

蝙蝠蛾鳞翅虫草 *Samsoniella hepiali* 模式菌株线粒体基因组系统发育分析

孙涛^{1,2}, 李天昊^{1,2}, 黄偶^{1,2}, 祝孔福¹, 陈思琪¹, 王雅南³, 王垚¹, 王元兵¹, 虞泓^{1*}

1 云南大学生态与环境学院云百草实验室, 云南 昆明 650500

2 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

3 中国中医科学院中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

摘 要: 蝙蝠蛾鳞翅虫草 *Samsoniella hepiali* 是重要的药用虫生真菌, 根据现代分类系统, 隶属于虫草科 Cordycipitaceae 鳞翅虫草属 *Samsoniella*。本研究对蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组进行测序、组装和注释, 发现其线粒体基因组成闭合环状, 大小为 24 246 bp。基因区域占比为 85.10%, 共编码 42 个基因, 包括 15 个蛋白质编码基因(PCGs)、2 个 rRNA 基因和 25 个 tRNA 基因。15 个 PCGs 均以 ATG 为起始密码子, 以 TAA 为终止密码子, 偏好密码子为 UUA。各氨基酸使用频率具有较大差异, 其中亮氨酸(Leu)出现频率最高。25 个 tRNA 基因可转运全部 20 种氨基酸, 其中 19 个 tRNA 基因二级结构为三叶草结构。本研究基于线粒体基因组中 14 个 PCGs 基因串联数据集, 构建肉座菌目 6 科 50 个物种的系统发育树, 进一步证实蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株系统发育位置隶属于肉座菌目 Hypocreales 虫草科 Cordycipitaceae 鳞翅虫草属 *Samsoniella*。通过虫草科线粒体基因组共线性分析, 发现其中 12 个物种有 5 个同源区, 3 个物种存在 6 个同源区, 同源区域 A 和 B 长度变异较大。与其他虫草科物种相比, 蝙蝠蛾鳞翅虫草线粒体基因组较小, 同源区域相对较短。蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组信息有助于鉴别其物种特异性, 确定其系统发育关系, 将为虫草系统发育研究提供新思路, 为继续研究鳞翅虫草属物种药用价值提供系统发育依据。

关键词: 蝙蝠蛾鳞翅虫草; 虫草科; 线粒体基因组; 系统发育

[引用本文] 孙涛, 李天昊, 黄偶, 祝孔福, 陈思琪, 王雅南, 王垚, 王元兵, 虞泓, 2022. 蝙蝠蛾鳞翅虫草 *Samsoniella hepiali* 模式菌株线粒体基因组系统发育分析. 菌物学报, 41(10): 1572-1584

Sun T, Li TH, Huang O, Zhu KF, Chen SQ, Wang YN, Wang Y, Wang YB, Yu H, 2022. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome of the *Samsoniella hepiali* holotype strain. Mycosystema, 41(10): 1572-1584

基金项目: 国家自然科学基金(31870017); 云南省科技厅项目[2018FY001(-006)]

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870017) and Yunnan Provincial Science and Technology Department Project [2018FY001(-006)].

*Corresponding author. E-mail: hongyu@ynu.edu.cn

Received: 2022-01-20, accepted: 2022-02-24

Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome of the *Samsoniella hepiali* holotype strain

SUN Tao^{1,2}, LI Tianhao^{1,2}, HUANG Ou^{1,2}, ZHU Kongfu¹, CHEN Siqi¹, WANG Yanan³, WANG Yao¹, WANG Yuanbing¹, YU Hong^{1*}

1 Yunnan Herbal Laboratory, School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

3 State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: *Samsoniella hepiali* is an incredibly valuable medicinal entomogenous fungus, belonging to *Samsoniella* of Cordycipitaceae. The mitochondrial genome of *S. hepiali* holotype strain ICMM 82-2 was sequenced, assembled, and annotated. It was found that the mitochondrial genome was a circular DNA molecule with 24 246 bp in length. The gene regions accounted for 85.10%, encoded 42 genes, containing 15 PCGs, 2 rRNA and 25 tRNAs. ATG was the start codon, and TAA was the end codon of 15 PCGs. The preferred codon was UUA. There were significant differences in the frequencies of amino acids in the PCGs, and Leu had the highest frequency. The 25 tRNAs coded for all 20 amino acids, and 19 tRNA genes adopted a typical cloverleaf structure. The 14 concatenated mitochondrial PCG genes' phylogenetic trees consisting of 50 species of 6 families in Hypocreales were built for studying the systematic position of *S. hepiali* holotype strain. The results showed that *S. hepiali* holotype strain belonged to *Samsoniella* of Cordycipitaceae in Hypocreales. Collinearity analysis of the mitochondrial genome of Cordycipitaceae showed that the number of homologous regions in 12 species was five and that of the other 3 species was six, and the length of homologous regions A and B was different. Compared with the other species, *S. hepiali* mitochondrial genome has smaller and shorter homologous regions. Based on analyzing the mitochondrial genome of *S. hepiali* holotype strain, this study once again confirmed the phylogenetic position of *S. hepiali*, providing important data of phylogeny for the future studies of *Samsoniella* with medicinal value.

