

捕食线虫真菌少孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora* 线粒体基因组的异质性

李烁烁^{1,2}, 王达^{1,2}, 房美玲^{1,2}, 张颖^{1*}

1 云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650091

2 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091

摘要: 捕食线虫真菌少孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora* 是子囊菌中的一个食肉性丝状真菌, 其菌丝体可变态为各种结构精巧的捕食器官用于捕食线虫, 在生物防治和进化上极具研究潜力。线粒体基因细胞色素c氧化酶亚基I基因(*COXI*)在真菌物种鉴定中的效果饱受争议。本研究对 *A. oligospora* 的不同单孢培养的菌株进行了 *COXI* 基因的扩增和比较研究, 力求探究各代菌株的异质性变化程度和范围, 了解其产生的原因。结果表明, SNPs 在不同单孢代系和家系之间、同一代系和家系内部均稳定存在, 但代系间的遗传变异大于家系间的遗传变异, 各代系未呈现独特的遗传结构。随着代数的增加, 核酸多态性的变化与 F1 代趋于一致, 大部分独特的等位基因型出现在 F3 代, 说明该种 *COXI* 基因可能还有大量潜在的新基因型有待发现。重组分析显示, 多个 SNP 位点间发生了频繁的重组事件, 说明线粒体异质性在群体内稳定存在, 进一步分析发现基因重组和 *COXI* 基因多拷贝可能是造成异质性的原因。本研究为进一步揭示 *COXI* 基因在捕食线虫丝孢菌进化上的作用, 以及评估线粒体基因在该类真菌分子鉴定中的效果提供了科学依据。

关键词: *COXI* 基因; 单核苷酸多态性; 单孢菌株; 重组

[引用本文] 李烁烁, 王达, 房美玲, 张颖, 2022. 捕食线虫真菌少孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora* 线粒体基因组的异质性. 菌物学报, 41(4): 529-545

Li SS, Wang D, Fang ML, Zhang Y, 2022. Evident presence of heteroplasmy in the mitochondrial genomes of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Mycosystema, 41(4): 529-545

基金项目: 国家自然科学基金(31760010)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760010).

*Corresponding author. E-mail: yzh_1210@hotmail.com

ORCID: ZHANG Ying (0000-0002-3995-531X), LI Shuoshuo (0000-0002-3369-231X)

Received: 2021-07-21, accepted: 2021-09-13

Evident presence of heteroplasmy in the mitochondrial genomes of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*

LI Shuoshuo^{1,2}, WANG Da^{1,2}, FANG Meiling^{1,2}, ZHANG Ying^{1*}

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

2 School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: The nematode-trapping *Arthrobotrys oligospora* is a carnivorous ascomycetous fungus, with mycelia can transformable to a variety of finely trapping devices to capture nematodes. The fungus can be used as model samples in adaptative evolution researches and as biological control agents against parasitic nematodes. The use of the mitochondrial gene, cytochrome c oxidase subunit I gene (*COX1*), as molecular marker for species identification in the kingdom Fungi was debated for a long time. In order to explore the degree and range of heterogeneity in each generation of the same strain, the *COX1* gene of *A. oligospora* YMF1.03037 different single spore isolates was amplified and compared. The results showed that the SNPs existed inter- and intra-generations and inter- and intra- lineages, but genetic variance among generations is greater than that among lineages. Most private alleles are found in F3, which have not been found in the parental generation, indicating that there might be potential other genotypes that we haven't explored. During subsequent amplification, new genotypes that were not previously amplified might appear. Recombinant analysis showed that recombination events among SNP sites were of frequent occurrence, providing the first robust evidence of heteroplasmy in the mitochondrial genomes of the nematode-trapping fungus *A. oligospora*. In addition, heterogeneity may be caused by gene recombination and multiple copy nature of *COX1* gene. This study provides a scientific basis for further revealing the role of *COX1* gene in the evolution of nematode-trapping hyphomycetes and evaluating the effect of mitochondrial gene in the molecular identification of filamentous fungi.

Keywords: *COX1* gene; single nucleotide polymorphism; single-spore strain; recombination

食线虫真菌(nematode-trapping fungi, NTF)是一类种类繁多,分布广泛的微生物。它们可以通过捕食或寄生于线虫体内,继而通过浸染、定殖和消耗线虫体内的营养物质等一系列手段达到杀死线虫的目的(Hsueh *et al.* 2013)。生态学研究表明少孢节丛孢 *Arthrobotry oligospora* 是环境中分布最广、分离频率最高的 NTF,它可以作为模式生物研究其对寄生线虫的生物防治和 NTF 的进化(Niu & Zhang 2011)。

传统的 NTF 分类主要依赖分生孢子的形态,由此产生的问题是具有不同类型捕食器官的物种被归入同一个属,且具有相同捕食器官的物种被归入不同属(Rubner 1996)。随着分子技术的发展,学者通过核基因分子标记来研究捕食线虫真菌的系统发育关系及其食肉性的起源(Li *et al.* 2005; Yang *et al.* 2007; Yang *et al.* 2012),并通过线粒体比较基因组的方法研究了捕食线虫真菌捕食器官的进化,大部分线粒体编码基因都受

到了强烈的正选择作用(Zhang *et al.* 2020)。

线粒体基因(mtDNA)具有遗传结构简单、进化速度快、有限的种内变异性等特点,因此非常适合用于设计分子标记来研究密切相关的分类群(Hebert *et al.* 2003; Waugh 2007)。由 mtDNA 编码的一种跨膜蛋白——细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因(cytochrome c oxidase subunit I gene, *COXI*)已成功应用于动物 DNA 条形码的研究(Charles *et al.* 2004; Waugh 2007)。但是到目前为止, *COXI* 基因在真菌物种鉴定中的应用还没有得到充分研究,仅限于特定的种属,其可行性在不同的研究中结论不一。例如在青霉属 *Penicillium*、锤舌菌属 *Leohumicola*、被孢霉属 *Mortierella*、枝孢属 *Cladosporium* 和卵菌 Oomycetes 中可行性高(Seifert *et al.* 2007; Nguyen & Seifert 2008; Molitor *et al.* 2010; Robideau *et al.* 2011)。但是在曲霉属 *Aspergillus* 和镰孢属 *Fusarium* 中却表现很差(Geiser *et al.* 2007; Gilmore *et al.* 2010)。也有研究报道 *COXI* 基因经常含有 I 型或 II 型内含子,由于这些内含子非常不保守,因此为编码基因的扩增带来很大难度(Seena *et al.* 2018); 该基因的内含子存在频繁的基因水平转移,造成物种之间非常大的内含子变异(Nadimi *et al.* 2012; Beaudet *et al.* 2013a); 另外对所有的真菌而言不可能设计像 ITS 一样的 *COXI* 通用引物,而且扩增 *COXI* 目的片段时经常用到巢式 PCR,不仅扩增效率低而且需要大量的故障排除和引物优化等(Dentinger *et al.* 2011; Schoch *et al.* 2012),这些问题不利于 *COXI* 作为真菌条形码。

线粒体是真核细胞中重要的细胞器,提供细胞能量(三磷酸腺苷)并参与多种细胞过程(Rong *et al.* 2021)。它们在真菌中有自己的遗传物质和多样的遗传模式,主要为母系遗传,丝状子囊菌也是如此(Wilson & Xu 2012)。这种遗传模式促进了后代的同源性(大多数子代含有来自母本的

