

丝状真菌中的 RNA 干扰及其应用技术

王绍文^{1,2} 刘刚¹ 邢苗^{1,2} 田生礼¹

(¹深圳大学生命科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室 深圳 518060;

²华南农业大学生命科学学院 广州 510642)

摘要: RNA 干扰是真核生物中相对保守的一种基因转录后表达调控机制,它通过双链 RNA 介导细胞内 mRNA 发生特异性降解或翻译抑制,从而调控靶基因的表达。对丝状真菌中 RNA 压制和减数分裂沉默等现象的研究表明,与动、植物一样,丝状真菌中也存在 RNA 干扰现象。通过对 RNA 压制缺失突变株和减数分裂沉默缺失突变株的一系列分子生物学研究,获得了与之密切相关的一系列蛋白,而这些蛋白在结构和功能上与动、植物 RNA 干扰途径的蛋白高度相似,这些结果证明了丝状真菌中的 RNA 存在干扰现象。RNA 干扰技术作为丝状真菌分子生物学研究或遗传改造的工具具有特殊的意义,因为丝状真菌具有多核和发生非同源重组频率高的特点,难以用基因敲除手段进行改造。系统地介绍丝状真菌中的 RNA 干扰途径以及使用 RNA 干扰对真菌进行遗传改造的方法。

关键词: RNA 干扰 RNA 压制 减数分裂沉默 siRNA 丝状真菌

Advances in Filamentous Fungal RNA Interference and Its Application Technology

Wang Shaowen^{1,2} Liu Gang¹ Xing Miao^{1,2} Tian Shengli¹

(¹Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060;

²College of Life Sciences, South China Agriculture University, Guangzhou 510642)

Abstract: RNA interference is a relative conserved mechanism for post-transcriptional regulation of gene expression in eukaryotes. It regulates the expression of target genes through specific degradation or post-transcriptional gene silencing mediated by double stranded RNA. Besides animal or plant cells, RNA interference also has been found in filamentous fungi. Several proteins depend on quelling or meiotic silencing have been found through comprehensively molecular study on the quelling deficient and meiotic silencing deficient mutants of filamentous fungi, and these proteins are highly similar to the RNA interference pathway protein. These researches demonstrate that RNA interference works in filamentous fungi. It has special significance to employ RNA interference as a tool for molecular biology research and genetic manipulation of filamentous fungi, for these microbes generally consist of multinuclear hyphae, and in which the frequency of non-homologous recombination is much higher than homologous recombination. This review summarized the recent advances in RNA interference research and its application technology in filamentous fungi.

Key words: RNA interference Quelling Meiotic silencing Small interference RNA Filamentous fungus

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是真核生物中相对保守的基因沉默机制。它通过内源或外源双链 RNA(dsRNA)介导细胞内 mRNA 发生特异性降解或翻译的抑制,从而导致靶基因的表达沉默,并

产生相应的功能表型缺失^[1]。RNAi 途径可分为 3 个步骤^[2]: (1) 外源导入或者细胞内表达的长链 dsRNA(正义链和反义链转录产物之间碱基互补或自身形成茎环结构)被核糖核酸酶 III(RNase III),即

收稿日期:2011-03-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31070044)

作者简介:王绍文,男,硕士,研究方向:应用微生物学及分子生物学;E-mail:wangsw915918@163.com

通讯作者:邢苗,男,博士,教授,研究方向:细胞生物学;E-mail:xingmiao@szu.edu.cn

刘刚,男,博士,教授,研究方向:应用微生物学及分子生物学;E-mail:zjuliug@szu.edu.cn

Dicer 加工成为小分子双链 RNA; (2) 小分子双链 RNA 解链, 其中一条整合到 RNA 诱导的沉默复合体(RISC) 中; (3) RISC 搜索潜在的靶 RNA, 整合到 RISC 的单链 RNA(ssRNA), 即引导链(guiding strand), 介导 RISC 中内切核酸酶(Argonaute 蛋白) 切割与引导链同源的 mRNA。丝状真菌中也存在 RNAi 途径, 随着研究工作的深入开展, RNAi 技术已成为对丝状真菌进行遗传改造的一种新的手段。由于 RNAi 具有序列特异性而非位点相关性的特点, 相对于基因敲除而言, 它在多核、易发生非同源重组的丝状真菌中应用具有特殊的优势^[3,4]。

