Heitman J. Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. *Genes & Development*, 2010, 24(22): 2566–2582.
- [9] Wang XY, Wang P, Sun S, Darwiche S, Idnurm A, Heitman J. Transgene induced co-suppression during vegetative growth in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genetics*, 2012, 8(8): e1002885.
- [10] Jiang N, Yang YP, Janbon G, Pan J, Zhu XD. Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52734.

- [11] Dumesic PA, Natarajan P, Chen CB, Drinnenberg IA, Schiller BJ, Thompson J, Moresco JJ, Yates JR III, Bartel DP III, Madhani HD III. Stalled spliceosomes are a signal for RNAi-mediated genome defense. *Cell*, 2013, 152(5): 957–968.
- [12] Janbon G, Maeng S, Yang DH, Ko YJ, Jung KW, Moyrand F, Floyd A, Heitman J, Bahn YS. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(12): 1070–1080.
- [13] Burke JE, Longhurst AD, Natarajan P, Rao BD, Liu J, Sales-Lee J, Mortensen Y, Moresco JJ, Diedrich JK, Yates JR, Madhani HD. A non-dicer RNase III and four other novel factors required for RNAi-mediated transposon suppression in the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *G3: Bethesda, Md*, 2019, 9(7): 2235–2244.
- [14] Nakayashiki H, Ikeda K, Hashimoto Y, Tosa Y, Mayama S. Methylation is not the main force repressing the retrotransposon MAGGY in *Magnaporthe grisea*. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(6): 1278–1284.
- [15] Murata T, Kadotani N, Yamaguchi M, Tosa Y, Mayama S, Nakayashiki H. siRNA-dependent and -independent post-transcriptional co-suppression of the LTR-retrotransposon MAGGY in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(18): 5987–5994.
- [16] Nunes CC, Gowda M, Sailsbery J, Xue MF, Chen F, Brown DE, Oh Y, Mitchell TK, Dean RA. Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*, 2011, 12: 288.
- [17] Yamanaka S, Mehta S, Reyes-Turcu FE, Zhuang FL, Fuchs RT, Rong YK, Robb GB, Grewal SIS. RNAi triggered by specialized machinery silences developmental genes and retrotransposons. *Nature*, 2013, 493(7433): 557–560.
- [18] Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, Mower JP, Wolfe KH, Fink GR, Bartel DP. RNAi in budding yeast. *Science*, 2009, 326(5952): 544–550.
- [19] Sperschneider J, Jones AW, Nasim J, Xu B, Jacques S, Zhong CC, Upadhyaya NM, Mago R, Hu YH, Figueroa M, Singh KB, Stone EA, Schwessinger B, Wang MB, Taylor JM, Dodds PN. The stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* induces centromeric small RNAs during late infection that are associated with genome-wide DNA methylation. *BMC Biology*, 2021, 19(1): 1–25.
- [20] Nicolas FE, Moxon S, De Haro JP, Calo S, Grigoriev IV, Torres-Martínez S, Moulton V, Ruiz-Vázquez RM, Dalmay T. Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16): 5535–5541.
- [21] Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Panchal S, Nicolás FE, Mondo SJ, Ganguly P, Pangilinan J, Grigoriev IV, Heitman J, Sanyal K, Garre V. Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current Biology*, 2019, 29(22): 3791–3802.e6.
- [22] Trieu TA, Calo S, Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Dalmay T, Torres-Martínez S, Garre V, Ruiz-Vázquez RM. A non-canonical RNA silencing pathway promotes mRNA degradation in basal Fungi. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005168.
- [23] Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Murcia L, Navarro E, Garre V, Nicolás FE. A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales. *PLoS Genetics*, 2020, 16(7): e1008611.
- [24] Zambon RA, Vakharia VN, Wu LP. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(5): 880–889.
- [25] Zhou R, Rana TM. RNA-based mechanisms regulating host-virus interactions. *Immunological Reviews*, 2013, 253(1): 97–111.
- [26] Ding SW, Lu R. Virus-derived siRNAs and piRNAs in immunity and pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 2011, 1(6): 533–544.
- [27] Segers GC, Zhang XM, Deng FY, Sun QH, Nuss DL. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *PNAS*, 2007, 104(31): 12902–12906.
- [28] Zhang XM, Nuss DL. A host dicer is required for defective viral RNA production and recombinant virus vector RNA instability for a positive sense RNA virus. *PNAS*, 2008, 105(43): 16749–16754.
- [29] Sun QH, Choi GH, Nuss DL. A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. *PNAS*, 2009, 106(42): 17927–17932.
- [30] Hammond TM, Keller NP. RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases. *Genetics*, 2005, 169(2): 607–617.