Keywords: *Samsoniella hepiali*; Cordycipitaceae; mitochondrial genome; phylogenetic analysis

蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Q.T. Chen & R.Q. Dai 按照现代分类系统应改隶虫草科 Cordycipitaceae 鳞翅虫草属 *Samsoniella*, 称为蝙蝠蛾鳞翅虫草 *Samsoniella hepiali* (Q.T. Chen & R.Q. Dai ex R.Q. Dai *et al.*) H. Yu, R.Q. Dai, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang. 该虫草真菌从云南省迪庆藏族自治州德钦县白马雪山冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sung *et al.* 中分离, 戴如琴等(1989)命名为蝙蝠蛾拟青

霉 *P. hepiali*, 戴如琴等(2008)指定原菌株干培养物 ICMM82-2 为模式菌株, 并进行该菌名称合格化处理, 蝙蝠蛾拟青霉被有效发表。Wang *et al.* (2020)利用 5 基因(包括 *nrSSU*、*nrLSU*、*tef-1α*、*rpb1* 和 *rpb2*)重构虫草科分子系统发育树, 确定该物种的系统发育位置隶属于鳞翅虫草属, 并将该物种修订为 *S. hepiali*, 为了更好地保护和发展中国虫草生物医药产业, 提议其中文名称为蝙蝠蛾鳞翅虫草。蝙蝠蛾鳞翅虫草具有增强免疫力

(张洁宏等 2013; Jung *et al.* 2019), 抗菌消炎(魏涛等 2002), 保护肺、肝、肾和睾丸等器官(李娜和郭素萍 2019; 闫俊 2019), 抑制肿瘤(姜磊等 2010), 预防和治疗心脑血管疾病、糖尿病和抑郁症等功效(Wang *et al.* 2017; Ge *et al.* 2018; 高寒等 2019)。目前人工发酵蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体已被开发成多种药物, 主要药品如金水宝胶囊等(曹阳等 2019; 陆海峰等 2020)。

线粒体基因组由于具有高拷贝数、低突变率和进化速度快等特点, 是研究物种起源、分类和进化等的有效工具(Alexeyev *et al.* 2013; Aguilera *et al.* 2014; Williams *et al.* 2014)。其结构特征、排列顺序等可作为物种分类的重要依据(Gordon *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2017)。真菌线粒体基因组在不同物种间存在明显差异(Nie *et al.* 2019)。利用线粒体基因组进行遗传发育分析, 能够鉴别遗传较近的真菌物种。目前 NCBI 已公布 680 余种真菌线粒体基因组数据, 含肉座菌目 60 余种, 虫草科 10 余种, 大量虫草科物种线粒体基因组仍尚未报道(Chen *et al.* 2021; Zhao *et al.* 2021)。

本研究将对蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组进行测序、组装和注释, 并对其基因结构特征、蛋白质编码基因、密码子使用情况以及 tRNA 基因等进行分析, 结合 GenBank 数据库肉座菌目 50 个物种线粒体基因组, 将散囊菌目 Eurotiales 与粪壳菌目 Sordariales 作为外类群, 构建肉座菌目线粒体基因组系统发育框架, 探讨蝙蝠蛾鳞翅虫草系统发育位置, 并与虫草科其他物种线粒体基因组进行比较, 分析虫草科物种线粒体基因组间差异。

1 材料与方法

1.1 蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)

本研究所用蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)由中国中医科学院中药研究所提供。将

模式菌株接种至 PDA 培养基(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L), 室温培养 7 d。

1.2 基因组 DNA 提取

刮取适量蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株菌丝体, 使用 ZR Fungal DNA Kit (Catalogue number D6005) 试剂盒法提取其基因组 DNA。利用 Qubit 荧光定量仪(Thermo Scientific)检测基因组 DNA 浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.3 全基因组测序

基因组 DNA 置于干冰中运输至武汉华大基因股份有限公司进行全基因组测序。利用 Illumina Truseq™ DNA Sample Preparation Kit (BGI)试剂盒法构建全基因组测序文库。于 Illumina HiSeq 4000 平台对文库进行全基因组测序, 测序完成后去除低质量序列、接头序列等质量较差 Reads 获得 Clean data, 以 FASTQ 格式存储(Zhao *et al.* 2021)。

