

真菌小 RNA 的发生及其作用机制

梁丽琴^{1*} 杜海燕¹ 段江燕¹ 谢丙炎²

(1. 山西师范大学生命科学学院 山西 临汾 041004)

(2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室 北京 100081)

摘要: 小 RNA 是真核生物体内一种含量丰富的内源性非编码 RNA, 通过与其靶 mRNA 完全或非完全互补结合调控真核生物的基因表达。本文全面综述了真菌中已发现的小 RNA 种类、小 RNA 发生相关蛋白因子以及小 RNA 的具体作用机制, 为进一步研究小 RNA 对真菌生长发育的调控机制提供重要参考。

关键词: 真菌, 小 RNA, 发生蛋白, 作用机制

Research advance on the generation and mechanism of small RNAs in fungi

LIANG Li-Qin^{1*} DU Hai-Yan¹ DUAN Jiang-Yan¹ XIE Bing-Yan²

(1. College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China)

(2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Small RNAs are small, endogenous and non-coding RNAs and rich in eukaryotes, they regulate the gene expression through complete or non-complete complementary with the mRNA. In this review, we summarized the discovered classes of fungal small RNAs, protein factors biogenesis related with small RNAs, and provide a current analysis of the small RNAs mechanisms. This will provide the important reference for the scientists to further study the mechanisms of fungal small RNAs in growth and development.

Keywords: Fungi, Small RNA, Generation protein, Mechanism

小 RNA 是一种非编码的单链 RNA 分子, 大小一般在 20–40 nt 之间, 主要通过染色质修饰、转录后水平降解 mRNA 或抑制 mRNA 翻译来调控基因表达, 从而达到对真核生物的生长发育进行调控以

Foundation items: Natural Science Foundation of Shanxi Province (2015021137); Natural Science Foundation of Shanxi Normal University (ZR1518); Reform of Postgraduate Teaching Foundation of Shanxi Province (2017jg53); Biotechnology Advantage Profession of Shanxi Normal University (2017YSZY-01)

*Corresponding author: E-mail: liangliqin699@126.com

Received: September 27, 2017; **Accepted:** April 04, 2018; **Published online** (www.cnki.net): April 16, 2018

基金项目: 山西省自然科学基金(2015021137); 山西师范大学自然科学基金(ZR1518); 山西省研究生教改项目(2017jg53); 山西师范大学生物技术优势专业(2017YSZY-01)

*通信作者: E-mail: liangliqin699@126.com

收稿日期: 2017-09-27; 接受日期: 2018-04-04; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-16

抵御外来病毒入侵的目的。基于其重要性,小RNA的研究已成为当今生物学界的研究热点之一。哺乳动物中已有研究证明小RNA的发生与癌症密切相关,植物小RNA主要与适应逆境胁迫及抵御外来侵染物有关,病毒RNA主要与抵御宿主的防御相关。真菌在自然界中分布广泛,与人类的生产与生活密切相关,近年来,随着真菌基因组测序的不断增长及计算科学的发展,有关真菌小RNA的研究也取得了相应的进展。本文就目前真菌中已发现的小RNA种类、小RNA发生相关蛋白因子以及小RNA的具体作用机制进行全面综述,为进一步研究小RNA对真菌的生长发育提供参考。

1 真菌中已发现的小RNA种类

目前已研究的真菌中主要发现了8种类型的小RNA,研究者根据其前体合成分子及合成机制进行命名,分别为siRNA(包括vsiRNA)、miRNA、qiRNA、disiRNA、esRNA、tRF、CPA-sRNA和rasiRNA。

在真核生物中,最常见的两种小RNA为siRNA^[1]和miRNA^[2],它们最早是在线虫中被发现,之后在大量的植物及动物种类中相继被发现。近年来,在脉胞菌(*Neurospora crassa*)、致病疫霉(*Phytophthora infestans*)、稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)等少数真菌中也发现有siRNA的存在^[3],却未发现miRNA的存在,但在脉胞菌中却发现miRNA类似物的存在,由于其与动植物中的miRNA相似,因而得名miRNA(miRNA-like)^[4]。此外,在脉胞菌中还发现有qiRNA(QDE-2-interacting small RNA)^[5]及disiRNA(Dicer independent siRNA)^[4]。研究发现DNA的损伤会诱导QDE-1(DNA依赖的RNA聚合酶)以高度重复的rDNA位点为模板产生异常RNA(Aberrant RNAs, aRNAs),aRNAs又被Rdrps特异性地识别形成dsRNA,经Dicers剪切加工形成小的双链RNA。此外,DNA损伤还会诱导QDE-2(Argonaute)的表达,qiRNA通过与QDE-2互作进行转录后基因沉默^[5]。而disiRNA的产生则不需要

RNAi组分的参与,与动植物中的endo-siRNA(Endogenous small interfering RNAs)和natsiRNA(Natural antisense short interfering RNA)相似^[4]。

目前真菌小RNA的研究主要还是以脉胞菌为模式菌,除此之外,稻瘟菌及毛霉菌(*Mucor circinelloides*)中小RNA的研究也相对比较多。在稻瘟菌中,目前已发现的小RNA主要有tRFs(tRNA-derived RNA fragments)、esRNAs(Endogenous short RNAs)及CPA-sRNAs(5'-Methylguanosine-capped及-3'polyA small RNA)。tRFs是通过对稻瘟菌的高通量测序被发现,它起源于tRNA的5'或3'端,经反义密码环内部或与反义密码环接近的核糖核酸酶剪切形成了两部分,这两部分即为tRFs,另外的一些小片段可能是通过tRNA三叶草结构两臂的顶端暴露的核苷酸位点错误的核酸酶活性位点产生^[6-8]。在人类HeLa细胞中Dicer负责把tRNA^{Gln}加工成20 nt的tRFs,生长活体研究证实tRFs在生长和发育中发挥重要的作用^[9]。在稻瘟菌附着胞和孢子中的tRFs量相对于菌丝成比例地增加,说明tRFs在调节蛋白质合成过程中发挥重要作用,而菌丝组织的生长需要大量完整的tRNAs,这与附着胞和孢子中的情况正好相反^[8]。esRNAs由Dicer剪切产生,普遍存在于动植物及真菌中,但是其类型并不完全相同,Nicolas等^[10]研究证实esRNAs在稻瘟菌的生长表型发育中发挥重要的作用,在毛霉菌中由Dicer-2产生的esRNAs能定位于外显子上调节许多编码蛋白基因的表达。CPA-sRNAs与白色脉胞菌中的qiRNAs、miRNAs及disiRNAs没有相似性,其5'及3'端没有被修饰,推测其可能是由基因组或长的转录本经过一些非典型的RNA聚合酶如Pol IV(DNA-dependent RNA polymerase II的同源物)或Pol III加工所形成,必要时通过细胞质机制在5'末端加上甲基鸟苷,3'末端加上聚腺苷酸尾巴。大量的CPA-sRNAs能与rRNAs、tRNAs、snRNAs、转座元件及基因间隔区相匹配,主要与编码蛋白基因的起始处与终止处匹配,尤其是一些高表达的基