线粒体基因组)(Breton & Stewart 2015),同时阻碍重组。因此,后代中很难出现异质性(细胞中线粒体基因型的多样性共存,即个体细胞内存在两个或多个异质的 mtDNA)的现象(Leducq *et al.* 2017)。然而,每个细胞中 mtDNA 的多拷贝性(指单细胞含有多个不同序列的 mtDNA) (Seena *et al.* 2018)、双亲遗传、父系泄漏、突变和重组等因素都会导致异质性的发生(Kvist *et al.* 2003; Albertin *et al.* 2013; Rodríguez-Pena *et al.* 2020)。并且有研究报道,在酵母菌和新型隐球菌中经常发现重组的痕迹,这些案例不仅发生在实验杂种中,也发生在自然群体中(Beaudet *et al.* 2013b; Fritsch *et al.* 2014)。另外,也有研究报道真菌存在 mtDNA 异质性的现象,比如:丝状真菌灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*、盘长孢状刺盘孢 *Colletotrichum gloeosporioides* 和子囊菌白叉丝单囊壳 *Podosphaera leucotricha* 的 mtDNA 细胞色素 b 基因(Cytochrome b, *cyt b*)中,均发现野生型和突变等位基因的共存(Lesemann *et al.* 2006; Ishii *et al.* 2007; Deising *et al.* 2008; White *et al.* 2008; Villani & Cox 2014; Hashimoto *et al.* 2015; Mosquera *et al.* 2019),这些例子都只是异质性对药物抗性影响的研究。Hauswirth & Laipis (1982)提出牛体内的异质性经过 20 代之后可以恢复同质,表明 mtDNA 异质性是短暂的,不是永久存在。Doublet *et al.* (2008)在陆生等足类甲壳动物研究中发现了稳定的、母系遗传的异质性现象,表明异质性可以通过母系遗传在后代中传播。关于 mtDNA 异质性是否能恢复同质或是否能通过遗传方式在后代中稳定存在没有明确的答案,本课题组在云南地区干巴菌中发现了 *COXI* 基因的异质性是以同一位点含有 2 种类型且出现频率不同的内含子为主要特征,这是首例担子菌自然群体的线粒体异质性,即双亲遗传的证据(Wang *et al.* 2017)。同时在同地的鸡油菌自然群体中也发现了同类证据(Zhang *et al.*

2021),以 *ATP6* 基因的点突变为主要特征,否定了担子菌自然群体线粒体异质性仅短暂存在的传统观点。

课题组前期选取线粒体基因组片段对 NTF 进行 DNA 条形码标记和系统发育分析发现, *COXI* 系统发育树出现聚类混乱的现象,进一步研究发现 *A. oligospora* 的 *COXI* 基因存在较大的碱基差异,这种差异远远超出该基因在相近真菌类群种间的变异范围。基于序列多态性、群体遗传变异及重组分析,在排除菌株不纯、序列间体外重组的可能性后发现, *A. oligospora* 的线粒体 *COXI* 基因存在异质性。因此,本研究主要从单孢代系出发,从 *A. oligospora* 中挑取三代单孢代系,分析 *A. oligospora* 的 *COXI* 基因异质性的程度范围、存在规律,以及可能的原因,进一步揭示其在捕食线虫丝孢菌进化上的作用及评估线粒体 DNA 在该类真菌分子鉴定中的效果。

1 材料与方法

1.1 菌株的来源

本研究所用的 *A. oligospora* 菌株来源于湖北,从土壤中分离得到,保存于云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室菌种保藏中心,编号为 YMF1.03037。

1.2 单孢的挑取

将原始菌株 YMF1.03037 接到马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上,28 °C 培养,一般 6–8 d 能产孢。挑取一小块产孢的菌块涂到新的 PDA 板上,在显微镜下观察,用接种针挑取独立的单个孢子,避免挑到菌丝,将带有孢子的接种针倾斜插入新的 PDA 板,重复几次确保接种针上的孢子进入到培养基中。为确保第一代(F1)的单孢菌株有 5 个,第二代(F2)有 25 个,第三代(F3)有 125 个,从原始菌株中挑取 8 个单孢作为 F1;再从 F1 的单孢培养菌株中分别挑取 5 个共 40 个作为 F2;以此类推从 F2

中挑取 200 个单孢作为 F3,这 3 个代系分成了 L1–L5 5 个家系。

1.3 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

根据改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法,从 PDA 培养基上的单孢培养物中收集菌丝体提取 mtDNA (Zhang *et al.* 2016)。用 Primer5 软件设计 *COXI* 巢式 PCR 特异性引物,外引物 5'-GACAAGAAAGGTGATTTTTATCTTC-3', 5'-GGTAATGATAATAATAATAATACAGC-3';内引物 5'-ATGCTAAAGACATTGGTA-3', 5'-ACGTATACCTGGACTTCT-3'。外引物锚定在 YMF1.03037 线粒体全基因组位点 132 824 和 133 434 之间,内引物锚定在位点 132 774 和 133 384 之间,扩增长度均为 610 bp。PCR 扩增体系(25 μL):dNTP mixture 4 μL, 10×LA PCR 缓冲液 2.5 μL, LA *Taq* 0.3 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 15.2 μL, 模板(150–250 ng/μL) 1 μL。外引物反应条件:95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 37 °C 55 s 共 2–3 个循环; 50 °C 55 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。内引物反应条件:95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55–50.5 °C 逐渐降低 0.5 °C, 共 11 个循环;退火温度 50 °C, 72 °C 1 min, 共 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.4 测序

样品通过聚合酶链反应扩增后,将产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检查反应是否成功,阳性扩增子经纯化后分别用正反向双向引物进行双向测序,由擎科生物有限公司测序。

1.5 数据处理和分析

1.5.1 扩增结果统计

由于 *A. oligospora* 的 *COXI* 基因含有较多的内含子导致扩增效率低,因此在实验过程中对扩增效率低的样品进行了多次 PCR。首先对一次 PCR 结果的成功率、杂峰占比做了统计,其次对杂峰和无条带样品做了 2 次及以上 PCR 扩增,并统计其扩增结果。这里的一次 PCR 指的是以外引物的扩增结果作为模板再经过内引物扩增

所得的结果，即 2 轮 PCR 扩增均成功的结果被视为一次 PCR。

1.5.2 单倍型分布及核酸多样性

通过上、下游引物双向测序获得的 *COXI* 基因序列，用 Clustal 2.0 软件进行对位排列，然后手工适当校正(Thompson *et al.* 1997)。排列后的序列，使用 DnaSP 6 软件对三代单孢菌株的单倍型数量(h)和每一代单孢菌株的核酸多样性(Pi)进行计算(Librado & Rozas 2009)。

1.5.3 遗传结构及遗传多样性

使用 GenAlEx 6.501 软件首先进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA) (Peakall & Smouse 2010)，分别以代系和家系将单孢菌株划分为不同的群体，目的是在群体水平评估变异贡献率。然后基于单孢菌株间的遗传距离进行了主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA) (Zhou *et al.* 2021)。并计算了单孢菌株的遗传多样性指数(Peakall & Smouse 2010)，包括平均非等位基因数(Na)、平均有效等位基因数(Ne)、Shannon’s 多态性信息指数(I)、私有等位基因数(No. Private Alleles)和多样性(h)。

1.5.4 系统发育分析

使用 MrBAYES 3.1.2 软件对排列好的碱基

序列进行系统发育分析(Huelsenbeck & Ronquist 2001)。在 MrModeltest 2.3 程序中运用 AIC 运算(Nylander 2004)，确定适用于分析的最佳模型为 GTR+I+F，贝叶斯分析设置运行代数 150 万次，运行至平均标准偏差低于 0.01 时终止。

1.5.5 重组分析

使用 MULTILOCUS 软件计算联系指数 I_A ，系统不相容性 PrC，并用 rBarD 值进行校准，目的是评估样品间是否存在基因重组(Brown *et al.* 1980)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果统计

挑取的单孢经过培养后发现成功的有 196 个单孢菌株。由于 *A. oligospora* 的 *COXI* 基因含有较多的内含子导致 PCR 扩增效率很低，所以对第一次 PCR 扩增出现杂峰和无条带的样品进行了两次及以上 PCR 扩增，经扩增结果统计后发现扩增效率依旧没有达到 100%，且所有单孢菌株的测序结果中仍然出现部分和完全杂峰的现象(表 1，表 2)。在经过序列筛选后，为了避免杂峰序列影响 *COXI* 基因异质性位点的判断和更好地研究异质性，删除了部分和完全

表 1 一次 PCR 序列扩增结果统计

Table 1 The result of once PCR amplification

代数 No. of generation	所挑成功单孢数 No. of selected single spore	PCR 次数 The times of PCR	完全纯峰占比 Pure peak ratio	部分和完全 杂峰占比 Double peak ratio	无条带占比 No peak ratio	扩增效率 Amplification efficiency (%)	扩增成功率 Amplification success rate (%)
F1	5	5	2/5	1/5	2/5	60.00	40.00
F2	26	26	2/26	1/26	23/26	11.54	7.69
F3	164	125	39/125	8/125	78/125	37.60	31.20

表 2 两次及以上 PCR 序列扩增结果统计

Table 2 The result of twice or more PCR amplifications

代数 No. of generation	两次及以上 PCR 次数 Two or more times of PCR	完全纯峰占比 Pure peak ratio	部分和完全 杂峰占比 Double peak ratio	无条带占比 No peak ratio	扩增效率 Amplification efficiency (%)	扩增成功率 Amplification success rate (%)
F1	4	3/4	1/4	0/4	100.00	75.00
F2	30	17/30	6/30	7/30	76.67	56.67
F3	157	64/157	22/157	71/157	56.05	40.76