1 丝状真菌中与 RNAi 相关的基因沉默现象

1.1 RNA 压制(quelling)

Romano 和 Machino^[5] 将粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) 内源基因 *al-1* 的同源片段转入该微生物后, 发现 *al-1* 基因的表达受到抑制, 他们将这种现象称为 RNA 压制(quelling)。随后, 研究者获得了一系列 quelling 功能缺失(quelling-deficient, *qde*) 的 *N. crassa* 突变菌株, 对这些突变株的研究证明了 quelling 途径与小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA) 相关。其中, *qde-1* 突变株不能合成正常的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), 而 RdRP 为其他真核生物的 RNAi 所必需^[6], 表明 RdRP 和某种 RNA 分子参与了 quelling 途径^[7]。此外, *qde-2* 基因编码一个含有 piwi-PAZ 结构域(PPD 或 Argonaute) 的蛋白^[8], 该蛋白是真核生物 RNA 沉默途径中一个必要的保守组分。以上关于 *Neurospora* 中 quelling 途径的研究结果为阐明丝状真菌的 RNA 沉默机制奠定了基础。

1.2 非配对 DNA 诱导的减数分裂沉默现象

非配对 DNA 诱导的减数分裂沉默(meiotic silencing by unpaired DNA, MSUD) 是在 *N. crassa* 中发现的另外一种的 RNA 干扰现象^[9]。*N. crassa* 在营养生长期为单倍体, 当两种不同交配型(mating type) 的单倍体细胞核融合形成合子时, 会形成不稳定的二倍体。二倍体合子经过减数分裂后(其间有同源染色体配对) 再进行有丝分裂, 形成含有 8 个

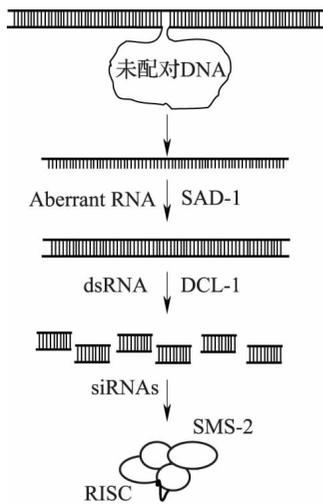
单倍体子囊孢子的子囊。当子囊孢子成熟基因(*asm-1*) 与等位基因配对时, 其功能可正常发挥, 子囊孢子成熟。当 *asm-1* 基因为不配对状态时, 其表达被沉默, 影响子囊孢子成熟。若细胞中存在非配对的 *asm-1* 基因, 除该基因自身的表达被沉默外, 基因组中该基因其他拷贝(甚至是已配对的等位基因) 的表达也被沉默, 表明可能存在可移动的反式作用分子参与 MSUD 途径^[9]。MSUD 可通过绿色荧光蛋白等报告基因观察, 将 GFP 与组蛋白 H1 形成融合蛋白(H1-GFP), 若两个亲本均含相同的 H1-GFP, 则杂合体在任何阶段都表达 GFP。若将 H1-GFP 亲本与野生型亲本(不含 H1-GFP) 杂交, 则所形成的二倍体在减数分裂期不能表达 GFP^[10]。

通过紫外线诱变后筛选 MSUD 缺陷突变株, 以及通过对 RNAi 相关蛋白的序列保守性分析和缺失突变菌株的功能鉴定, 在 *N. crassa* 中获得了与 MSUD 相关的蛋白, 如 SAD-1、SAD-2、SMS-2 和 DCL-1 等^[11-13]。在这些蛋白的突变株中 MSUD 现象缺失, 而无一例外, 这些蛋白的结构都与高等真核生物 RNAi 途径的某种功能蛋白的序列相似。SAD-1 的序列与其他生物的 RdRPs 的序列具有相似性, SMS-2 与 Argonaute 蛋白具有结构相似性, DCL-1 与 Dicer 的结构相似, SAD-2 为 SAD-1 的辅助蛋白, 它引导 SAD-1 定位到核周区域(perinuclear region)^[11-13]。根据这些蛋白的功能, 可归纳出 MSUD 的可能作用机制: 非配对 DNA 中的基因由目前尚不清楚的机制被转录为异常的 RNA(aRNA), 在 SAD-1 的作用下 aRNA 转变为双链 RNA(dsRNA), 在 DCL-1 的作用下, dsRNA 被切割成小 RNA, 小 RNA 结合在由 SMS-2 形成的 RISC 复合体上, 引起特异基因 mRNA 的表达沉默(图 1)。