因, 诸如编码核糖体蛋白的基因, 具体可能是通过与转录激活区结合形成 RNA-DNA 杂合区, 从而对基因表达进行正向调节; CPA-sRNAs 也可能会促进转录因子和 RNA 聚合酶结合, 或作为 RNA 合成的引物; 另外, CPA-sRNAs 也有可能组织进一步的转录并促进 RNA 聚合酶的释放; 此外, 也有可能 CPA-sRNAs 仅仅是反映了无效的转录起始位点^[11]。

rasiRNA 即重复相关小 RNA (Repeat associated small interfering RNA), 数量较 miRNA 少得多, 其长度在不同物种中差异很大, 与 Dicer-dependent siRNA 或 miRNA 相似或长度稍长些。rasiRNA 最早被发现于果蝇(*Drosophila melanogaster*)和斑马鱼(*Brachydanio rerio*)的胚胎发育时期, 之后发现在果蝇的生殖系细胞中也有, 同 piRNA (Piwi interacting RNA)一样, rasiRNA 也与 Piwi 蛋白相结合, 可能在生殖细胞中沉默逆转录转座子和重复元件来调节果蝇生殖系的发育, 其沉默机制可能与 piRNA 的调节方式存在一定的关系^[12-14]。在植物中 Dicer-1 加工生成 21 nt 的 miRNAs 和 siRNAs, Dicer-3 加工生成 24 nt 的 rasiRNAs^[15]; 在黑腹果蝇(*D. melanogaster*)中 Dicer-1 加工产生 21 nt 的 miRNAs, Dicer-2 加工产生 21 nt 的 siRNAs, 而 24-27 nt 之间不同大小的 rasiRNAs 以及它们的产生机制还有待研究^[16-17]; 在单细胞的布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)^[18]及裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)^[12]中也证实有 rasiRNAs, rasiRNA 是否广泛存在于其它真菌中以及由哪种 Dicer 同源物产生还有待进一步的研究。

近年来, 随着小 RNA 测序技术的迅速发展, 不同真菌的小 RNA 数据将逐步被解析。测序表明, 寄生疫霉菌有大量的 25-26 nt 和少量 21 nt 小 RNA, 同时也累积一系列侵染阶段高度诱导表达的 29 nt 和 33 nt tRNA 来源的小 RNA。25-26 nt 小 RNA 和 21 nt 小 RNA 具有强烈的 5'碱基偏好性, 无链特异性地成簇分布在基因组上^[19]。

以上真菌中 8 种类型小 RNA 的大小、前体结构、结构特点、发生相关蛋白及作用机制具体见

表 1。真菌中除了这 8 种小 RNA 类型之外, 诸如小鼠中存在的 piRNA^[20]及线虫中存在的微小非编码 RNA (tncRNA)^[21]是否也存在于真菌中? 除此之外, 真菌中是否还存在有其它小 RNA 类型, 均有待于进一步研究。

2 小 RNA 发生相关蛋白

小 RNA 的发生及其作用机制是个复杂的过程, 不同物种及同一物种的不同小 RNA 的发生及作用机制均有差异。综合来看, 真菌小 RNA 发生相关蛋白主要有 Dicer、Argonaute 及 Rdrp。近年来, 研究者们通过基因敲除的方式对真菌中的这 3 类蛋白进行了功能研究, 取得了初步的研究进展。

2.1 Dicer

Dicer 是一种核酸内切酶, 属于 RNase III 家族, 主要负责切割双链 RNA 成为各类 21-25 nt 的小 RNA。目前发现真菌中仅含有 1-2 个 Dicer (植物中含有 4-7 个 Dicer), 且一些真菌的 2 个 Dicer 之间没有功能重复, 这说明真菌经过长期的进化, Dicer 的功能已逐渐整合并分工明确。研究发现, 粗糙链孢菌的 2 个 Dicer 蛋白在 RNA 沉默途径中有功能重复^[22]; 而在稻瘟病菌中 Dicer-1 及 Dicer-2 之间没有功能重复, 其中 Dicer-2 负责 siRNA 产生^[23], 二者之间的功能分化可能是由于转录抑制及蛋白质特异位引起^[24]; 毛霉菌的 2 个 Dicer 也没有功能重复, Dicer-1 控制菌丝生长^[25], Dicer-2 负责小 RNA 的产生; 在出芽酵母类中, 芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及病原菌白色念珠菌(*Candida albicans*)中的 Dicer 与其它真菌及高等真核生物中的 Dicer 结构相差极大, 典型的真菌 Dicer 包括有 2 个 RNase III 结构域, 而芽殖酵母及白色念珠菌的 Dicer 仅含有 1 个 RNase III 结构域, 但是 RNase III 的活性位点却很保守^[26], 下游与 dsRBD 结构域(Double stranded RNA binding domain)相邻, 此外下游 C 端还有 1 个 dsRBD 结构域^[27]。白色念珠菌的 Dicer 除了负责产生 siRNA 之外, 还与生长发育密切相关^[28]; 栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)中仅 Dicer-2