杂峰的序列,只保留 110 条完全纯峰的序列作为后续实验分析,这 110 条序列被分成了 F1-F3 3 个代系和 L1-L5 5 个家系(图 1)。

2.2 单孢菌株 *COX1* 序列比对分析

原始菌株 YMF1.03037 中挑取的单孢菌株以第一代 F1 和第三家系 L3 为例,序列前面的编号在图 1 中已进行了说明(3 037 表示原始菌株

序列的编号),所有单孢菌株的 *COX1* 基因片段与 GenBank 中青霉属 *Penicillium* 中 *P. levitum*、*P. crustosum* 等和曲霉属 *Aspergillus* 中 *A. pseudoglaucus*、*A. tubingensis* 等几个种的 *COX1* 基因相似度为 96%–100%,并且所有菌株单孢代系间和家系内的 SNPs 是稳定存在的(图 2A, 2B)。

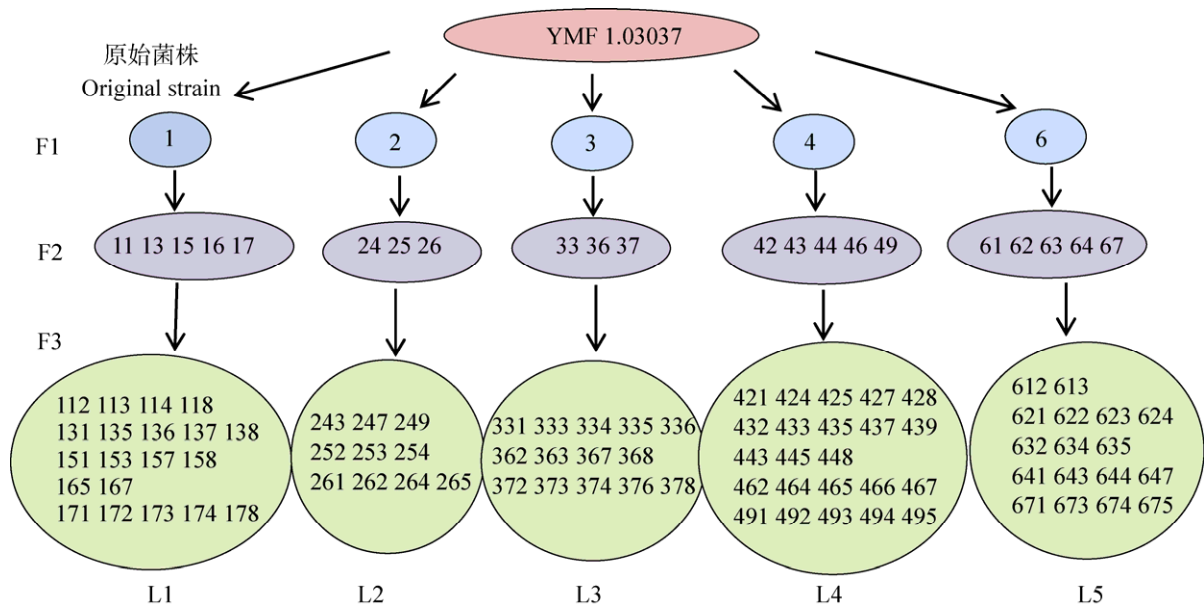


图 1 110 条序列分别对应的编号及其关系

Fig. 1 Codes corresponding to 110 sequences and relationship between sequences.

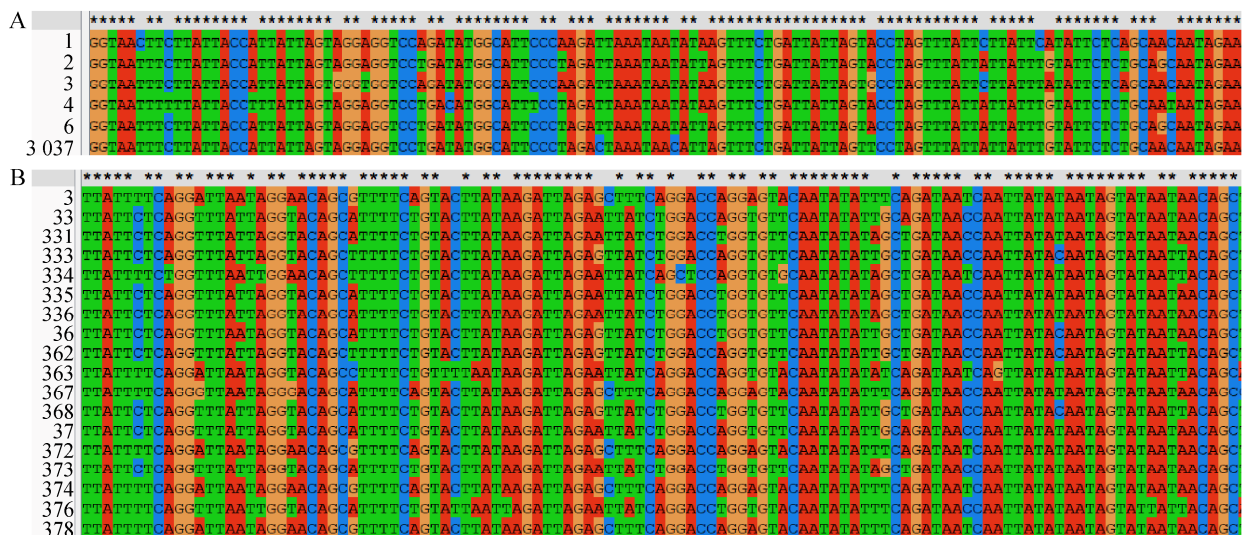


图 2 F1 代(A)和 L3 家系(B)不同单孢菌株之间 *COX1* 基因的序列比对分析

Fig. 2 Alignment of *COX1* sequences from different single-spore strains of the F1 generation (A) and the L3 lineage (B).

2.3 三代单孢菌株遗传多样性、等位基因频率及核酸多样性变化规律

2.3.1 三代单孢菌株遗传多样性及等位基因频率分布

通过 DnaSP 6 软件对每一代变异位点数目统计后,发现 F1、F2 和 F3 的 SNPs 数分别是 76、104 和 115,随着代数的增加,平均非等位基因数(Na)、平均有效等位基因数(Ne)、Shannon’s 多态性信息指数(I)和多样性(h)都在增大,所以这些值在 F3 中是最高的,F3 的 Na=2.347, Ne=1.529, I=0.469, h=0.292。且 F1 没有私有等位基因,F3 的私有等位基因比 F2 多,表明 F3 的遗传多样性更高(表 3)。随着单孢代数的增加,多样性(h)呈上升趋势,可见随着挑取单孢代数的增

加 *COX1* 基因呈现出更高的杂合性(图 3)。

2.3.2 核酸多样性变化规律

F1 和 F2, F1 和 F3 之间核苷酸替代发生位点的位置和多样性程度存在一定差异,但上述两个核酸多样性特征在 F2 和 F3 之间趋于一致(图 4)。

2.4 单倍型分布和遗传结构分析

2.4.1 单倍型分布

F1、F2 和 F3 三代有且仅有一种相同的单倍型,这种单倍型在家系 L2 的一个小分支 2、25、252 和 253 中同时存在(表 4),所以推断单倍型可以通过某种方式在代系间传播,但在本次实验中这种现象较为罕见,因为在其他家系中并没有出现同样的情况;同时发现 F1 拥有 1 种独特的单

表 3 三代单孢菌株各代系遗传多样性变化规律

Table 3 Summary of genetic diversity among different generations

代数 No. of generation	序列数 No. of sequence	每条序列 碱基数 No. of bases per sequence	单核苷 酸多态 性位点数 No. of SNP	平均非等 位基因数 No. of different alleles (Na)	平均有效等 位基因数 No. of effective alleles (Ne)	Shannon’s 多态 性信息指数 Shannon’s Information Index (I)	多样性 Diversity (h)	私有等位 基因数 No. of private alleles
F1	5	439	76	1.629	1.460	0.368	0.249	0.000
F2	21	431	104	1.960	1.449	0.417	0.261	0.056
F3	84	422	115	2.347	1.529	0.469	0.292	0.290
Total	110	--	--	1.978	1.479	0.418	0.268	--

Note: $Ne=1/(\sum p_i^2)$, $I=-1 \cdot \sum (p_i \cdot \ln(p_i))$, $h=1-\sum p_i^2$.