1.3 真菌中的小 RNA

小 RNA(miRNA) 是由含发夹结构的单链 RNA 前体经 Dicer 剪切而产生的短的双链 RNA 分子, 在动物、植物和藻类中广泛存在^[14-17]。以往通常认为真菌中不存在 miRNA, 但最近研究者通过生物信息学手段辅助 QPCR 检测、以及对 QDE-2 相关的小 RNA 分析, 在 *N. crassa* 中找到了一系列 miRNA^[18]。

通过功能分析和结构鉴定,表明真菌中的 miRNA 具有与高等生物 miRNA 相似的特征,如由具有茎环结构的 RNA 前体加工而成、能使内源的靶基因沉默等。除 *N. crassa* 外,在其他丝状真菌中尚未发现 miRNA 的报道。在真菌中是否普遍存在 miRNA,其具体的生理功能如何等,这些问题尚有待于深入研究。



在减数分裂过程中,非配对 DNA 片段(unpaired DNA)经一种未知机制转录为非正常 RNA(aRNA),在 SAD-1 的作用下 aRNA 为模板合成 dsRNA,后者经 DCL-1 切割成 siRNA 后结合到 RISC 上

图 1 *N. crassa* 中 MSUD 的可能模型

2 丝状真菌中 RNA 干扰的生物学功能

小分子非编码 RNA 在真核细胞中参与多种生理功能,如调控内源基因的表达,抵抗病毒,使转座子失活,形成异染色质及维持生殖细胞基因组稳定性等。

高等真核生物的 RNAi 途径参与了转座子沉默过程,而真菌的 RNA 沉默途径也具有同样的作用。最近的研究发现,构巢曲霉和栗疫病真菌(*Cryphonectria parasitica*)的 RNAi 途径与抗病毒防御机制有关^[19, 20]。病毒感染 *N. crassa* 和 *C. parasitica* 后,这两种真菌中 RNAi 途径相关蛋白基因的表达量增加^[21]。因此, RNAi 途径可能是真核生物抵抗病毒和转座子感染的一种天然防御机制,该机制可能起源于真核生物进化过程的古老

时期。

高等真核生物的 miRNA 途径参与代谢、细胞凋亡、细胞分化、发育和感染应激反应等多种生理功能。有研究表明真菌中也存在类似的 miRNA 调节机制,如在 *N. crassa* 中发现了与 miRNA 相似的小 RNA (miRNA)^[18]。某些真菌的 Dicer 缺失突变株在发育上有明显的缺陷。稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中编码 Dicer 的基因被破坏后,其菌丝体在营养生长期出现异常的形态^[22];而 *N. crassa* 的 *dcl-1* 纯合突变株缺失繁殖能力^[23]。尽管真菌发育过程的分子机制尚不清楚,但以上的结果说明除了抵抗病毒和转座子感染外,真菌的 Dicer 蛋白可能还具有其他的生物学功能。

3 丝状真菌的 RNA 干扰方案

3.1 转化方法

尽管通过外源导入的双链 RNA 可以实现对目的基因表达的沉默^[24],但这种表型只是瞬时的,不能稳定遗传。理想的方法是将能使真菌自主合成双链 RNA 的表达盒转入真菌中。为提高转化效率,在对真菌遗传改造之前有必要设计合适的转化方法。

首次成功转化酿酒酵母是采用原生质体介导的转化方法(protooplast-mediated transformation, PMT),随后,该方法被应用于一些丝状真菌的转化^[25]。但与酿酒酵母相比, PMT 对于丝状真菌的转化效率较低。为了提高丝状真菌的转化效率,其他的转化方法被逐步应用到丝状真菌的转化中,如电穿孔、基因枪和根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, AMT)^[25, 26]。这些方法对于难以制备原生质体或原生质体再生效率低的真菌菌株较为有效。表 1 总结了这四种转化方法的主要特征^[27]。有研究表明,有些真菌在利用 PMT、电穿孔和基因枪进行转化时,转化效率非常低,而采用 AMT 则获得较高的转化效率。另一方面,采用 AMT 转化黑曲霉的效率很低,甚至无法获得转化子^[26]。因此,对于不同的真菌菌种,需要探索最合适、效率较高的转化方法,并对转化条件进行优化。