表 1 真菌中的内源小 RNA 类型

Table 1 Small RNA type in fungi

种类 Species	大小 Size (nt)	前体结构 Precursor structure	结构特点 Structural features	发生蛋白 Generation proteins	作用机制 Mechanism	真菌种类 Fungal species
siRNA	20–30	Long dsRNA, mRNA, heterochromatin region, transposons, virus DNA	5'-Monophosphates, 3'-Hydroxyl and overhangs two single-stranded nucleotides at their 3' ends	Dicer, Argonaute, Rdrp	Posttranscriptional gene silencing (PTGS), inhibiting protein translation, infecting chromatin structure, inhibiting transposon jumping, resisting the virus infection ^[8]	<i>Neurospora crassa</i> ^[3] , <i>Magnaporthe oryzae</i> ^[3] , <i>Phytophthora infestans</i> ^[3]
esRNA	Unknown	Transposons and intergenic regions	Varied	Dicer, Rdrp	Eliminating mRNA transcripts of the protein coding genes from which they are produced	<i>Magnaporthe oryzae</i> ^[10] , <i>Mucor circinelloides</i> ^[10]
rasiRNA	22–24	Antisense strand of long dsRNA	No hydroxyl at 2' and 3' end, and species diversity	Unknown	Participate in formatting and keeping the heterochromatin structure, controlling the transcription from repeat sequences	<i>Schizosaccharom yces pombe</i> ^[12]
disiRNA	Unknown	Overlapping sense and antisense transcripts	Have bias for 5' U	Independent of RNAi components	Unknown	<i>Neurospora crassa</i> ^[4]
miRNA	19–25	Specific hairpin structure	Have U at the 5' end	Dicer, QDE-2, QIP, RNaseIII domain-containing protein, MRPL3	Inhibiting protein translation or degrading transcripts	<i>Neurospora crassa</i> ^[4]
qiRNA	20–21	Highly repetitive rDNA loc	Have bias for 5' uridine	QDE-1, Dicer, Rdrp	Posttranscriptional gene silencing (PTGS)	<i>Neurospora crassa</i> ^[5]
tRFs	22, 27–40	5' end or 3' end of tRNA	Have phosphate group at 5' end and hydroxyl at 3' end	RNaseZ, Dicer	Regulating the synthesis of protein	<i>Mucor circinelloides</i> ^[6-8] , <i>Aspergillus fumigatus</i> ^[7]
CPA-sRNA	16–218, average size of 41	Genom or long transcript	Have methylation GMP at 5' end and polyadenyl acid tail at 3' end	Unknown	May be positive regulator of gene expression, or may be just an invalid transcription start site	<i>Mucor circinelloides</i> ^[11]

对抗病毒 RNA 沉默及 vsRNA 的产生是必需的, 而 Dicer-1 则并不重要^[29]; 在木霉菌 (*Trichoderma atroviride*) 中, Dicer-1 调控生殖发育, Dicer-1 和 Dicer-2 都调控营养生长, 但是每个 Dicer 控制不同的生物学过程, 如发育或代谢^[30], 具体的调控机制还有待进一步研究; 研究证明, 病原真菌灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 的 2 个 Dicer 被双敲除之后, 突变体由于不再能产生小 RNA 致使其对拟南芥和番茄的致病力降低, 另外拟南芥被敲除 Argonaute-1 之后对葡萄孢菌的敏感性降低, 从而推测葡萄孢菌在侵染拟南芥时, 分泌的小 RNA 通过与拟南芥体内小 RNA 竞争并劫持其 RNAi 机制, 借助宿主的 Argonaute-1 做为载体选择性沉默宿主的免疫基因,

此研究成果预示了植物与病原菌互作过程中, RNAi 机制可能在更高水平上进行互作调控^[31]。此项研究将小 RNA 与病原真菌的致病力相联系, 推进了小 RNA 研究从分子调控理论到实践生物防治的迈进; 分别将生防菌盾壳霉 (*Coniothyrium minitans*) 的 Dicer-1 和 Dicer-2 敲除后, 突变株的生长速度、寄生致腐核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 菌核能力均显著低于野生型菌株, 产孢量和产抗真菌物质抑制核盘菌菌丝生长的能力均显著高于野生型菌株, 其中 Dicer-2 对影响外来病毒在宿主体内的积累起到积极作用^[32]; 在禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 中, Dicer-2 对分生孢子的萌发和芽管的产生具有一定的功能, 并能影响毒素的合成^[33]; 作者对尖孢镰

刀菌(*Fusarium oxysporum*)的 2 个 Dicer 基因进行了单敲除及双敲除,结果表明尖孢镰刀菌的 2 个 Dicer 对菌丝的营养生长及发育繁殖均起到重要的调控作用^[34];金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)的 Dicer-1 和 Dicer-2 单、双敲除突变体的菌落形态、菌丝形态、生长速率与野生型菌株相比均没有显著差异,突变菌株对 NaCl、H₂O₂ 及 SDS 的敏感程度也无显著差异,说明 Dicer 缺失不会影响金龟子绿僵菌的抗逆性。但是,相比野生型,突变体的分生孢子产量和对大蜡螟的致病能力都有所降低,Dicer-2 突变体产孢相关基因上调幅度变窄,microRNA 表达水平下调较显著,这说明在金龟子绿僵菌中 microRNA 的生物起源可能依赖 Dicer-2^[35]。从已研究的真菌来看,真菌中的 Dicer 对小 RNA 的发生、生长发育及繁殖具有重要的调控作用,但是在不同的真菌中,Dicer 行使的具体生物学功能及 2 个 Dicer 之间的功能是否重复则有差异,因而还需要对不同的真菌展开具体深入的研究,并根据研究结果结合已有的真菌分类进行深入分析,探索 Dicer 与真菌的协同进化。

小 RNA 的重要性决定了其发生蛋白 Dicer 在生物体的生长发育、免疫及逆境胁迫中的重要作用。目前的研究主要还是通过观察与分析基因敲除前后的表型、转录组与小 RNA 的变化来确定 Dicer 基因功能。随着研究的不断深入,Dicer 基因的不

同表达量是否会有一些渐进表型? Dicer 基因的表达量是如何被上游物质所调控的? 这些都是将来要研究的内容。

2.2 Argonaute

Argonaute 蛋白(Ago)最早在拟南芥中被鉴定,之后发现其与 RNA 沉默有关^[36-37],Ago 主要是通过参与形成 RNA 诱导的沉默复合体来介导 RNA 沉默^[38-39],Höck 等^[40]和 Hutvagner 等^[41]将 AGO 确定为小 RNA 在生物体细胞中发挥沉默机制的必要组分。

真菌中 Ago 蛋白的研究相较于 Dicer 蛋白要滞后。研究发现,裂殖酵母中 Ago 参与 RNAi 途径,介导转录和转录后沉默,在着丝粒区的转录沉默中发挥作用,而且可引起交配型位点的异染色质发生沉默。RNA 诱导的沉默复合体(RITS, RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing)包括 Ago1、Chp1、Tas3 和着丝粒 siRNAs,为异染色质在着丝粒位点基因沉默所必需。裂殖酵母中存在一种 Ago 复合体(Argonaute siRNA 分子伴侣,ARC),除了含有 Ago1 之外,还包含 Arb1 及 Arb2 两个蛋白,它们均参与组蛋白 H3 Lys9 甲基化,异染色质装配及 siRNA 的产生(图 1)。然而,RITS 复合体中的 siRNA 大多都是单链,与 ARC 相关的 siRNA 大多都是双链,这说明 Arb1 及 Arb2 抑制了 siRNA 滞后链从 Ago1 上的释放。相反,纯化的 Arb1 在体外会抑制