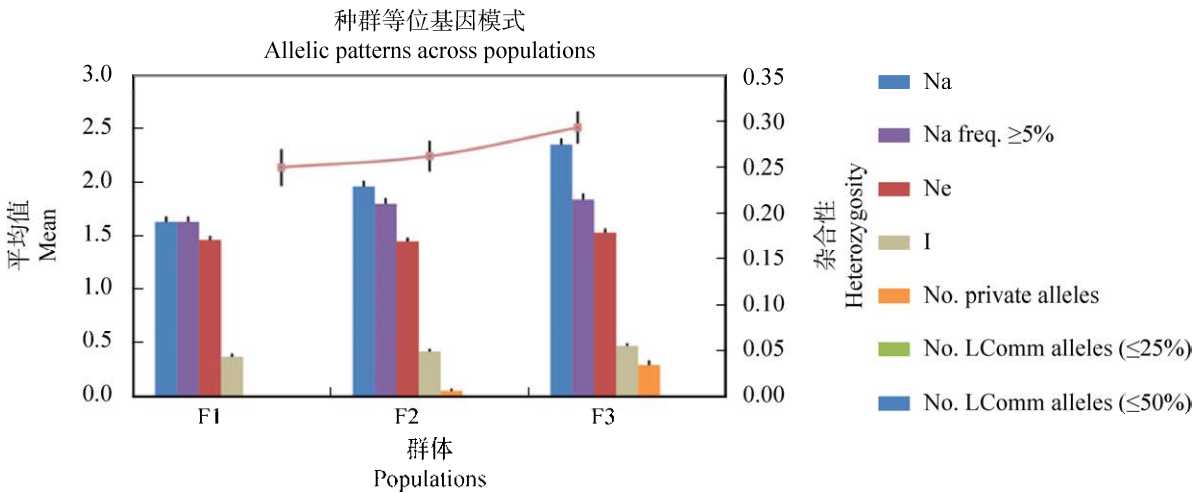


图 3 三代单孢菌株等位基因分布频率

Fig. 3 Allelic patterns across three generations of single-spore strains.

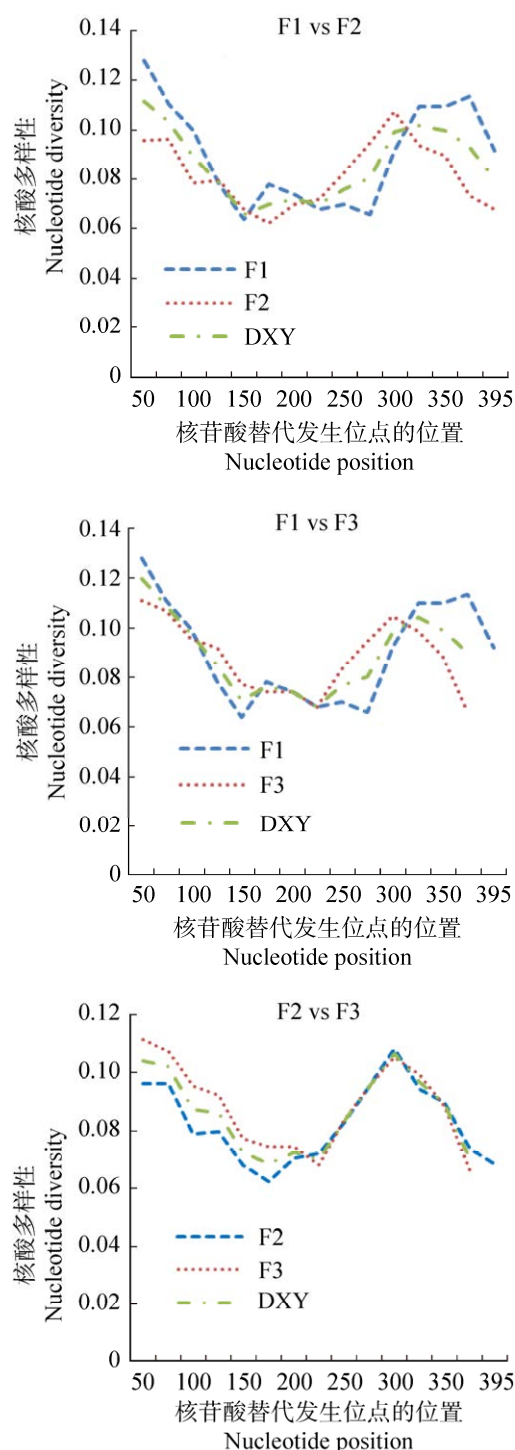


图 4 三代单孢菌株不同代之间两两比对的核酸多样性 Dxy: 群体间每个位点的平均核苷酸替代数

Fig. 4 Analyses of nucleotide diversity between different generations of single-spore strains. Dxy: Average number of nucleotide substitution per site between populations.

倍型, F2 拥有 6 种独特的单倍型, F3 拥有 25 种独特的单倍型, 大部分独特的单倍型在 F3 中仍然出现, 说明可能还存在潜在的其他单倍型有待发现(图 5A); 考虑到 F3 的单倍型较多, 通过分析 25 种单倍型在 F3 所有单孢菌株的各个家系间的分布情况, 发现 F3 中同一家系同一分支的单孢菌株(从 F2 的同一个单孢培养菌株中挑取的不同单孢菌株, 如: 112、113、114、118)出现 2 个或 3 个菌株间单倍型相同的情况, 如: 252、253, 374、378, 671、673, 424、425, 491、495, 173、178, 424、425, 335、336、331, 466、467、464, 493、494、492; 而在 F2 中就很少出现这种情况, 只有 15、16 有共同的单倍型(图 5B), 表明经过更多的代数后有新单倍型出现的同时, 不同菌株之间共享单倍型的事件也会经常发生。

2.4.2 分子方差分析

单孢分离菌株的 AMOVA 分析结果(表 5)显示, 在 3 个以代系划分的群体中, 总遗传变异量的 96%来自每一代的内部个体间, 只有 4%的遗传变异来自不同代系的个体之间, 分级水平上(代系间和代系内)的遗传变异组分在统计分析上都得到了显著性检验($P < 0.01$), 表明遗传分化主要来自代系内的个体差异, 不同代系间差异较小。然而, 在以家系划分的 5 个群体中, 遗传变异量的 100%来自家系内, 而家系间的遗传变异量是 0, 但显著性检验 $P > 0.01$, 表明不管在同一家系内部个体间, 还是在不同家系个体之间都没有明显的遗传分化, 且代系间的遗传变异大于家系间的遗传变异(表 6)。

2.4.3 主坐标分析

在 PCoA1 和 PCoA2 两个维度上不可以将 F1、F2 和 F3 三代的各单孢菌株分开, 尽管出现三代聚集的情况, 但这种聚集是无规律的(图 6A)。且在 PCoA1 和 PCoA2 两个维度上不可以将 L1-L5 的各单孢菌株分开(图 6B)。

表 4 单倍型在三代单孢菌株中的分布

Table 4 Haplotypic distribution of single-spore strains in three generations

单倍型数目 No. of haplotype	第一代 F1	第二代 F2	第三代 F3
1	1		
2	26	25	136 174 249 253 252 335 336 331 373 612 634 641 261 374 378 445 462 493 494 492 613 623 671 673
3	3		334
4	4		448
5		11	151 138 167 172 437 466 467 464 491 495
6		13	622
7		15 16 33 43 49 61 62 67	
8		17	
9		24	165
10		37	
11		26	
12		36	
13		42	264
14		46	173 178 247 368 424 425 465 621
15		44	
16		63	
17		64	
18			112
19			113 262
20			114
21			118 171 421 674
22			153
23			157
24			158
25			131 435
26			135
27			137
28			243
29			265 367 439 624 675
30			333 362
31			363
32			372
33			376
34			427
35			428 647
36			432
37			433
38			443
39			632
40			635
41			644
42			643
43			254