表 1 四种常用的丝状真菌转化方法

| 方法 | 原理 | 优点 | 缺点 |
|-----|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| PMT | 利用溶壁酶制备原生质体;加入 PEG 使原生质体摄入 DNA | 可利用多种受体细胞(萌发或成熟的孢子、菌丝组织) | 溶壁酶批次影响转化效率;需要原生质体再生 |
| AMT | 通过根癌农杆菌的侵染机制使目的 DNA 整合到真菌基因组 | 可利用多种受体细胞(萌发或成熟的孢子、菌丝体);同源重组频率高 | 共培养条件影响转化效率;比其它方法更耗费时间 |
| 电穿孔 | 局部电脉冲使细胞膜发生短暂的可逆通透性,从而转入目的 DNA | 可利用多种受体细胞(萌发或成熟的孢子);简单廉价 | 需要制备原生质体 |
| 基因枪 | 目的 DNA 包裹的金属颗粒(钨、金)被加速后进入细胞 | 细胞不需要前处理 | 需要特殊的仪器 |

PMT 表示原生质体介导的转化;AMT 表示农杆菌介导的转化

3.2 转化的筛选标记

目前已有多种抗生素抗性基因用于真菌的筛选,其中潮霉素 B 抗性基因(hph)在很多真菌筛选过程效果较好,因而被广泛应用于丝状真菌的筛选系统。其他用于真菌的抗生素筛选标记包括腐草霉素(phleomycin)、磺酰脲素(sulfonylurea)、毕拉草(bialophos)、萎锈灵(carboxin)、杀稻瘟素(blastidyn S)和苯菌灵(benomyl)等^[25, 28, 29]。

除了抗生素抗性基因外,营养缺陷型标记也可用于真菌转化的筛选,如 pyrG(酿酒酵母 ura3 的同源基因,编码乳清酸苷-5'-脱羧酶)。pyrG 的缺陷型菌株在不含尿嘧啶的培养基中不能生长,但原养型的可以。另外,pyrG 的营养缺陷型菌株对 5-氟-乳清酸(5FOA)不敏感,而 pyrG 原养型原生质体可被 5FOA 杀死。利用以上原理,已成功实现多个基因连续转化酵母的例子^[30],而且该筛选系统也已被成功应用于丝状真菌的遗传改造^[31]。使用营养缺陷型标记筛选的缺点是转化受体必需为缺陷型突变株。

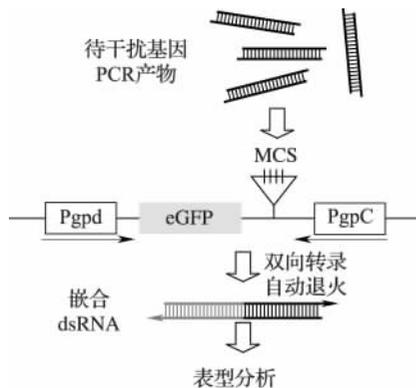
3.3 双链 RNA 的生成策略

将内源性目的基因片段的反义链转入 *Neurospora* 后,产生沉默转化子的效率通常较低^[5],而利用双链 RNA 表达载体能有效地诱导 RNA 沉默现象。使真菌自主产生双链 RNA 的策略之一是转入发夹结构 RNA(hairpin RNA, hpRNA) 表达载体。当载体同时含有目的基因片段及其反向重复序列(inverted repeat),且反向重复序列之间有一段间隔序列(spacer)时,就形成发夹结构 RNA(hpRNA)。在