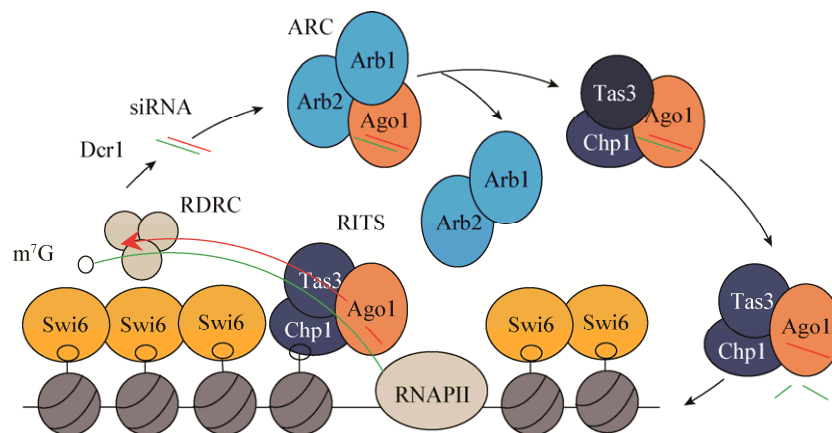


图 1 ARC 和 RITS 复合体的作用模式^[42]

Figure 1 Model for the roles of ARC and RITS complexes^[42]

Ago1 的剪切活性,而纯化的催化失活的 Ago1 仅包含双链 siRNA。这说明双链 siRNA 到单链 siRNA 的转换为异染色质的形成所必需,而 Arb 在此转换过程中发挥了重要作用^[42]。

在栗疫病菌中有 4 个 Ago,但仅有 Agl2 (Ago-like2)参与了病毒防卫反应,并激发 RNA 重组^[43],这说明 Argonaute 基因(*ago*)在 RNA 沉默抗病毒防卫反应及促使病毒 RNA 重组中具有关键性的作用,这也为病毒编码的 RNA 沉默抑制子抑制真菌中 RNA 沉默组分的转录诱导机制提供了证据;在白色念珠菌中仅有 1 个 *ago* 基因,与其它真菌及高等真核生物中 Argonaute 的结构相差极大,研究发现敲除 *ago* 后白色念珠菌的生长发育基本不受影响^[28];毛霉菌中有 3 个 *ago* 基因,其中只有 *ago-1* 参与了营养生长过程中的 RNAi,并参与了转基因诱导的 RNA 沉默及积累来自于外显子的各类内源 esRNAs 过程。I 型和 II 型 ex-siRNAs 结合到 Ago-1 上控制 mRNA 目标蛋白质编码基因的 mRNA 积累。III 型 ex-siRNAs 不会特异结合到 Ago-1 上,但是需要这种蛋白质作为它们的产物,这揭示了 ex-siRNAs 生物合成途径的复杂性。研究发现 *ago-1* 突变体的营养发育和营养压力诱导的自溶受到了影响,这表明 *ago-1* 参与了对环境信号的反应。此项研究结果说明仅有 1 个 Ago 蛋白通过不同的途径参与生产不同类型的 esRNAs,也凸显了 ex-siRNAs 对真菌内源基因的调节作用,扩大了 RNAi 所调控生物功能的范围^[44];将生防菌盾壳霉的 *ago* 敲除后,突变株的生长速度、寄生致病核盘菌核能力均显著低于野生型菌株。产孢量、产抗真菌物质抑制核盘菌菌丝生长的能力均显著高于野生型菌株,孢子萌发速率显著高于野生型菌株^[32];在禾谷镰刀菌中 Ago-2 参与芽管的延伸^[33];在尖孢镰刀菌中,Ago-1 与分生孢子形态发育相关,Ago-2 与菌丝发育有关,Ago-1 与 Ago-2 均抑制尖孢镰刀菌在生长早期产生分生孢子,促进菌丝的延伸生长^[34];金龟子绿僵菌的 Ago-1 和 Ago-2 同 Dicer 一样,与菌落形态、菌丝形态、生长速率及抗逆性没有明显相关性^[35];苹

果树腐烂病菌有 1 个 Ago 蛋白,与粗糙脉孢菌和构巢曲霉的 Ago 蛋白具有高度的同源性,Ago-1 和 Ago-3 对菌落、菌丝形态、菌落生长速率及对盐离子胁迫的响应没有明显影响,而 Ago-3 参与病菌对 pH、H₂O₂ 胁迫的响应及致病力^[45]。

综上所述,Ago 蛋白作为 RNA 沉默的必要组分,在生物体的生长发育过程中发挥重要的调控作用,但就目前的研究结果来看,生物体缺少 Ago 蛋白后,除了尖孢镰刀菌外,还未观察到具体的生长表型变化,这可能是由于 Ago 数量较多,彼此之间存在着功能互补现象,从而导致敲除一个 *ago* 后另外一个 *ago* 互补所致,即使是某一个 *ago* 在起重要作用,也有可能敲除之后,其它 *ago* 会适应细胞生长需求而弥补其功能缺陷。真菌中 Ago 蛋白的研究还处于起步阶段,Ago 蛋白的具体生物学功能及其在不同真菌中的功能分化还有待于进一步研究。

2.3 Rdrp 蛋白(RNA dependent RNA polymerase)

Rdrp 是一种 RNA 聚合酶,它能依赖于 RNA 为模板合成互补链 RNA 分子,是 RNAi 的主要信号扩增分子。Rdrp 主要分为两种,一种是在病毒中用于复制病毒基因组,一种是存在于真核生物中参与形成 RNA 沉默过程中涉及到的双链 RNA。最早在番茄中分离到具有活性的 Rdrp^[46],之后研究者在脉孢菌中发现 RNA 沉默需要有 QDE-1 (Rdrp-6)组分的参与,此 QDE-1 与番茄中的 *Rdrp* 基因序列相似,由 1 402 个氨基酸组成,分子量为 158 004 Da,没有信号肽及跨膜区域,属于胞内蛋白,亲水性图说明 QDE-1 是可溶性蛋白^[47],进一步研究证实 QDE-1 蛋白具有 Rdrp 活性^[48],其晶体结构如图 2 所示,这也是目前唯一的一个已观察到晶体结构的 *Rdrp* 基因^[49]。在粟酒裂殖酵母中有一个 *Rdrp* 基因,它表达的 Rdrp 参与了裂殖酵母的着丝粒功能^[13]及异染色质的形成和维护^[50];毛霉菌中 Rdrp-1 负责正向转基因诱导的沉默产生 dsRNA 分子^[10],但是对二级 siRNAs 的产生并无明显作用,Rdrp-2 可能通过控制二级 siRNA 的产生负责有效 dsRNA 及正向转基因诱导的沉默^[51];在木霉菌中,Rdrp-3 调控生