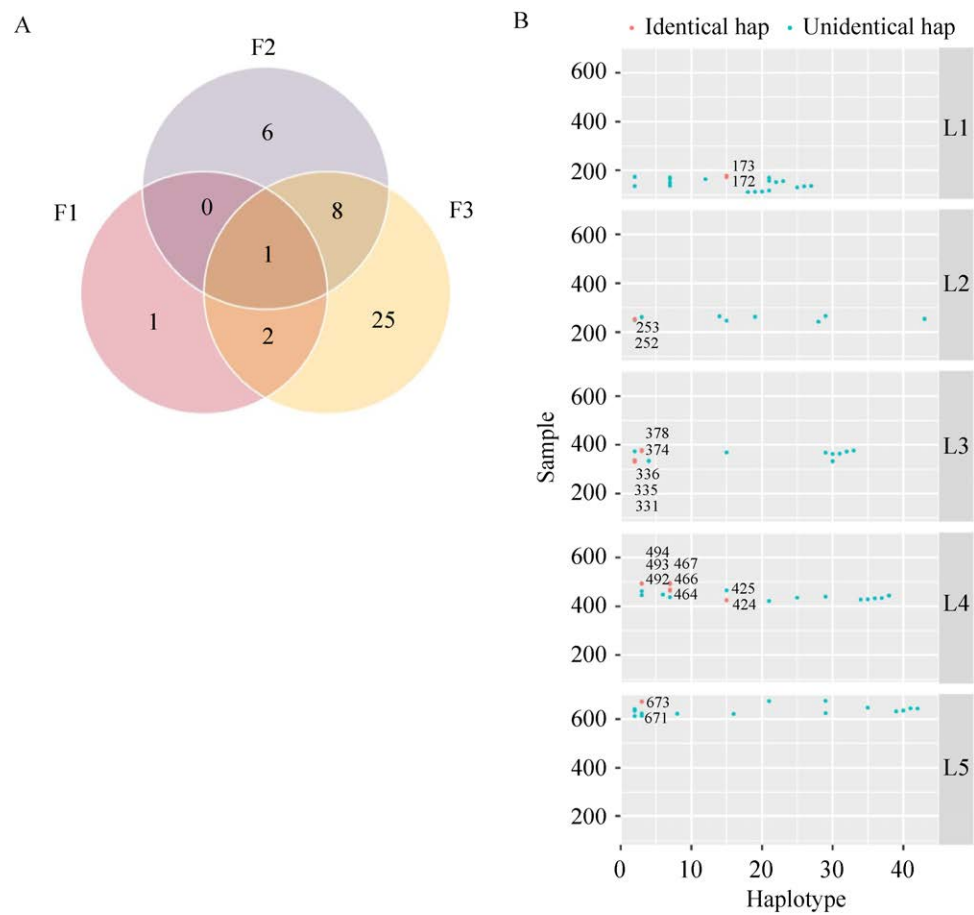


图 5 (A)三代单孢菌株共享单倍型事件分析维恩图；(B) F3 中同一家系同一分支单孢菌株共享单倍型事件分析

Fig. 5 (A) Venn diagrams of shared haplotype events based on single-spore strains from three generations; (B) Haplotype events based on single-spore of the same branch of the same lineage from the F3.

表 5 单孢分离菌株不同代和不同家系的 AMOVA 分析

Table 5 AMOVA analysis of different generations and families of single-spore strains

变异来源	自由度 <i>df</i>	平方和	均方	变异百分比	<i>P</i> 值
Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Percentage of variation (%)	<i>P</i> -value
代系间 Among generations	2	67.365	33.683	4	<0.01
代系内 Within generations	107	1 939.962	18.130	96	<0.01
总变异 Total	109	2 007.327			
家系间 Among families	4	65.721	16.430	0	>0.01
家系内 Within families	105	1 941.606	18.491	100	>0.01
总变异 Total	109	2 007.327			

表 6 单孢分离菌株的分子变异分析

Table 6 The analysis of molecular variance of all single-spore strains

变异来源	自由度 <i>df</i>	平方和	均方	变异百分比	<i>P</i> 值
Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Percentage of variation (%)	<i>P</i> -value
区域间 Among regions	4	69.963	17.491	0	>0.01
群体间 Among population	5	163.559	32.712	11	<0.01
群体内 Within population	95	1 678.583	17.669	89	>0.01
总变异 Total	10	1 912.105		100	

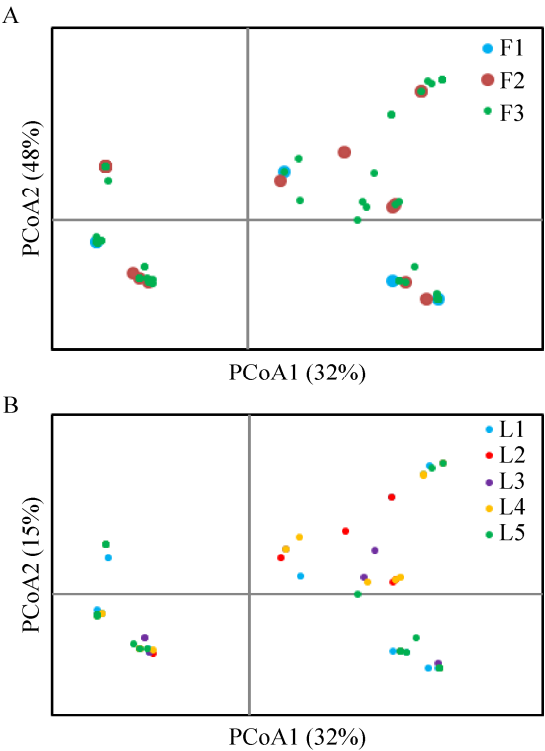


图 6 基于各代(A)和不同家系(B)的单孢菌株的 PCoA 分析

Fig. 6 PCoA based on different generations (A) and different lineages (B).

2.4.4 系统发育分析

家系 L2 的一个小分支 2、25、252、253 聚集在同一分支,而其他没有出现同一家系聚集在同一分支的情况; F3 出现 2 个或 3 个单孢菌株聚集在同一分支的情况,如 173、178; 424、425; 464、466、467; 335、336、331, 且这些单孢菌株分别是从 F2 的同一单孢生长菌株中挑取而来的(图 7)。

2.5 群体内部 SNPs 位点间的重组分析

将单孢培养菌株按所有菌株(All)、第一代至第三代(F1-F3)、第一至第五家系(L1-L5)划分群体,根据群体内所有 *COX1* 突变位点,计算了可能的位点间重组事件。发现 L1-L5 各家系比起 F1-F3 代,独有的重组事件更多; L1-L5 各家系与总样本共享 4 个重组事件,而 F2-F3 代则与总样本共享 8 个重组事件; 且 F3 与总样本共享

18 个重组事件,重组是造成突变和杂合的最直接原因,故可能是该群体积累最多独特遗传成分的原因(表 7、表 8, 图 8)。

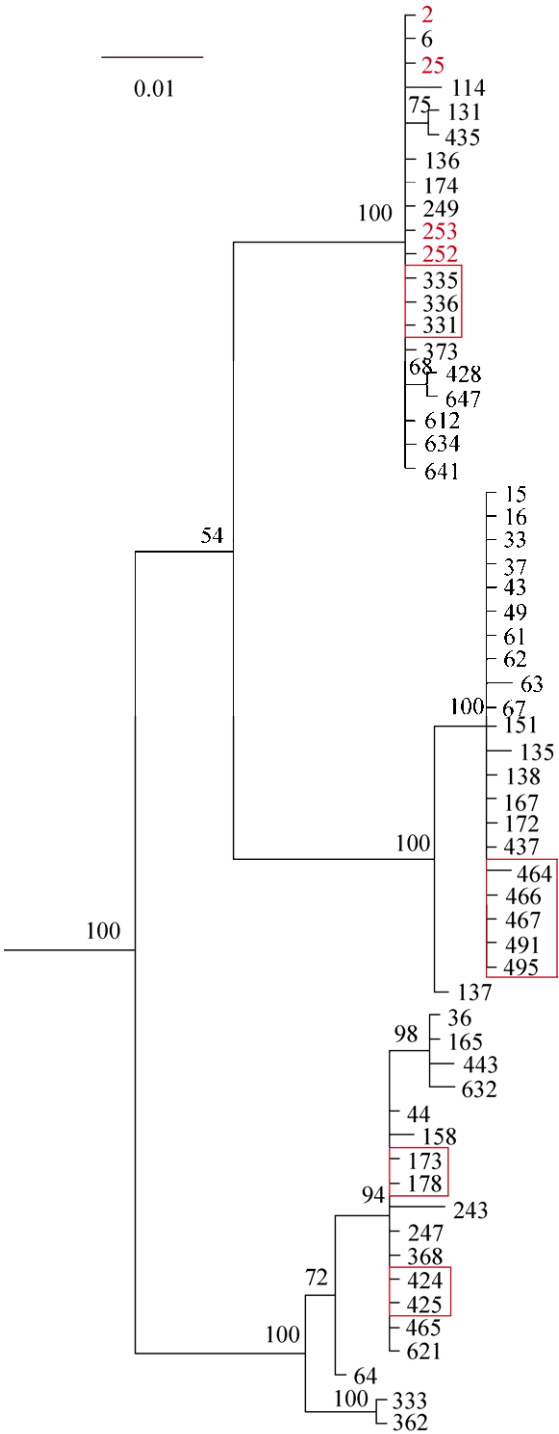


图 7 三代单孢不同分离菌株的系统发育分析结果

Fig. 7 Phylogenetic analysis of single-spore strains from three generations.