1.4 线粒体基因组组装和注释

使用软件 GetOrganelle v.1.6.2e 获取全基因组测序结果 Clean data 线粒体基因组 Reads, 使用软件 BLAST 2.2.30 和 SPAdes. V.3.13.0 进行线粒体基因组组装, 使用软件 Organellar Genome DRAW tool 绘制图谱。运用在线软件 GeSeq 对线粒体基因组进行基本注释, 使用软件 MITOS 和 MFannot 进行人工校正后用网络服务器 ARWEN 完成注释(Valach *et al.* 2014; Jin *et al.* 2020; Chen *et al.* 2021)。测序、组装和注释结果上传至 GenBank 数据库, 序列登录号为 OM117588。

1.5 线粒体基因组结构分析

运用软件 MEGA7 统计线粒体基因组序列中 AT 和 GC 含量, 使用软件 EditSeq 统计 PCGs 起始密码子和终止密码子, 按公式 $AT\ skew = \frac{(A-T)}{(A+T)}$ 和 $GC\ skew = \frac{(G-C)}{(G+C)}$ 评估链不对称性。使用在线软件 tRNAscan-SE2.0 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/index.html>)对 tRNA 基因进行分析并绘制 tRNA 基因二级结构图, 通过软件 Sequence Manipulation Suite 和 Codon

W1.4.4 绘制密码子使用率柱状图,统计密码子使用率。运用软件 KaKs Calculator2.0 计算 PCGs 同义突变率(Ks)与非同义突变率(Ka),运用 Mauve v2.4.0 软件开展虫草科物种间共线性分析(Chen *et al.* 2019; Stothard 2000; Chen *et al.* 2021)。

1.6 系统发育分析

为确定蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)系统发育位置,从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载肉座菌目 50 个物种线粒体基因组序列,结合本实验室 *Cordyceps farinosa* (Holmsk.) Kepler *et al.*菌株 YFCC8744 线粒体基因组序列(菌株 YFCC8744 的 rDNA 内转录间隔区 ITS 序列和 RNA 聚合酶 II 第二大亚基 RPB2 序列已提交到 GenBank 中,序列登录号分别为 OM281827 和 OM304363。经 Blast 对比,菌株 YFCC8744 的 ITS 序列和 RPB2 序列与 *C. farinosa* 模式菌株 CBS111113 相似度达 100%,形态特征相似,故将该菌株鉴定为 *C. farinosa*,其线粒体基因组 GenBank 序列登录号为 OM201302),以散囊菌目 Eurotiales 曲霉科 Aspergillaceae 物种 *Penicillium citrinum* 与粪壳菌目 Sordariales 粪壳菌科 Sordariaceae 物种 *Neurospora crassa* 为外类群(附表 1),将线粒体基因组 14 个蛋白质编码基因(PCGs)串联(包括 *cob*、*cox1*、*cox2*、*cox3*、*atp6*、*atp8*、*atp9*、*nad1*、*nad2*、*nad3*、*nad4*、*nad4L*、*nad5* 和 *nad6*),使用软件 MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003)和 RaxML 7.0.3 构建系统发育树(Chen *et al.* 2021; Zhao *et al.* 2021)。

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组结构特征

蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组成闭合环状,大小为 24 246 bp (图 1)。线粒体基因组 AT 含量占比为 73.4%,GC 含量

占比为 26.6%。基因区域占比为 85.10%,共编码 42 个基因(表 1),包括 15 个蛋白质编码基因(*nad6*、*rps3*、*nad2*、*nad3*、*atp9*、*cox2*、*nad4L*、*nad5*、*cob*、*cox1*、*nad1*、*nad4*、*atp8*、*atp6* 和 *cox3*)、2 个核糖体 RNA (rRNA)基因(*rnl* 和 *rns*)和 25 个转运 RNA (tRNA)基因。25 个 tRNA 基因长度范围为 71–85 bp, rRNA 基因中 *rnl* 长度为 4 818 bp, *rns* 长度为 1 475 bp。在基因区域中 42 个编码基因排列较为紧密,但仍存在基因间区。基因间区占比为 12.63%,共存在 39 个基因间区区域,最长基因间区在 *trnR*-TCT 与 *nad1* 间,长度为 596 bp。在蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组中, *rps3* 嵌入至 *rnl* 基因区域中, *nad2* 与 *nad3* 重叠 1 bp, *nad4L* 与 *nad5* 重叠 1 bp,其余基因区域不存在基因重叠现象。