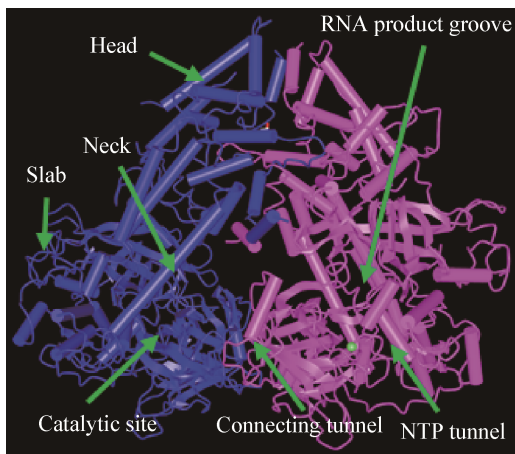


图 2 QDE-1 的晶体结构^[49]

Figure 2 Crystal structure of QDE-1^[49]

Note: The picture was quoted from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2J7O>

殖发育^[30]; 在尖孢镰刀菌中, Rdrp-2 及 Rdrp-3 与分生孢子的形态发生及繁殖方式相关^[34]。

对动植物及真菌中的 161 个 *rdrp* 基因进行进化分析, 推测原始真核细胞仅有 3 种 Rdrp, 之后在进化过程中逐渐分化。Rdrp β (动物和真菌 Rdrp-3) 及 Rdrp α (植物 Rdrp-3 和真菌 Rdrp-6) 之间几乎没有同源性, 说明它们在进化过程中可能发生了功能分化^[52]。

Rdrp 在真核生物的 RNA 沉默中发挥级联扩大效应的作用, 此外与 DNA 复制之间也存在着一定的联系, 今后还需要对多种真菌中的 Rdrp 功能进行广泛且深入的探讨, 为系统解析 Rdrp 在真菌以及真核生物中发挥的作用奠定理论基础。

此外, 真核生物中还有一些与 RNA 沉默相关的作用组分, 如 Exportin-5, 它主要负责将 pre-miRNAs 从细胞核转运到细胞质中^[53]; QIP (QDE-2-interacting protein) 是脉胞菌中发现的一种核酸外切酶, 它主要负责特异性剪切与降解 siRNA 中的随从链^[54]; C3PO 是果蝇中的一种核酸外切酶^[55]; HEN1 与拟南芥中 miRNA 的甲基化及果蝇中的 piRNA 的甲基化相关^[56-57]; RITS 复合物能够与 RDRC (RNA-directed RNA polymerase complex) 及 ARC (Argonaute siRNA) 互作去沉默异染色质 RNA 的转录^[42,57-58]。这些组分是否也存在于真菌中或有