表 7 按代系划分群体的单孢菌株 *COXI* 基因 SNPs 位点间发生的重组事件
Table 7 Recombination detected between SNPs sites of *COXI* gene in different generations of single-spore strains

群体名称 Community name	共享或独有重组位点组合数目 Number of shared or unique recombination site combinations	共享或独有重组位点组合名单 List of combinations of shared or unique recombination sites
All F2 F3	8	(138,150) (414,417) (318,321) (51,57) (279,282) (297,315) (108,117) (90,96)
All F1	1	(165,168)
All F2	1	(79,84)
All F3	18	(66,79) (204,216) (285,297) (201,204) (240,255) (348,357) (276,279) (57,59) (132,138) (255,276) (96,108) (216,234) (39,51) (315,318) (18,37) (150,165) (321,336) (336,345)
F1 F3	1	(363,414)
All	6	(168,174) (283,285) (282,283) (84,90) (387,406) (117,132)
F1	4	(162,165) (168,204) (81,87) (327,363)
F2	15	(162,190) (33,37) (9,18) (9,51) (153,162) (190,279) (6,9) (117,124) (387,396) (18,21) (324,336) (126,138) (336,363) (321,324) (150,153)
F3	3	(165,177) (282,284) (79,87)

2.6 线粒体 *COXI* 基因异质性可能的原因

2.6.1 基因重组

通过 Multilocus 分析软件中的联系指数(index of association, I_A)和系统发育相容性(phylogenetic compatibility, PrC) 2 个指数对样品进行了测试。若 $I_A=0$, 且 $P>0.05$ 则表示不同位点的等位基因之间存在随机重组(即不发生连锁不平衡现象), 由于 I_A 对位点的数目十分敏感, 所以需要用到 rBarD 值进行校准。若 $I_A\neq0$, $P<0.05$ 则表示不同位点的等位基因之间不存在随机重组。若 $PrC\neq1$, 且 $P<0.01$, 则表示不同位点的等位基因之间存在系统发育不相容(即发生基因重组)。在这里需要注意的是当 $PrC\neq1$, 且 $P<0.01$ 时就提供重组的证据。三代样品的 $I_A\neq0$, $P<0.05$, 表明三代单孢菌株不存在随机重组;但是系统发育相容指数 $PrC\neq1$, $P<0.01$, 表明样品间存在除随机重组外的重组方式(表 9)。

2.6.2 线粒体基因的多拷贝

本研究的扩增结果与 YMF1.03037 线粒体

全基因组比对, 发现所有测序结果与 *COXI* 基因外显子的 122 814–123 038 bp、138 923–139 031 bp 两段加起的序列相匹配, 而剩余的片段与 131 526–131 555 bp 和 138 923–139 031 bp 随机匹配, 考虑扩增结果没有与线粒体基因组中的任何一段序列完整匹配。我们将以前研究的 *A. oligospora* 的其他 3 株菌 YMF1.02775 (MN977365)、YMF1.02765 (MN977364)和 YMF1.01883 (MK571436)的 *COXI* 基因进行了 BLAST 两两比对, 发现每 2 株菌之间的覆盖度大于 90%, 而相似度大于 99.6%。然而 YMF1.03037 与它们比对的结果显示了 50%左右的覆盖度, 并且 YMF1.03037 网上比对后发现除去与自身和前面 3 株菌的比对结果, 其他的覆盖度都非常低, 说明 YMF1.03037 的全基因组注释可能存在问题, 这也是导致我们扩增结果不能与原始菌株 *COXI* 基因出现片段化匹配的主要原因。另外, 本研究的 110 条扩增序列都与青霉属和曲霉属中的几个种的 *COXI* 基因的匹配度高达 96%–100%, 这种比对差异的原因可能是因为本研究的 YMF1.03037

菌株的 *COX1* 存在多拷贝性, 即 YMF1.03037 的线粒体基因至少有 2 种, 一种是包含与 *P. levitum* 相似的 *COX1* 基因, 另一种是包含与 *A. tubingensis* 相似的基因(图 9)。

表 8 按家系划分群体的单孢菌株 *COX1* 基因 SNPs 位点间发生的重组事件
Table 8 Recombination detected between SNPs sites of *COX1* gene in different lineages of single-spore strains

群体名称 Community name	共享或独有重组位点组合数目 Number of shared or unique recombination site combinations	共享或独有重组位点组合名单 List of combinations of shared or unique recombination sites
All L1 L2 L3 L4 L5	4	(285,297) (108,117) (318,321) (51,57)
All L1 L2 L4 L5	1	(138,150)
All L1 L3 L4 L5	1	(96,108)
All L1 L3 L4 L5	1	(39,51)
All L2 L3 L4	1	(279,282)
All L1 L2	2	(324,336) (321,324)
All L1 L2	1	(216,234)
All L1 L4	1	(90,96)
All L2 L4	2	(276,279) (414,417)
All L3 L4	1	(18,37)
L1 L4 L5	1	(79,87)
L2 L3 L5	1	(78,79)
L2 L4 L5	1	(150,153)
All L1	3	(165,168) (201,204) (315,318)
All L2	5	(283,285) (282,283) (79,84) (297,315) (336,345)
All L3	1	(150,165)
All L4	3	(204,216) (348,357) (57,59)
L1 L2	2	(9,18) (57,60)
L1 L4	1	(363,414)
L1 L5	1	(297,300)
L2 L4	1	(153,162)
L3 L4	1	(297,309)
L3 L5	2	(372,414) (57,63)
L4 L5	1	(309,315)
All	9	(66,79) (168,174) (240,255) (132,138) (117,132) (255,276) (84,90) (387,406) (321,336)
L1	10	(240,271) (124,138) (18,36) (271,276) (66,69) (60,63) (300,315) (276,282) (345,363) (150,162)
L2	11	(6,9) (117,124) (126,138) (396,399) (162,190) (87,96) (399,414) (42,51) (190,216) (387,396) (60,66)
L3	10	(165,177) (204,234) (336,357) (63,78) (123,138) (234,255) (195,204) (309,318) (81,87) (282,285)
L4	8	(162,165) (216,240) (60,79) (177,204) (333,345) (321,327) (59,60) (282,284)
L5	5	(18,27) (27,37) (279,285) (153,234) (63,69)

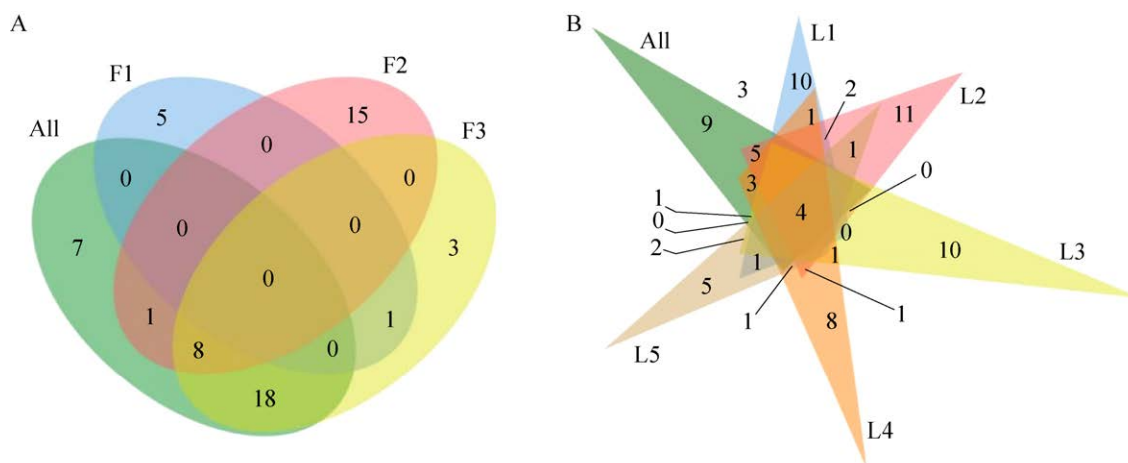


图 8 基于代系(A)和家系(B)划分群体间的 SNPs 位点间共享重组事件分析维恩图

Fig. 8 Venn diagrams of shared recombination events based on different generations (A) and lineages (B).