植物中的研究发现, hpRNA 的双链茎部分可以是目的基因的 5'非翻译区(5'UTR)、编码区或 3'非翻译区(3'UTR),大小为 400-800 nt(核苷酸),最小可至 98 nt。当 spacer 序列含有内含子时(ihpRNA),目的基因的沉默效率(沉默转化子占全部转化子的比例)大幅度提高(66%-100%),平均沉默效率为 90%;而无内含子 spacer 序列的 hpRNA 的沉默效率为 48%-69%^[32, 33]。ihpRNA 高效诱导 RNA 沉默的原因可能是剪接小体复合体在加工内含子过程中促进 hpRNA 形成双链结构,或者内含子的剪接促进 dsRNA 从细胞核转运到细胞质,从而与 Dicer 相互作用^[33]。Liu 等^[34]首先利用 hpRNA 表达载体诱导担子菌类病原真菌 *Cryptococcus neoformans* 的 RNA 沉默现象。最近几年,以绿色荧光蛋白基因和红色荧光蛋白基因为报告基因,在植物病原真菌 *M. oryzae*、*Venturia inaequalis*、*Colletotrichum lagenarium* 及模式丝状真菌 *N. crassa* 中建立了 RNA 干扰方法,并利用 RNAi 研究这些真菌某些重要基因的功能^[28, 35-37]。为了方便利用 PCR 克隆方法构建 ihpRNA 表达载体,Nakayashiki 等^[37]设计了用于子囊真菌的通用 ihp 表达载体 pSilent-1。目前, hpRNA 或 ihpRNA 表达载体已成为高效诱导真菌 RNA 沉默的技术平台,利用此平台研究者能够方便、有效地探索真菌的基因功能。

使真菌自主产生双链 RNA 的第二种策略是利用双向启动子系统,使目的基因片段位于两个方向相反的启动子之间,目的基因片段发生转录后,其正义链和反义链 RNA 在细胞中形成 dsRNA(图 2)^[3]。

这类载体的构建只需要一步非定向克隆,可以快速地与目的基因片段的 PCR 产物连接。据报道,这类 RNAi 载体在荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*) 中诱导 eGFP 的表达沉默程度较低(平均抑制程度为 35%)^[38]。利用以上策略,Nguyen 等^[39] 构建了含有 trpC 和 gpd 启动子的载体 pSilent-Dual1 (pSD1)。pSD1 转入 *M. oryzae* 后,诱导目的基因的沉默程度比 ihpRNA 表达载体诱导的沉默程度低。



在双向启动子系统中,通过与绿色荧光蛋白(GFP)基因的共沉默,筛选靶基因沉默转化子,靶基因片段的 PCR 产物与 GFP 基因干扰序列共同插入到沉默载体中,转入表达 GFP 的真菌细胞后,在双向启动子作用下,转录的嵌合型 RNA (chimeric RNA) 形成 dsRNA。利用与 GFP 基因共沉默关系,在荧光显微镜下筛选靶基因沉默转化子。

图 2 高通量 RNAi 的双向启动子系统

4 RNAi 技术的优势与局限性

4.1 RNAi 对基因表达的不完全抑制

与基因敲除技术相比, RNAi 在丝状真菌的基因功能研究中具有一定优势,同时也存在一定局限性。首先,基因敲除可以使目的基因的表达被 100% 抑制,而 RNAi 只产生部分抑制。然而,从另一角度看,这也是 RNAi 的优势。例如,某些看家基因难以用基因敲除研究,利用 RNAi 使这些基因部分沉默,研究相关表型的变化从而推断这些基因的功能。此外,结合诱导型启动子,利用 RNAi 可以在细胞发育的特定时期抑制基因的表达^[3]。

4.2 RNAi 作用的序列特异性

RNAi 与基因敲除的第二个区别在于作用的方式不同。基因敲除是位点特异性的,即只有当转入的片段和目的基因具有同源性,而且与之发生同源

重组才有可能使目的基因敲除;而 RNAi 是序列特异性的,只要在细胞质内具有和目的基因同源的 dsRNA 序列,就可以在 Dicer、RISC 等的作用下是目的基因的表达下调。由于基因家族成员的序列有高度相似性,利用 RNAi 的序列特异性特点,只需构建一个载体就能够同时沉默这些家族成员,从而有效地分析基因家族的功能^[40]。与构建多基因敲除突变菌株相比, RNAi 可以减轻突变菌株的筛选工作量。即使是非同源基因,将这些基因的部分序列用同一个 RNAi 载体融合表达,就可以使这些基因发生共沉默。