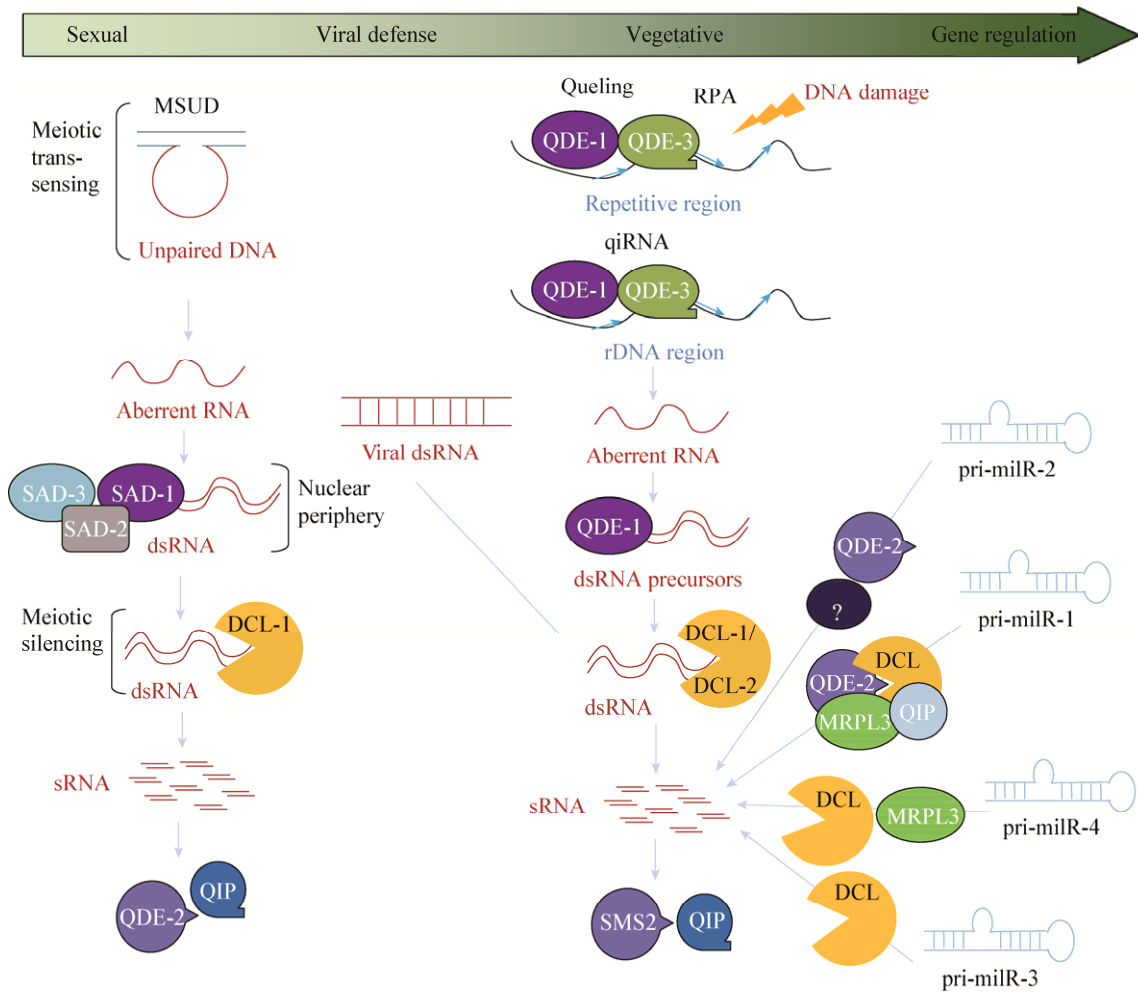
其它相应组分的存在还有待进一步发现。

3 真菌小 RNA 的生成及其作用机制

目前, 真菌中脉胞菌的小 RNA 生成及其作用机制的研究相对成熟, 已初步得到阐明的路径主要有 4 种(图 3): siRNA、qiRNA 的生成及其介导的抑制现象; miRNA 的生成及其介导的基因表达调控机制; 减数分裂沉默抑制; 外源双链 RNA 诱发的真菌 RNAi 防卫机制^[59]。

在营养生长阶段, 重复的转座子及核糖体 DNA 位点能够通过 QDE-1 和 QDE-3 产生异常的 aRNAs, 单链的 aRNAs 被 QDE-1 转换成 dsRNA 前体, Dicer 在 ATP 作用下将 dsRNA 解旋, 并切割成 5' 端为磷酸基、3' 端为羟基, 还有 2 nt 突出的双链 siRNA。siRNA 在胞内 RNA 解旋酶的作用下解链成正义链及反义链, 正义链与 mRNA 发生交换, 反义链与 RISC (含有 QDE-2/QIP) 结合并激活 RISC, 通过碱基配对定位于同源 mRNA 转录本上, 然后由核酸内切酶在距离 siRNA 3' 端 12 bp 的位置切割 mRNA, 随后 mRNA 迅速降解, 并诱发宿主细胞对这些 mRNA 进行降解。siRNA 不仅能引导 RISC 切割同源单链 mRNA, 而且可作为引物与靶 RNA 结合并在 Rdrp 作用下通过类似 PCR 扩增合成更多新的 dsRNA, 新合成的 dsRNA 再由 Dicer 切割产生大量的次级 siRNA, 从而使 RNAi 的作用进一步放大, 最终将靶 mRNA 完全降解^[59]。

针对 Rdrp 如何识别 aRNAs 的问题, Nolan 等^[60]以脉胞菌为研究材料, 发现 Rdrp (QDE-1) 能与 DNA 复制机制中的元件复制蛋白 A (RPA) 互作, QDE-1 与 RPA 都是核内蛋白, QDE-1 能被特异结合到重复转基因座位点, 并推测 QDE 的此定位点能以转基因座初始转录本为模板原位产生 dsRNA。这 2 个蛋白之间有相关性的支持证据是 siRNAs (沉默的标志) 的积累依赖于连续的 DNA 合成。QDE-1 与 RPA 之间的互作对于进一步研究与理解 Rdrp 的特异性很重要, 并第一次将 PTGs 组分与 DNA 复制机制相联系。

图3 脉胞菌中的RNA沉默路径^[59]Figure 3 Models for RNAi-related pathways in *Neurospora*^[59]

真菌中的 miRNA 同动植物的 miRNA 一样，主要是对基因表达进行调控。脉胞菌中 miRNA 由 4 种不同的途径合成，每种途径所需要的蛋白元件不同，主要有 Dicers、QDE-2、QIP、含有 RNase III 结构域的蛋白及 MRPL3。这 4 种 miRNA 中，只有 miR-3 的形成机制与植物相似，仅需要 Dicer 就可以把 pre-miRNA 形成 miRNA。miR-4 的形成仅部分依赖于 Dicers，另外还需要有其它的核酸酶。miR-1 在脉胞菌基因组中的产生位点最多，需要有 Dicers、QDE-2 以及有催化活性的 QIP，首先，Dicer 将初级 pri-miR-1 加工成 pre-miR-1，然后，QDE-2 结合到 pre-miR-1 上，在 QIP 的作用下将 pre-miR-1 加工成成熟的 miR-1，QDE-2 在这里起到了一个加

工平台的作用。miR-2 的形成完全不依赖于 Dicers，而是需要有催化活性的 QDE-2^[59]。miR-2 的生物合成途径是一个不依赖 Dicer 而依赖 Ago 合成 sRNA 的典型机制，在斑马鱼和小鼠中 miR-451 也由同样的机制产生^[61-62]，说明此机制是一个保守的 sRNA 生物合成途径，更说明了真核生物 miRNAs 形成的进化多样性。

减数分裂沉默(Meiotic silencing by unpaired DNA, MSUD)现象最初是在研究脉胞菌中 *Ascospore maturation 1 gene (asm-1)* 时发现^[63-65]，MSUD 发生在减数分裂的前期 I 阶段，由于基因缺失、复制、转座等引起同源基因未配对从而发生 MSUD，MSUD 相关蛋白主要有 6 种，分别是：SAD-1

(Suppressor of ascus dominance 1), 一种 Rdrp; DCL-1, 一种 Dicer-like RNase III 酶; SMS-2 (Suppressor of meiotic silencing 2), 一种 Argonaute 家族蛋白同源物; SAD-2, 能够使 SAD-1 正确定位于细胞核周围; QIP, 一种核酸外切酶, 它们存在于细胞核周围; SAD-3, 推断是一种解螺旋酶, MSUD 及产生有性孢子所必需, SAD-3 的直系同源物包括粟酒裂殖酵母中的 Hrr1, RNAi 诱导的异染色质形成所必需的一种解螺旋酶。SAD-3 与 Hrr1 都能与 RNA 介导的 RNA 聚合酶及 Argonaute 交互, 这说明在这两种真菌中沉默复合体形成的特定方面是保守的^[66]。MSUD 负责将未配对片段形成单链异常 RNA, 这个 RNA 被转运到细胞核周围后, 作为 SAD-1 介导的双链 RNA 合成模板形成双链 RNA, 然后 DCL-1 剪切 dsRNA 为 siRNA, siRNA 指导 SMS-2 去识别并剪切与自身完全互补的 mRNA, 在此过程中, SAD-2 及 SAD-3 可与 SAD-1 交互, 并帮助转运到细胞核周围, 而 QIP 作为一种外切酶移去 siRNA 双链中的滞后链^[67-72]。