表 9 基于三代单孢菌株的重组分析

Table 9 Recombination analysis based on single-spore strains from three generations

样品集	rBarD 值	系统发育相容性	联系指数
Sample set	rBarD (P value)	PrC (P value)	I_A (P value)
F1 (n=5)	0.200 (<0.001)	0.985 (<0.001)	14.357 (<0.001)
F2 (n=21)	0.213 (<0.001)	0.860 (<0.001)	20.193 (<0.001)
F3 (n=84)	0.119 (<0.001)	0.659 (<0.001)	12.763 (<0.001)

Penicillium levitum strain NRRL 705 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene
Sequence ID: JN626048.1 Length: 576 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
790 bits(975)	0.0	464/490(97%)	5/490(1%)	Plus/Minus
Query 5	GGTACTCTATCTTAATCTTTTACATTATTTTCAGGATTAATAGGAACACGCTTTTCACT	64		
Sbjct 32	GGTACTCTATCTTAATCTTTTACATTATTTTCAGGATTAATAGGAACACGCTTTTCACT	90		
Query 65	ACTTATAGATTAGAGCTTTTCAGGACAGGAGTACATATATTTTACATTAATCAATATATA	124		
Sbjct 91	ACTTATAGATTAGAGCTTTTCAGGACAGGAGTACATATATTTTACATTAATCAATATATA	150		
Query 125	TAAATGATATAAATAGCTCTCATCTATAATGATGATTTTCTTATGCTTATGCGAGCTTT	184		
Sbjct 151	TAAATGATATAAATAGCTCTCATCTATAATGATGATTTTCTTATGCTTATGCGAGCTTT	210		
Query 185	AATAGCTGTTTTTCTTAATTTCTTATACCATATTAAGTGGCTGCTCGCATATGCGATT	244		
Sbjct 211	AATAGCTGTTTTTCTTAATTTCTTATACCATATTAAGTGGCTGCTCGCATATGCGATT	270		
Query 245	CCCAGATTAAATATAAAGCTTTCTGATTTATAGTGGCTGCTTATCTTATTTATATT	304		
Sbjct 271	CCCAGATTAAATATAAAGCTTTCTGATTTATAGTGGCTGCTTATCTTATTTATATT	330		
Query 305	CTCAGCAATAGCAAAATGACAGCTGACAGGATCAACATTTACCTGCTATTATGACG	364		
Sbjct 331	CTCAGCAATAGCAAAATGACAGCTGACAGGATCAACATTTATGCGCATATGCGGCG	390		
Query 365	TATACATCTGACAGCTGACAGCTGCTGATTTAGCTATATTTGCTTTACCTTAAGTGG	424		
Sbjct 391	TATACATCTGACAGCTGACAGCTGCTGATTTAGCTATATTTGCTTTACCTTAAGTGG	450		
Query 425	TATAGTACTGTTTATGCTGCTGATTTGCTGCTATACCAATATTAATATGAGAA	484		
Sbjct 451	TATAGTACTGTTTATGCTGCTGATTTGCTGCTATACCAATATTAATATGAGAA	506		

Aspergillus tubingensis WU-2223L mitochondrial DNA, complete genome
Sequence ID: LC545447.1 Length: 32393 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
830 bits(920)	0.0	175/181(99%)	1/181(0%)	Plus/Minus
Query 3	TGGTACTTTTATCTTAATCTTATGCTATTTCTGAGCTTTATAGCTACAGCATTTTCT	62		
Sbjct 26957	TGGTACTTTTATCTTAATCTTATGCTATTTCTGAGCTTTATAGCTACAGCATTTTCT	26910		
Query 63	GTACTTATAGATTAGAAATATCTGAGCTGCTGCTTCAATATATAGCTGATACCAATTA	122		
Sbjct 26909	GTACTTATAGATTAGAAATATCTGAGCTGCTGCTTCAATATATAGCTGATACCAATTA	26850		
Query 123	TATAATAGTATAAATAGAGCTCATGCTTATATGATGATTTTCTTCACTGCTTATGCGCT	182		
Sbjct 26849	TATAATAGTATAAATAGAGCTCATGCTTATATGATGATTTTCTTCACTGCTTATGCGCT	26790		
Query 183	TTAATGAGGATTTGCTTAATTTCTTATGCTTATTAAGTGGCTGCTGATATGCGA	242		
Sbjct 26789	TTAATGAGGATTTGCTTAATTTCTTATGCTTATTAAGTGGCTGCTGATATGCGA	26730		
Query 243	TTCCTAGATTAAATATATTTAGCTTATTTAGTACTGCTTATTTATTTATTTCTA	302		
Sbjct 26729	TTCCTAGATTAAATATATTTAGCTTATTTAGTACTGCTTATTTATTTATTTCTA	26670		
Query 303	TTCCTGACCAATAGCAAAATGCTGAGCTGACAGGATCAATTTATGCTTCTTTATCA	362		
Sbjct 26609	TTCCTGACCAATAGCAAAATGCTGAGCTGACAGGATCAATTTATGCTTCTTTATCA	26610		
Query 363	GCAATACATGACAGCTGACAGCTGCTGATTTAGCAATTTTCTGCTTACCTTAAGT	422		
Sbjct 26609	GCAATACATGACAGCTGACAGCTGCTGATTTAGCAATTTTCTGCTTACCTTAAGT	26550		
Query 423	GCAATAGTACTGCTTATGAGCTGATGCACTTCAACCAACCATTTAATATATGAGAA	482		
Sbjct 26549	GCAATAGTACTGCTTATGAGCTGATGCACTTCAACCAACCATTTAATATATGAGAA	26492		
Query 483	C 483			
Sbjct 26491	G 26491			

图 9 本研究的 $COX1$ 与网上发表的青霉和曲霉相关种序列的比对结果Fig. 9 The comparison results between the $COX1$ sequence of this study and the published ones from genera *Penicillium* and *Aspergillus*.

3 讨论

本研究从 *A. oligospora* 菌株中挑取的 3 代单孢代系中得到了 43 种单倍型, 在这些单倍型中只有一种单倍型同时存在于三代单孢菌株中, 表

明单倍型有可能会通过某种遗传方式在代系间进行传播, 并且这种传播可能有利于线粒体异质性的稳定性。有学者报道线粒体异质性可以经过双亲遗传在亲代之间传递, 甚至还可以经过母系遗传给后代, 这一结论早在 2008 年就在陆生动

物研究中得到了证实(Doublet *et al.* 2008)。对于捕食线虫丝孢菌 *A. oligospora* 而言,该类真菌主要以单亲遗传将 mtDNA 传给后代,且 *A. oligospora* 是单倍体,依据真菌线粒体主要以母系遗传这一规律,正常情况下 *A. oligospora* 的后代中是不会出现异质性现象的。但是 *A. oligospora* 单细胞中的线粒体基因若是多拷贝,它就会在单亲遗传的情况下将不同的 mtDNA 序列遗传给后代,这样后代就会拥有不同的 mtDNA,所以 mtDNA 多拷贝是 *A. oligospora* 出现异质性最主要的原因(Leducq *et al.* 2017)。

从 YMF1.03037 菌株中挑取的单孢代系中,可以发现随着代数的增加 F3 的杂合性呈上升的趋势,有可能是 F3 代单孢菌株个数比 F1 和 F2 多。另外,杂合位点不会随着代数的增加一直增多,只是目前三代单孢菌株未呈现杂合位点饱和的状态,越往后挑单孢且达到一定代数可能会出现 3 种情况,一是单孢菌株的杂合位点保持在一个水平即杂合性达到饱和状态;二是杂合性下降并且消失即达到同质的状态;三是杂合性呈无规则的“波浪式”变化。另外,对于动物、真菌等真核生物来说异质性似乎已经成为了一种普遍的现象,无论是在动物的线粒体基因 *COXI*,还是在真菌的线粒体基因 *cyt b* 中都报道了异质性存在的案例(Hashimoto *et al.* 2015; Rodríguez-Pena *et al.* 2020)。异质性是物种系统发育分析中需要考虑的重要方面,因为异质性的存在可能会导致有效群体规模被高估,从而产生错误的结果;异质性也会增加真菌对抗菌药物的耐药性,如丝状真菌 *Leveillula taurica* 由于突变导致的 *cyt b* 异源性对杀菌剂醌类外部抑制剂(quinone outside inhibitor fungicides, QoIs)产生耐药(Mosquera *et al.* 2019)。然而,线粒体是真菌基本功能的决定因素,在生物生长发育过程中具有诸多意义,例如线粒体在真菌衰老中起重要作用,在高等真核生物中还存在对 DNA 损伤或