2.2 蛋白质编码基因及密码子使用情况

蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组中共有 15 个蛋白质编码基因(PCGs),全长为 14 340 bp,包括 3 个细胞色素 c 氧化酶亚基基因(*cox1*、*cox2* 和 *cox3*)、3 个 ATP 合成酶亚基基因(*atp6*、*atp8* 和 *atp9*)、1 个细胞色素 b 基因(*cob*)、7 个 NADH 脱氢酶复合物亚基基因(*nad1*、*nad2*、*nad3*、*nad4*、*nad5*、*nad6* 和 *nad4L*)以及 1 个核糖体蛋白 S3 基因(*rps3*) (图 1, 表 1)。其中,最长的 *nad5* 为 1 983 bp,最短的 *atp8* 为 147 bp (表 1)。15 个 PCGs 均以 ATG 为起始密码子,以 TAA 为终止密码子(表 1)。

各氨基酸在蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组编码蛋白中使用频率具有较大差异(图 2),其中亮氨酸(Leu)出现频率最高,其次为异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)和丝氨酸(Ser)。而赖氨酸(Lys)、谷氨酸(Glu)、蛋氨酸(Met)、脯氨酸(Pro)、天冬氨酸(Asp)、组氨酸(His)、谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)、半胱氨酸(Cys)和色氨酸(Trp) 10 种氨基酸使用频率相对较低,占比均小于 5%,其中 Cys 仅占 0.59%。

蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组PCGs 密码子使用情况见表 2, 15 个 PCGs 共使用 4 774 次密码子(不含终止密码子使用次数), 其中使用次数最多的密码子为 UUA、AUA、

UUU 和 AAU。根据相对同义密码子使用度(relative synonymous codon usage, RSCU), 偏好使用的密码子依次是 UUA (5.56)、AGA (5.2)、CCU (2.68)和 GUA (2.67)。