另外,丝状真菌中存在多核(同一细胞或原生质体中存在多个核)或异核现象(同一细胞中存在多个基因型不同的细胞核)现象,利用基因敲除技术难以使核中所有的目的基因被敲除,效率较低。而 RNAi 是序列特异性的,只要在细胞质内具有和目的基因同源的 dsRNA 序列,就可以抑制目的基因的表达。因此,通过 RNAi 途径可以作用于多核或异核菌丝中的 mRNA。据报道,基因沉默现象可以在异核的 *N. crassa* 菌株的细胞核之间转移^[41]。

在基因敲除过程中,转入的 DNA 片段在真菌中发生的重组有很多是非同源重组,从而使基因敲除较难实现。在 *A. nidulans* 和 *N. crassa* 的野生型菌株中,同源重组频率约为 0.1% - 5%^[42, 43]。而序列特异性的 RNAi 可以解决真菌中同源重组频率低的问题,研究表明,ihpRNA 表达载体介导的基因沉默效率为 66% - 100%^[33]。

然而, RNAi 作用的序列特异性特点可能会产生较严重的问题,即脱靶效应(off-target effects),导致非目的基因的表达发生变化。脱靶效应会引起假阴性和假阳性结果,是目前 RNAi 研究所面临的主要问题^[44]。通过微阵列分析,人类细胞的脱靶效应可能是通过 siRNA 或 miRNA 途径抑制或激活非目的基因的表达^[45]。在哺乳动物 RNAi 体系中,长链 dsRNA 经 Dicer 切割后产生一系列序列不同的 siRNA,使引起脱靶效应的某一类 siRNA 的浓度相对较低。因此在 RNAi 研究中,长链 dsRNA 比合成的 siRNA 更能降低脱靶效应发生的机率。

5 结语

RNAi 途径已在越来越多的丝状真菌中得到证

实。与基因敲除相比, RNAi 存在干扰效率稍低、有脱靶效应等缺陷。然而,它在丝状真菌中的应用也具有特殊的优势,如不受丝状真菌的多核现象、异核现象和非同源重组频率高的干扰,特别是当需要使多个基因的表达同时下调时,使用 RNA 干扰比基因敲除更加方便。针对丝状真菌 RNAi 的技术和工具的积累已经比较丰富,如 pSilent-1^[37] 等。随着更多先进方法的引入,应用 RNAi 不仅会促进后基因组时代真菌基因功能的研究,而且可通过 RNAi 改良工业丝状真菌的遗传性状,提高工业菌种的性能及相应生化产品的生成效率。

参考文献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Tomari Y, Zamore PD. Machines for RNAi. *Genes and Development*, 2005, 19(5): 517-529.
- [3] Nakayashiki H, Nguyen QB. RNA interference: roles in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* 2008, 11(6): 494-502.
- [4] Janus D, Hoff B, Kuck U. Evidence for Dicer-dependent RNA interference in the industrial penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* 2009, 155(Pt12): 3946-3956.
- [5] 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.
- [6] Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 1999, 399(6732): 166-169.
- [7] Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinion in Genetics and Development* 2000, 10(6): 638-643.
- [8] Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, et al. Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 2000, 404(6775): 245.
- [9] Shiu PK, Raju NB, Zickler D, et al. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* 2001, 107(7): 905-916.
- [10] Freitag M, Hickey PC, Raju NB, et al. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(10): 897-910.
- [11] Bardiya N, Alexander WG, Perdue TE, et al. Characterization of interactions between and among components of the meiotic silencing by unpaired DNA machinery in *Neurospora crassa* using bimolecular fluorescence complementation. *Genetics* 2008, 178(1): 593-596.
- [12] Lee DW, Pratt RJ, McLaughlin M, et al. An argonaute-like protein is required for meiotic silencing. *Genetics* 2003, 164(2): 821-828.
- [13] Alexander WG, Raju NB, Xiao H, et al. DCL-1 colocalizes with other components of the MSUD machinery and is required for silencing. *Fungal Genetics and Biology* 2008, 45(5): 719-727.
- [14] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75(5): 843-854.
- [15] Llave C, Kasschau KD, Rector MA, et al. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell* 2002, 14(7): 1605-1619.
- [16] Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, et al. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 2007, 447(7148): 1126-1129.
- [17] Grimson A, Srivastava M, Fahey B, et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 2008, 455(7217): 1193-1197.
- [18] Lee HC, Li L, Gu W, et al. Diverse pathways generate MicroRNA-like RNAs and dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell* 2010, 38(6): 803-814.
- [19] Hammond TM, Andrews MD, Roossinck MJ, et al. *Aspergillus* mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. *Eukaryotic Cell* 2008, 7(2): 350-357.
- [20] Segers GC, Zhang X, Deng F, et al. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(31): 12902-12906.
- [21] Choudhary S, Lee HC, Maiti M, et al. A double-stranded-RNA response program important for RNA interference efficiency. *Molecular and Cellular Biology* 2007, 27(11): 3995-4005.
- [22] 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. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(43): 44467-44474.
- [23] Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genetics*, 2005, 37(1): 41-47.
- [24] Khatri M, Rajam MV. Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Medical Mycology* 2007, 45(3): 211-220.
- [25] Ruiz-Diez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92(2): 189-95.
- [26] Michiels CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, et al. *Agrobacterium* mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* 2005, 48(1): 1-17.
- [27] Meyer M. Genetic engineering of filamentous fungi—Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(2): 177-185.