- [31] Barton LM, Prade RA. Inducible RNA interference of *brlA* in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(11): 2004–2007.
- [32] Hammond TM, Bok JW, Andrews MD, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C, Keller NP. RNA silencing gene truncation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(2): 339–349.
- [33] Hammond TM, Andrews MD, Roossinck MJ, Keller NP. *Aspergillus* mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(2): 350–357.
- [34] Silvestri A, Turina M, Fiorilli V, Miozzi L, Venice F, Bonfante P, Lanfranco L. Different genetic sources contribute to the small RNA population in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 395.
- [35] Dang YK, Yang QY, Xue ZH, Liu Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10(9): 1148–1155.
- [36] Lee HC, Lia DL, Gu WF, Xue ZH, Crosthwaite SK, Pertsemliadis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC, Liu Y. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell*, 2010, 38(6): 803–814.
- [37] Chang SS, Zhang ZY, Liu Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 305–323.
- [38] Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. RNAi pathways in *Mucor*: a tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 90: 44–52.
- [39] Nicolás FE, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *The EMBO Journal*, 2003, 22(15): 3983–3991.
- [40] Lax C, Tahiri G, Patiño-Medina JA, Cánovas-Márquez JT, Pérez-Ruiz JA, Osorio-Concepción M, Navarro E, Calo S. The evolutionary significance of RNAi in the fungal kingdom. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9348.
- [41] Nicolás FE, De Haro JP, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(6): 504–516.
- [42] De Haro JP, Calo S, Cervantes M, Nicolás FE, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell*, 2009, 8(10): 1486–1497.
- [43] Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Cascales MD, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Garre V. The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 237.
- [44] Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. The RNAi universe in fungi: a varied landscape of small RNAs and biological functions. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71: 371–391.
- [45] Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(10): 749–759.
- [46] Carreras-Villaseñor N, Esquivel-Naranjo EU, Villalobos-Escobedo JM, Abreu-Goodger C, Herrera-Estrella A. The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Molecular Microbiology*, 2013, 89(1): 96–112.
- [47] Son H, Park AR, Lim JY, Shin C, Lee YW. Genome-wide exonic small interference RNA-mediated gene silencing regulates sexual reproduction in the homothallic fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Genetics*, 2017, 13(2): e1006595.
- [48] Zeng WP, Wang J, Wang Y, Lin J, Fu YP, Xie JT, Jiang DH, Chen T, Liu HQ, Cheng JS. Dicer-like proteins regulate sexual development via the biogenesis of perithecial-specific microRNAs in a plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 818.
- [49] Lau AYT, Cheng XJ, Cheng CK, Nong WY, Cheung MK, Chan RHF, Hui JHL, Kwan HS. Discovery of microRNA-like RNAs during early fruiting body development in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0198234.
- [50] Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 2002, 297(5588): 1833–1837.
- [51] Verdel A, Jia ST, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SIS, Moazed D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 2004, 303(5658): 672–676.

- [52] Yu R, Jih G, Iglesias N, Moazed D. Determinants of heterochromatic siRNA biogenesis and function. *Molecular Cell*, 2014, 53(2): 262–276.
- [53] Volpe T, Schramke V, Hamilton GL, White SA, Teng G, Martienssen RA, Allshire RC. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Research*, 2003, 11(2): 137–146.
- [54] Yadav V, Sun S, Billmyre RB, Thimmappa BC, Shea T, Lintner R, Bakkeren G, Cuomo CA, Heitman J, Sanyal K. RNAi is a critical determinant of centromere evolution in closely related fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(12): 3108–3113.
- [55] Gao DY, Jiang N, Wing RA, Jiang JM, Jackson SA. Transposons play an important role in the evolution and diversification of centromeres among closely related species. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 216.
- [56] Calo S, Shertz-Wall C, Lee SC, Bastidas RJ, Nicolás FE, Granek JA, Mieczkowski P, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Cardenas ME, Heitman J. Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature*, 2014, 513(7519): 555–558.
- [57] Calo S, Nicolás FE, Lee SC, Vila A, Cervantes M, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Cardenas ME, Heitman J. A non-canonical RNA degradation pathway suppresses RNAi-dependent epimutations in the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genetics*, 2017, 13(3): e1006686.
- [58] Chang Z, Blake Billmyre R, Lee SC, Heitman J. Broad antifungal resistance mediated by RNAi-dependent epimutation in the basal human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genetics*, 2019, 15(2): e1007957.
- [59] Qiao YL, Liu L, Xiong Q, Flores C, Wong J, Shi JX, Wang XB, Liu XG, Xiang QJ, Jiang SS, Zhang FC, Wang YC, Judelson HS, Chen XM, Ma WB. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nature Genetics*, 2013, 45(3): 330–333.
- [60] Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao HW, Zhang ZH, Kaloshian I, Huang HD, Jin HL. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 2013, 342(6154): 118–123.
- [61] Wang QN, An B, Hou XR, Guo YF, Luo HL, He CZ. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2621.
- [62] Wei HB, Zhou B, Zhang F, Tu YY, Hu YN, Zhang BG, Zhai QW. Profiling and identification of small rDNA-derived RNAs and their potential biological functions. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56842.
- [63] Zhou XF, Feng XZ, Mao H, Li M, Xu F, Hu K, Guang SH. RdRP-synthesized antisense ribosomal siRNAs silence pre-rRNA via the nuclear RNAi pathway. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(3): 258–269.
- [64] Wang Y, Weng CC, Chen XY, Zhou XF, Huang XY, Yan YH, Zhu CM. CDE-1 suppresses the production of rsiRNA by coupling polyuridylation and degradation of rRNA. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 115.
- [65] Shi JC, Zhang YF, Tan DM, Zhang XD, Yan MH, Zhang Y, Franklin R, Shahbazi M, Mackinlay K, Liu SC, Kuhle B, James ER, Zhang LW, Qu YC, Zhai QW, Zhao WX, Zhao LL, Zhou CC, Gu WF, Murn J, Guo JT, Carrell DT, Wang YS, Chen XM, Cairns BR, Yang XL, Schimmel P, Zernicka-Goetz M, Cheloufi S, Zhang Y, Zhou T, Chen Q. *Pandora*-seq expands the repertoire of regulatory small RNAs by overcoming RNA modifications. *Nature Cell Biology*, 2021, 23(4): 424–436.
- [66] Zhang P, Wang Y, Li CX, Ma XY, Ma L, Zhu XD. Simplified all-in-one CRISPR-Cas9 construction for efficient genome editing in *Cryptococcus* species. *Journal of Fungi*, 2021, 7(7): 505.
- [67] Matsu-Ura T, Baek M, Kwon J, Hong C. Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2015, 2: 4.
- [68] Schuster M, Kahmann R. CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 2019, 130: 43–53.

(本文责编 张晓丽)