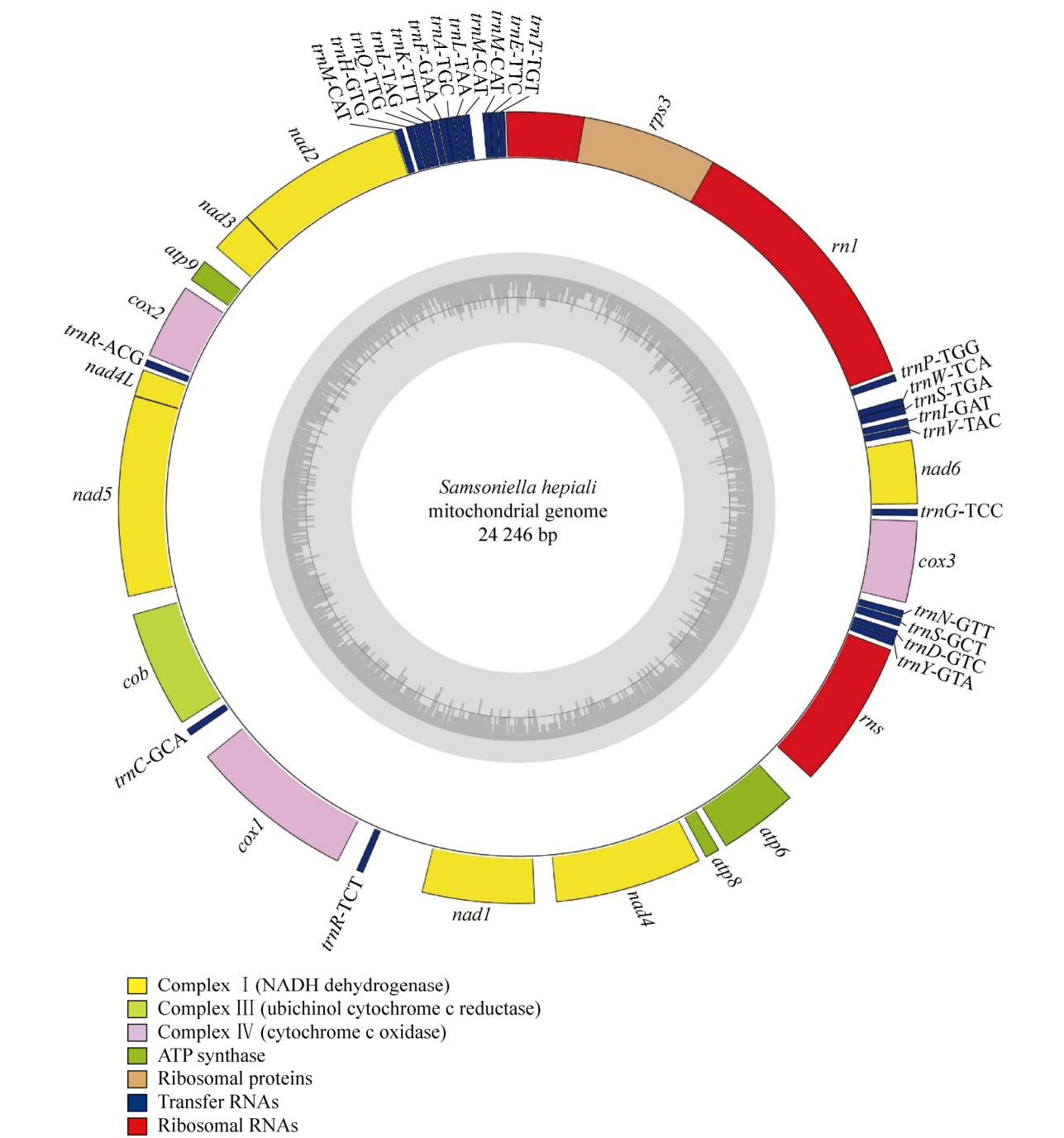


图 1 蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组图谱

Fig. 1 The circular map of the complete mitochondrial genome of *Samsoniella hepiali* holotype strain (ICMM 82-2).

表 1 蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组基因组成

Table 1 Gene composition of the complete mitochondrial genome of *Samsoniella hepiali* holotype strain (ICMM 82-2)

基因 Gene	区域 Region	总长 Length (bp)	基因间区 Intergenic length (bp)	起始密码子 Start codon	终止密码子 End codon	反密码子 Anticodon
<i>nad6</i>	35–667	633	47	ATG	TAA	—
<i>trnV</i> -TAC	729–800	72	61	—	—	TAC
<i>trnI</i> -GAT	808–879	72	7	—	—	GAT
<i>trnS</i> -TGA	924–1 008	85	44	—	—	TGA
<i>trnW</i> -TCA	1 010–1 081	72	1	—	—	TCA
<i>trnP</i> -TGG	1 254–1 325	72	172	—	—	TGG
<i>rnl</i>	1 358–6 175	4 818	32	—	—	—
<i>rps3</i>	4 087–5 418	1 332	—	ATG	TAA	—
<i>trnT</i> -TGT	6 188–6 258	71	12	—	—	TGT
<i>trnE</i> -TTC	6 262–6 333	72	3	—	—	TTC
<i>trnM</i> -CAT	6 335–6 405	71	1	—	—	CAT
<i>trnM</i> -CAT	6 530–6 602	73	124	—	—	CAT
<i>trnL</i> -TAA	6 606–6 687	82	3	—	—	TAA
<i>trnA</i> -TGC	6 691–6 762	72	3	—	—	TGC
<i>trnF</i> -GAA	6 764–6 836	73	1	—	—	GAA
<i>trnK</i> -TTT	6 842–6 914	73	5	—	—	TTT
<i>trnL</i> -TAG	6 922–7 005	84	7	—	—	TAG
<i>trnQ</i> -TTG	7 009–7 081	73	3	—	—	TTG
<i>trnH</i> -GTG	7 086–7 159	74	4	—	—	GTG
<i>trnM</i> -CAT	7 197–7 268	72	37	—	—	CAT
<i>nad2</i>	7 276–8 940	1 665	7	ATG	TAA	—
<i>nad3</i>	8 940–9 359	420	–1	ATG	TAA	—
<i>atp9</i>	9 534–9 758	225	174	ATG	TAA	—
<i>cox2</i>	9 850–10 599	750	91	ATG	TAA	—
<i>trnR</i> -ACG	10 642–10 712	71	42	—	—	ACG
<i>nad4L</i>	10 749–11 018	270	36	ATG	TAA	—
<i>nad5</i>	11 018–13 000	1 983	–1	ATG	TAA	—
<i>cob</i>	13 177–14 337	1 161	176	ATG	TAA	—
<i>trnC</i> -GCA	14 417–14 488	72	106	—	—	GCA
<i>cox1</i>	14 773–16 380	1 608	257	ATG	TAA	—
<i>trnR</i> -TCT	16 579–16 649	71	198	—	—	TCT
<i>nad1</i>	17 246–18 349	1 104	596	ATG	TAA	—
<i>nad4</i>	18 556–20 004	1 449	206	ATG	TAA	—
<i>atp8</i>	20 074–20 220	147	69	ATG	TAA	—
<i>atp6</i>	20 295–21 077	783	74	ATG	TAA	—
<i>rns</i>	21 356–22 830	1 475	278	—	—	—
<i>trnY</i> -GTA	22 871–22 953	83	40	—	—	GTA
<i>trnD</i> -GTC	22 957–23 029	73	3	—	—	GTC
<i>trnS</i> -GCT	23 072–23 152	81	42	—	—	GCT
<i>trnN</i> -GTT	23 161–23 231	71	8	—	—	GTT
<i>cox3</i>	23 309–24 118	810	77	ATG	TAA	—
<i>trnG</i> -TCC	24 163–24 233	71	44	—	—	TCC