- [28] Fitzgerald A ,Van Kan JA ,Plummer KM. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus *Venturia inaequalis* by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genetics and Biology* 2004 41(10) :963-971.
- [29] Wirsal SGR ,Voegelé RT ,Banninger R et al. Cloning of beta-tubulin and succinate dehydrogenase genes from *Uromyces fabae* and establishing selection conditions for their use in transformation. *European Journal of Plant Pathology* 2004 110(5) :767-777.
- [30] Alani E ,Cao L ,Kleckner N. A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* 1987 116(4) :541-545.
- [31] Hartl L ,Seiboth B. Sequential gene deletions in *Hypocrea jecorina* using a single blaster cassette. *Curr Genet* 2005 48(3) :204-211.
- [32] Smith NA ,Singh SP ,Wang M-B ,et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 2000 407(6802) :319-320.
- [33] Wesley SV ,Helliwell CA ,Smith NA et al. Construct design for efficient ,effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 2001 27(6) :581-590.
- [34] Liu H ,Cottrell TR ,Pierini LM et al. 2002. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* ,2002 ,160 (2) :463-470.
- [35] Kadotani N ,Nakayashiki H ,Tosa Y ,et al. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2003 16(9) :769-776.
- [36] Goldoni M ,Azzalin G ,Macino G ,et al. Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 2004 41(11) :1016-1024.
- [37] Nakayashiki H ,Hanada S ,Nguyen BQ ,et al. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genetics and Biology* 2005 42(4) :275-283.
- [38] Rappleye CA ,Engle JT ,Goldman WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1 3) -glucan in virulence. *Molecular Microbiology* 2004 53(1) :153-165.
- [39] Nguyen QB ,Kadotani N ,Kasahara S et al. Systematic functional analysis of calciumsignalling proteins in the genome of the rice-blast fungus *Magnaporthe oryzae* using a high-throughput RNA-silencing system. *Molecular Microbiology* 2008 68(6) :1348-1365.
- [40] Zhao W ,Fanning ML ,Lane T. Efficient RNAi-based gene family knockdown via set cover optimization. *Artificial Intelligence in Medicine* 2005. 35(1-2) :61-73.
- [41] Cogoni C ,Ireland JT ,Schumacher M ,et al. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA - DNA interactions or DNA methylation. *EMBO Journal* 1996 15(12) :3153-3163.
- [42] Chaverche MK ,Ghigo JM ,Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research* 2000 28(22) :E97.
- [43] Colot HV ,Park G ,Turner GE et al. A highthroughput gene knock-out procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2006 ,103 (27) :10352-10357.
- [44] Echeverri CJ ,Beachy PA ,Baum B et al. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nature Methods* 2006 3(10) :777-779.
- [45] Jackson AL ,Bartz SR ,Schelter J et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology* 2003 21 (6) :635-637.

(责任编辑 狄艳红)