稻瘟菌中 RNA 沉默机制主要有 Dicer 依赖的 RNAi 途径以及 Dicer 非依赖的 RNAi 途径, 其作用不仅局限于防御外来核酸片段的入侵, 并通过产生内源小 RNA 调控基因表达, 从而参与调控特殊的生理及发育过程来应对外界环境信号^[73]。

除了稻瘟病菌外, 研究发现在脉胞菌、粟疫病菌及构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中存在着与植物类似的抗病毒机制, 当外源病毒 RNA 侵入真菌体内时, 会诱导真菌通过 RNA 沉默激发免疫机制^[29,44]。近年来, 研究发现在植物与病原真菌互作过程中, 小 RNA 作为密使发挥着重要作用。一方面, 宿主诱导的基因沉默机制(Host induced gene silencing, HIGS)会影响丝状真菌的基因表达; 另一方面, 真菌诱导的基因沉默机制 Filamentous organism-induced gene silencing, FIGS)会影响宿主的防卫基因表达^[74]。

4 展望

小 RNA 在真核生物中发挥着重要作用, 除了目前发现的 8 种小 RNA 之外, 是否还存在其它小

RNA? 如 piRNA、tncRNA 等还有待进一步研究。另外, 目前仅得到了小 RNA 对真菌的生长发育具有调控作用的初步结果, 而有关具体的调控机制还有待深入研究, 其中涉及到小 RNA 的具体作用机制, 与小 RNA 作用相关的各种蛋白因子的表达、结构与功能及其进化机制^[75], 小 RNA 与信号转导之间的联系, 小 RNA 与病原菌致病性的相关性, 这些都还有待于进一步深入的研究。随着计算科学、生物信息学以及生物技术的全面快速发展, 生物学研究已进入了全基因组时代, 相信在不久的将来, 小 RNA 对真菌的调控机制将逐步被阐明, 而随着不同真菌中小 RNA 沉默机制的阐明, 以 RNA 沉默机制类型为分类依据对植物病原真菌进行遗传学分类也不无可能, 这将为人类从更高水平了解不同真菌之间的进化关系, 甚至真菌与动物和植物之间的进化关系提供理论依据。

REFERENCES

- [1] Hannon GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854
- [3] Nakayashiki H. RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications[J]. FEBS Letters, 2005, 579(26): 5950-5957
- [4] Lee HC, Li LD, Gu WF, et al. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi[J]. Molecular Cell, 2010, 38(6): 803-814
- [5] Lee HC, Chang SS, Choudhary S, et al. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage[J]. Nature, 2009, 459(7244): 274-277
- [6] Kawaji H, Nakamura M, Takahashi Y, et al. Hidden layers of human small RNAs[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 157
- [7] Jöchl C, Rederstorff M, Hertel J, et al. Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(8): 2677-2689
- [8] Cole C, Sobala A, Lu C, et al. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs[J]. RNA, 2009, 15(12): 2147-2160
- [9] Nunes CC, Gowda M, Sailsbery J, et al. Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 288
- [10] Nicolas FE, Moxon S, de Haro JP, et al. Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(16): 5535-5541
- [11] Gowda M, Nunes CC, Sailsbery J, et al. Genome-wide characterization of methylguanosine-capped and polyadenylated

- small RNAs in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(21): 7558-7569
- [12] Reinhart BJ, Bartel DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats[J]. Science, 2002, 297(5588): 1831
- [13] Volpe TA, Kidner C, Hall IM, et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi[J]. Science, 2002, 297(5588): 1833-1837
- [14] Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcinet A, et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development[J]. Developmental Cell, 2003, 5(2): 337-350
- [15] Xie ZX, Johansen LK, Gustafson AM, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants[J]. PLoS Biology, 2004, 2(5): E104
- [16] Lee YS, Nakahara K, Pham JW, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways[J]. Cell, 2004, 117(1): 69-81
- [17] Pham JW, Pellino JL, Lee YS, et al. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*[J]. Cell, 2004, 117(1): 83-94
- [18] Djikeng A, Shi H, Tschudi C, et al. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs[J]. RNA, 2001, 7(11): 1522-1530
- [19] Jia JB. Diversity of small RNAs and their potential roles in the regulation of gene expression in *Phytophthora parasitica*[D]. Yangling: Doctoral dissertation of Northwest Agriculture & Forestry University, 2017 (in Chinese)
贾津布. 寄生疫霉菌小 RNA 多样性及其参与基因表达调控的探索研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2017
- [20] Lau NC, Seto AG, Kim J, et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes[J]. Science, 2006, 313(5785): 363-367
- [21] Ambros V, Lee RC, Lavanway A, et al. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*[J]. Current Biology, 2003, 13(10): 807-818
- [22] Catalanotto C, Pallotta M, ReFalo P, et al. Redundancy of the two Dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*[J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24(6): 2536-2545
- [23] Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y, et al. One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(43): 44467-44474
- [24] Kadotani N, Murata T, Quoc NB, et al. Transcriptional control and protein specialization have roles in the functional diversification of two dicer-like proteins in *Magnaporthe oryzae*[J]. Genetics, 2008, 180(2): 1245-1249
- [25] Nicolás FE, de Haro JP, Torres-Martínez S, et al. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(6): 504-516
- [26] Weinberg DE, Nakanishi K, Patel DJ, et al. The inside-out mechanism of Dicers from budding yeasts[J]. Cell, 2011, 146(2): 262-276
- [27] Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, et al. RNAi in budding yeast[J]. Science, 2009, 326(5952): 544-550
- [28] Bernstein DA, Vyas VK, Weinberg DE, et al. *Candida albicans* Dicer (CaDcr1) is required for efficient ribosomal and spliceosomal RNA maturation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(2): 523-528
- [29] Segers GC, Zhang XM, Deng FY, et al. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(31): 12902-12906
- [30] Carreras-Villaseñor N, Esquivel-Naranjo EU, Villalobos-Escobedo JM, et al. The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*[J]. Molecular Microbiology, 2013, 89(1): 96-112
- [31] Weiberg A, Wang M, Lin FM, et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways[J]. Science, 2013, 342(6154): 118-123
- [32] Zeng LS. Functional analysis of genes of small RNA pathways in *Coniothyrium minitans*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agriculture University, 2012 (in Chinese)
曾丽斯. 盾壳霉小 RNA 相关通路基因的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2012
- [33] Wang Y. Functional analysis of genes associated with small RNA pathways in *Fusarium graminearum*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agriculture University, 2013 (in Chinese)
王颖. 禾谷镰刀菌小 RNA 通路相关基因的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013
- [34] Liang LQ. Characterization of small RNAs biogenesis related genes *Dicer*, *Argonaute* and *Rdrp* in *Fusarium oxysporum*[D]. Beijing: Doctoral dissertation of China Agriculture University, 2014 (in Chinese)
梁丽琴. 尖孢镰刀菌小 RNA 发生相关 *Dicer*, *Argonaute* 和 *Rdrp* 基因功能研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2014
- [35] Meng HM, Wang ZX, Wang YL, et al. Characterization of small RNAs biogenesis related genes *Dicer*, *Argonaute* and *Rdrp* in *Metarhizium anisopliae*[A]//2015 Academic Conference Paper Abstract Book of Chinese Institute Of Fungi (CBC)[C]. Beijing, 2015 (in Chinese)
孟慧敏, 汪章勋, 王玉龙, 等. 金龟子绿僵菌小 RNA 通路相关 *Dicer*, *Argonaute* 基因的功能研究[A]//中国菌物学会 2015 年学术年会论文摘要集[C]. 北京, 2015
- [36] Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing[J]. Cell, 2001, 106(1): 23-34
- [37] Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*[J]. Cell, 1999, 99(2): 123-132
- [38] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. Nature, 2000, 404(6775): 293-296
- [39] Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, et al. Argonaute2, a link between genetic and Biochemical analyses of RNAi[J]. Science, 2001, 293(5532): 1146-1150
- [40] Höck J, Meister G. The Argonaute protein family[J]. Genome Biology, 2008, 9(2): 210
- [41] Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(1): 22-32