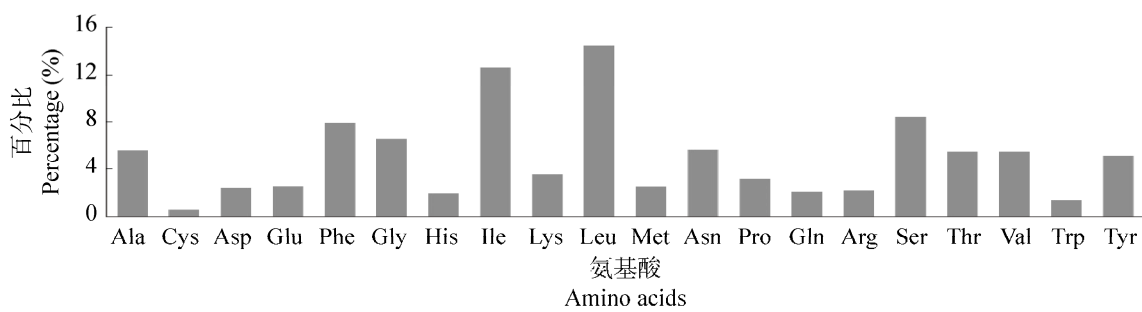


图 2 各氨基酸在蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组编码蛋白中使用频率
Fig. 2 The frequencies of amino acids in the PCGs of the complete mitochondrial genome of *Samsoniella hepiali* holotype strain (ICMM 82-2).

表 2 蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组 PCGs 密码子使用情况
Table 2 Codon usage in PCGs of the complete mitochondrial genome of *Samsoniella hepiali* holotype strain (ICMM 82-2)

氨基酸	密码子	使用次数	相对同义密码子使用度 RSCU	氨基酸	密码子	使用次数	相对同义密码子使用度 RSCU
Amino acid	Codon	N		Amino acid	Codon	N	
Stop codon	UAA	15	2.00	Asn	AAU	236	1.74
	UAG	0	0.00		AAC	35	0.26
Ala	GCU	157	2.33	Pro	CCU	102	2.68
	GCC	17	0.25		CCC	5	0.13
	GCA	87	1.29		CCA	42	1.11
	GCG	8	0.12		CCG	3	0.08
Cys	UGU	25	1.79	Gln	CAA	93	1.86
	UGC	3	0.21		CAG	7	0.14
Asp	GAU	105	1.83	Arg	AGA	91	5.20
	GAC	10	0.17		AGG	0	0.00
Glu	GAA	115	1.90		CGU	14	0.80
	GAG	6	0.10		CGC	0	0.00
Phe	UUU	257	1.36		CGA	0	0.00
	UUC	122	0.64		CGG	0	0.00
Gly	GGU	174	2.22	Ser	AGU	162	2.42
	GGC	1	0.01		AGC	14	0.21
	GGA	117	1.49		UCU	95	1.42
	GGG	22	0.28		UCC	1	0.01
His	CAU	85	1.83		UCA	125	1.87
	CAC	8	0.17		UCG	5	0.07
Ile	AUU	194	0.96	Thr	ACU	111	1.68
	AUC	33	0.16		ACC	1	0.02
	AUA	377	1.87		ACA	150	2.27
Lys	AAA	161	1.91		ACG	2	0.03
	AAG	8	0.09	Val	GUU	72	1.09
Leu	UUA	640	5.56		GUC	1	0.02
	UUG	20	0.17		GUA	176	2.67
	CUU	22	0.19		GUG	15	0.23
	CUC	0	0.00	Trp	UGA	66	2.00
	CUA	9	0.08		UGG	0	0.00
	CUG	0	0.00	Tyr	UAU	225	1.82
Met	AUG	120	1.00		UAC	22	0.18

2.3 tRNA 基因及二级结构

蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组中存在 25 个 tRNA 基因，分布较为集中，*rnl* 和 *nad2* 间集中分布 12 个 tRNA 基因，*nad6* 和 *rnl* 间集中分布 5 个 tRNA 基因，*rns* 和 *cox3* 间集中分布 4 个 tRNA 基因，其余 4 个分别分布在 *cox2* 和 *nad4L* 间、*cob* 和 *cox1* 间、*cox1* 和 *nad1* 间以及 *cox3* 和 *nad6* 间(图 1，表 1)。

蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组中

25 个 tRNA 基因可转运全部 20 种氨基酸，除 *trnH*-GTG、*trnL1*-TAG、*trnL2*-TAA、*trnM*-CAT、*trnS1*-GCT 以及 *trnS2*-TGA 外，其余 19 个 tRNA 基因二级结构均为三叶草结构(图 3)。其中，*trnL1*-TAG、*trnL2*-TAA、*trnS1*-GCT 和 *trnS2*-TGA 二级结构中均存在一个额外环。25 个 tRNA 基因二级结构中，共存在 12 处碱基错配，其中 4 处 U-U 错配、2 处 G-G 错配、2 处 G-U 错配、2 处 A-U 错配、1 处 C-U 错配以及 1 处 A-C 错配。

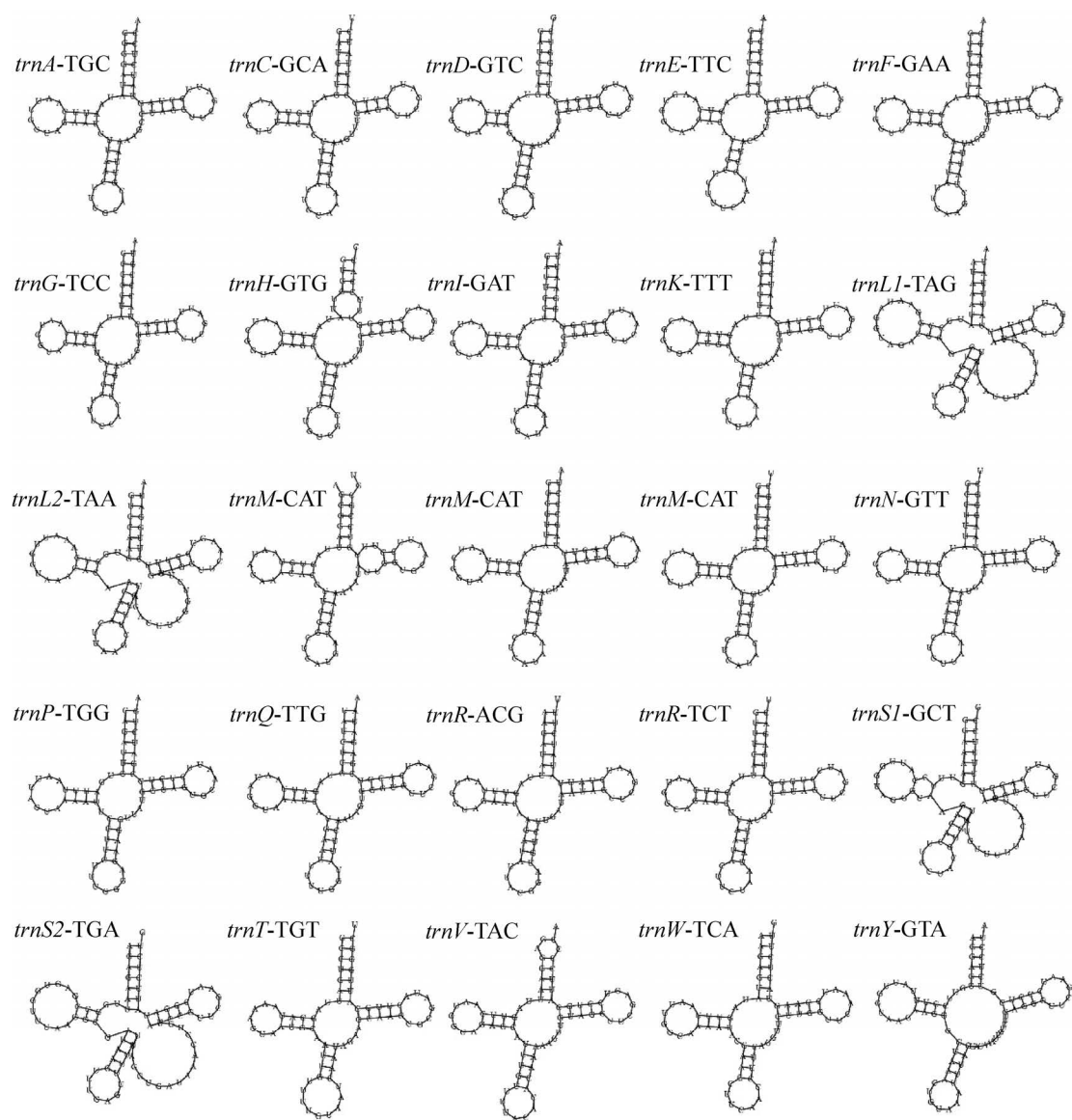


图 3 蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)线粒体基因组 tRNA 结构预测

Fig. 3 The predicted tRNA structures of the complete mitochondrial genome of *Samsoniella hepiali* holotype strain (ICMM 82-2).