DNA 损伤信号的不可逆细胞周期阻滞,所以线粒体异质性将是重要的研究方向。

[REFERENCES]

- Albertin W, da Silva T, Rigoulet M, Salin B, Masneuf-Pomarede I, de Vienne D, Sicard D, Bely M, Marullo P, 2013. The mitochondrial genome impacts respiration but not fermentation in interspecific *Saccharomyces* hybrids. *PLoS One*, 8(9): e75121
- Beaudet D, Nadimi M, Iffis B, Hijri M, 2013a. Rapid mitochondrial genome evolution through invasion of mobile elements in two closely related species of arbuscular mycorrhizal fungi. *PLoS One*, 8(4): e60768
- Beaudet D, Terrat Y, Halary S, de la Providencia IE, Hijri M, 2013b. Mitochondrial genome rearrangements in *Glomus* species triggered by homologous recombination between distinct mtDNA haplotypes. *Genome Biology and Evolution*, 5(9): 1628-1643
- Breton S, Stewart DT, 2015. Atypical mitochondrial inheritance patterns in eukaryotes. *Genome*, 58(10): 423-431
- Brown AHD, Feldman MW, Nevo E, 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, 96(2): 523-536
- Charles G, Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM, 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10): e312
- Deising HB, Reimann S, Pascholati SF, 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2): 286-295
- Dentinger BTM, Didukh MY, Moncalvo JM, 2011. Comparing *COI* and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). *PLoS One*, 6(9): e25081
- Doublet V, Souty-Grosset C, Bouchon D, Cordaux R, Marcadé I, 2008. A thirty million year-old inherited heteroplasmy. *PLoS One*, 3(8): e2938
- Fritsch ES, Chabbert CD, Klaus B, Steinmetz LM, 2014. A genome-wide map of mitochondrial DNA recombination in yeast. *Genetics*, 198(2): 755-771
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA, 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59: 1-10
- Gilmore SR, Gräfenhan T, Louis-Seize G, Seifert KA, 2010. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources*, 9(s1): 90-98
- Hashimoto M, Aoki Y, Saito S, Suzuki S, 2015.

- Characterisation of heteroplasmic status at codon 143 of the *Botrytis cinerea* cytochrome *b* gene in a semi-quantitative AS-PCR assay. *Pest Management Science*, 71(3): 467-477
- Hauswirth WW, Laipis PJ, 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(15): 4686-4690
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270(1512): 313-321
- Hsueh YP, Mahanti P, Schroeder FC, Sternberg PW, 2013. Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Current Biology*, 23(1): 83-86
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8): 754-755
- Ishii H, Yano K, Date H, Furuta A, Sagehashi Y, Yamaguchi T, Sugiyama T, Nishimura K, Hasama W, 2007. Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology*, 97(11): 1458-1466
- Kvist L, Martens J, Nazarenko AA, Orell M, 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Molecular Biology and Evolution*, 20(2): 243-247
- Leducq JB, Henault M, Charron G, Nielly-Thibault L, Terrat Y, Fiumera HL, Shapiro BJ, Landry CR, 2017. Mitochondrial recombination and introgression during speciation by hybridization. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8): 1947-1959
- Lesemann SS, Schimpke S, Dunemann F, Deising HB, 2006. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome *b* gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(6): 259-266
- Li Y, Hyde KD, Jeewon R, Cai L, Vijaykrishna D, Zhang KQ, 2005. Phylogenetics and evolution of nematode-trapping fungi (Orbiliaceae) estimated from nuclear and protein coding genes. *Mycologia*, 97(5): 1034-1046
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452
- Molitor C, Inthavong B, Sage L, Geremia RA, Mouhamadou B, 2010. Potentiality of the *coxI* gene in the taxonomic resolution of soil fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 302(1): 76-84
- Mosquera S, Chen LH, Aegerter B, Miyao E, Salvucci A, Chang TC, Epstein L, Stergiopoulos I, 2019. Cloning of the cytochrome *b* gene from the tomato powdery mildew fungus *Leveillula taurica* reveals high levels of allelic variation and heteroplasmy for the G143A mutation. *Frontiers in Microbiology*, 10: 663
- Nadimi M, Beaudet D, Forget L, Hijri M, Lang BF, 2012. Group I intron-mediated trans-splicing in mitochondria of *Gigaspora rosea* and a robust phylogenetic affiliation of arbuscular mycorrhizal fungi with mortierellales. *Molecular Biology and Evolution*, 29(9): 2199-2210
- Nguyen HDT, Seifert KA, 2008. Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States. *Persoonia*, 21: 57-69
- Niu XM, Zhang KQ, 2011. *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology*, 2(2): 59-78
- Nylander J, 2004. MrModeltest V2. program distributed by the author. *Bioinformatics*, 24: 581-583
- Peakall R, Smouse PE, 2010. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288-295
- Robideau GP, de Cock AW, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen EC, Zhang Y, Bonants PJ, Ristaino JB, Lévesque CA, 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6): 1002-1011
- Rodríguez-Pena E, Verísimo P, Fernández L, González-Tizón A, Bárcena C, Martínez-Lage A, 2020. High incidence of heteroplasmy in the mtDNA of a natural population of the spider crab, *Maja brachydactyla*. *PLoS One*, 15(3): e0230243
- Rong ZY, Tu PP, Xu PQ, Sun Y, Yu FF, Tu N, Guo LX, Yang YN, 2021. The mitochondrial response to DNA damage. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9: 669379
- Rubner A, 1996. Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. *Studies in Mycology*, 39: 1-129
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16): 6241-6246
- Seena S, Marvanová L, Letourneau A, Bärlocher F, 2018. *Articulospora* — phylogeny vs morphology. *Fungal Biology*, 122(10): 965-976

- Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, Houbraken J, Lévesque CA, Moncalvo JM, Louis-Seize G, Hebert PDN, 2007. Prospects for fungus identification using CO₁ DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(10): 3901-3906
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25(24): 4876-4882
- Villani SM, Cox KD, 2014. Heteroplasmy of the cytochrome *b* gene in *Venturia inaequalis* and its involvement in quantitative and practical resistance to trifloxystrobin. Phytopathology, 104(9): 945-953
- Wang PF, Sha T, Zhang YR, Cao Y, Mi F, Liu CL, Yang D, Tang XZ, He XX, Dong JY, Wu JY, Yoell S, Yoell L, Zhang KQ, Zhang Y, Xu JP, 2017. Frequent heteroplasmy and recombination in the mitochondrial genomes of the basidiomycete mushroom *Thelephora ganbajun*. Scientific Reports, 7(1): 1626
- Waugh J, 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. BioEssays, 29(2): 188-197
- White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ, 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. Molecular Ecology, 17(23): 4925-4942
- Wilson AJ, Xu JP, 2012. Mitochondrial inheritance: diverse patterns and mechanisms with an emphasis on fungi. Mycology, 3(2):158-166
- Yang E, Xu LL, Yang Y, Zhang XY, Xiang MC, Wang CS, An ZQ, Liu XZ, 2012. Origin and evolution of carnivorism in the Ascomycota (fungi). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(27): 10960-10965
- Yang Y, Yang E, An ZQ, Liu XZ, 2007. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(20): 8379-8384
- Zhang Y, Wang SJ, Li HX, Liu CL, Mi F, Wang RR, Mo MZ, Xu JP, 2021. Evidence for persistent heteroplasmy and ancient recombination in the mitochondrial genomes of the edible yellow chanterelles from southwestern China and Europe. Frontiers in Microbiology, 12: 699598
- Zhang Y, Yang GZ, Fang ML, Deng C, Zhang KQ, Yu ZF, Xu JP, 2020. Comparative analyses of mitochondrial genomes provide evolutionary insights into nematode-trapping fungi. Frontiers in Microbiology, 11: 617
- Zhang Y, Zhang YR, Dong JY, He XX, Qiao M, Baral HO, Zhang KQ, Yu ZF, 2016. *Orbilia tianmushanensis* sp. nov., a new member of the *O. luteorubella* group with an unusual asexual morph. Journal of Microbiology, 54(1): 9-13
- Zhou D, Korfanty GA, Mo M, Wang R, Li X, Li H, Li S, Wu JY, Zhang KQ, Zhang Y, Xu J, 2021. Extensive genetic giversity and widespread azole resistance in greenhouse populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. mSphere, 6(1): e00066-21