- [42] Buker SM, Iida T, Bühler M, et al. Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14(3): 200-207
- [43] Sun Q, Choi GH, Nuss DL. A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(42): 17927-17932
- [44] Cervantes M, Vila A, Nicolás FE, et al. A single *Argonaute* gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69283
- [45] Feng H, Liu YY, Dong RQ, et al. Preliminary function analysis of Argonaute genes from *Valsa mali*[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2016, 39(4): 57-62 (in Chinese)
冯浩, 刘洋洋, 董茹青, 等. 苹果树腐烂病菌 Argonaute 基因鉴定及功能初步分析[J]. *河北农业大学学报*, 2016, 39(4): 57-62
- [46] Schiebel W, Pélissier T, Riedel L, et al. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(12): 2087-2101
- [47] Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase[J]. *Nature*, 1999, 399(6732): 166-169
- [48] Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RHA. The genetics of RNA silencing[J]. *Annual Review of Genetics*, 2002, 36(1): 489-519
- [49] Salgado PS, Koivunen MRL, Makeyev EV, et al. The structure of an RNAi polymerase links RNA silencing and transcription[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(12): e434
- [50] Sugiyama T, Cam H, Verdel A, et al. RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(1): 152-157
- [51] Calo S, Nicolás FE, Vila A, et al. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(2): 379-394
- [52] Zong J, Yao X, Yin JY, et al. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups[J]. *Gene*, 2009, 447(1): 29-39
- [53] Yi R, Qin Y, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(24): 3011-3016
- [54] Maiti M, Lee HC, Liu Y. QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(5): 590-600
- [55] Liu Y, Ye XC, Jiang F, et al. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation[J]. *Science*, 2009, 325(5941): 750-753
- [56] Yu B, Yang ZY, Li JJ, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis[J]. *Science*, 2005, 307(5711): 932-935
- [57] Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, et al. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(13): 1603-1608
- [58] Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, et al. Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs[J]. *Cell*, 2004, 119(6): 789-802
- [59] Chang SS, Zhang ZY, Liu Y. RNA interference pathways in fungi: Mechanisms and functions[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66(1): 305-323
- [60] Nolan T, Cecere G, Mancone C, et al. The RNA-dependent RNA polymerase essential for post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa* interacts with replication protein A[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(2): 532-538
- [61] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, et al. A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis[J]. *Nature*, 2010, 465(7298): 584-589
- [62] Cifuentes D, Xue HL, Taylor DW, et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity[J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1694-1698
- [63] Aramayo R, Metzberg RL. Meiotic transvection in fungi[J]. *Cell*, 1996, 86(1): 103-113
- [64] Shiu PKT, Metzberg RL. Meiotic silencing by unpaired DNA: properties, regulation and suppression[J]. *Genetics*, 2002, 161(14): 1483-1495
- [65] Shiu PKT, Raju NB, Zickler D, et al. Meiotic silencing by unpaired DNA[J]. *Cell*, 2001, 107(7): 905-916
- [66] Hammond TM, Xiao H, Boone EC, et al. SAD-3, a putative helicase required for meiotic silencing by unpaired DNA, interacts with other components of the silencing machinery[J]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2011, 1(5): 369-376
- [67] Alexander WG, Raju NB, Xiao H, et al. DCL-1 colocalizes with other components of the MSUD machinery and is required for silencing[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(5): 719-727
- [68] Shiu PKT, Zickler TD, Raju NB, et al. SAD-2 is required for meiotic silencing by unpaired DNA and perinuclear localization of SAD-1 RNA-directed RNA polymerase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(7): 2243-2248
- [69] Lee DW, Pratt RJ, McLaughlin M, et al. An argonaute-like protein is required for meiotic silencing[J]. *Genetics*, 2003, 164(2): 821-828
- [70] Xiao H, Alexander WG, Hammond TM, et al. QIP, a protein that converts duplex siRNA into single strands, is required for meiotic silencing by unpaired DNA[J]. *Genetics*, 2010, 186(1): 119-126
- [71] Lee DW, Millimaki R, Aramayo R. QIP, a component of the vegetative RNA silencing pathway, is essential for meiosis and suppresses meiotic silencing in *Neurospora crassa*[J]. *Genetics*, 2010, 186(1): 127-133
- [72] Kelly WG, Aramayo R. Meiotic silencing and the epigenetics of sex[J]. *Chromosome Research*, 2007, 15(5): 633-651
- [73] Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. RNAi pathways in *Mucor*: A tale of proteins, small RNAs and functional diversity[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 90: 44-52
- [74] Weiberg A, Jin HL. Small RNAs-the secret agents in the plant-pathogen interactions[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 26: 87-94
- [75] Chand SK, Nanda S, Mishra R, et al. Multiple garlic (*Allium sativum* L.) microRNAs regulate the immunity against the basal rot fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*[J]. *Plant Science*, 2017, 257: 9-21