2.4 肉座菌目线粒体基因组系统发育分析

为分析蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株系统发育位置,构建肉座菌目6科(生赤壳科 Bionectriaceae、肉座菌科 Hypocreaceae、线虫草科 Ophiocordycipitaceae、麦角菌科 Clavicipitaceae、虫草科 Cordycipitaceae 以及丛赤壳科 Nectriaceae) 50 个物种线粒体基因组 14 个 PCGs 基因系统发育树(图 4)。蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株系统发育位置位于肉座菌目虫草科,与 Wang *et al.* (2014) 发表的蝙蝠蛾鳞翅虫草线粒体基因组(GenBank 号: KJ764671)聚为一支,亲缘关系最近,但根据分支长短判断,二者仍具有一定差异,推测为种内差异。本研究所构线粒体系统发育树确定的蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株系统发育位置与 Wang *et al.* (2020) 利用 5 基因构建系统发育树确定的位置基本一致,推测蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(GenBank 登录号: OM117588)与蝙蝠蛾鳞翅虫草(GenBank 登录号: KJ764671)所在分支为鳞翅虫草属。

2.5 虫草科线粒体基因组共线性分析

蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(GenBank 登录号: OM117588)与蝙蝠蛾鳞翅虫草(GenBank 登录号: KJ764671)以及虫草科其他 14 个物种线粒体基因组共线性分析见图 5,进行共线性分析的虫草科物种均存在 5 个同源区域(A、B、C、D 和 E),其中 C、D 和 E 3 个区域较为保守, A 和 B 两个区域长度存在一定变异,且每个同源区长度均存在一定差异。而 *Parengyodontium album* (GenBank 登录号: KX061492)、*Cordyceps tenuipes* (GenBank 登录号: MK234910) 和 *Beauveria malawiensis* (GenBank 登录号: NC030635) 存在同源区域 F, 该区域存在基因重排。*Cordyceps farinose* (GenBank 登录号: OM201302) 的 D 和 E 区域位置与其他虫草科物种相反。与其他虫草科物种相比,蝙蝠蛾鳞翅虫草(GenBank 登录号: OM117588 与 KJ764671)的基因组较小,同源区域相对较短。由此可见,虫草科物种间变异与线

粒体基因组大小有关,且同源区长度不同是造成物种线粒体基因组大小差异的主要因素。

3 讨论

利用种间线粒体基因组差异进行物种鉴别与进化研究,已成为除了形态观察和 5 基因构建系统发育树等方法外,又一确定真菌物种系统发育位置的有力工具(Nie *et al.* 2019; 孟国良等 2020)。胡治远等(2021)研究发现,无论是利用 14 个编码蛋白基因(PCGs)、PCGs+rRNA (核糖体 RNA),还是线粒体全基因组构建系统发育树,均具有较为相似的拓扑结构。这说明通过构建线粒体基因组系统发育树,可以确定物种系统发育位置,且系统发育树具有较好的稳定性和一致性。本研究利用肉座菌目 6 科 50 个物种线粒体基因组 14 个 PCGs 基因构建系统发育树,拓扑结构与 Chen *et al.* (2021)构建的系统发育树较为相似,也说明利用线粒体构建系统发育树具有可靠性。

本研究通过对蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)二代基因组测序,组装和注释其线粒体基因组,发现蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株线粒体基因组成闭合环状,大小为 24 246 bp。其基因区域占比 85.10%,共编码 42 个基因,包括 15 个 PCGs、2 个 rRNA 基因和 25 个 tRNA 基因。所得结果与 Wang *et al.* (2014)发表的蝙蝠蛾鳞翅虫草线粒体基因组(GenBank 登录号: KJ764671)部分相似,如 *atp8*、*atp9*、*nad1*、*nad3*、*nad4* 和 *nad4L* 6 个编码蛋白注释结果一致。然而与蝙蝠蛾鳞翅虫草线粒体基因组(GenBank 登录号: KJ764671)不同,蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株(ICMM 82-2)的线粒体基因组序列总长度相差 1 bp。蝙蝠蛾鳞翅虫草线粒体基因组(GenBank 登录号: KJ764671)有 2 个 *rps3* 基因,2 个 *rps3* 基因与本研究注释的 1 个 *rps3* 基因位置、长度和起始密码子均不同。*atp6*、*cob*、*cox2*、*cox3*、*nad2*、*nad5* 及 *nad6* 基因长度和起始密码子与本

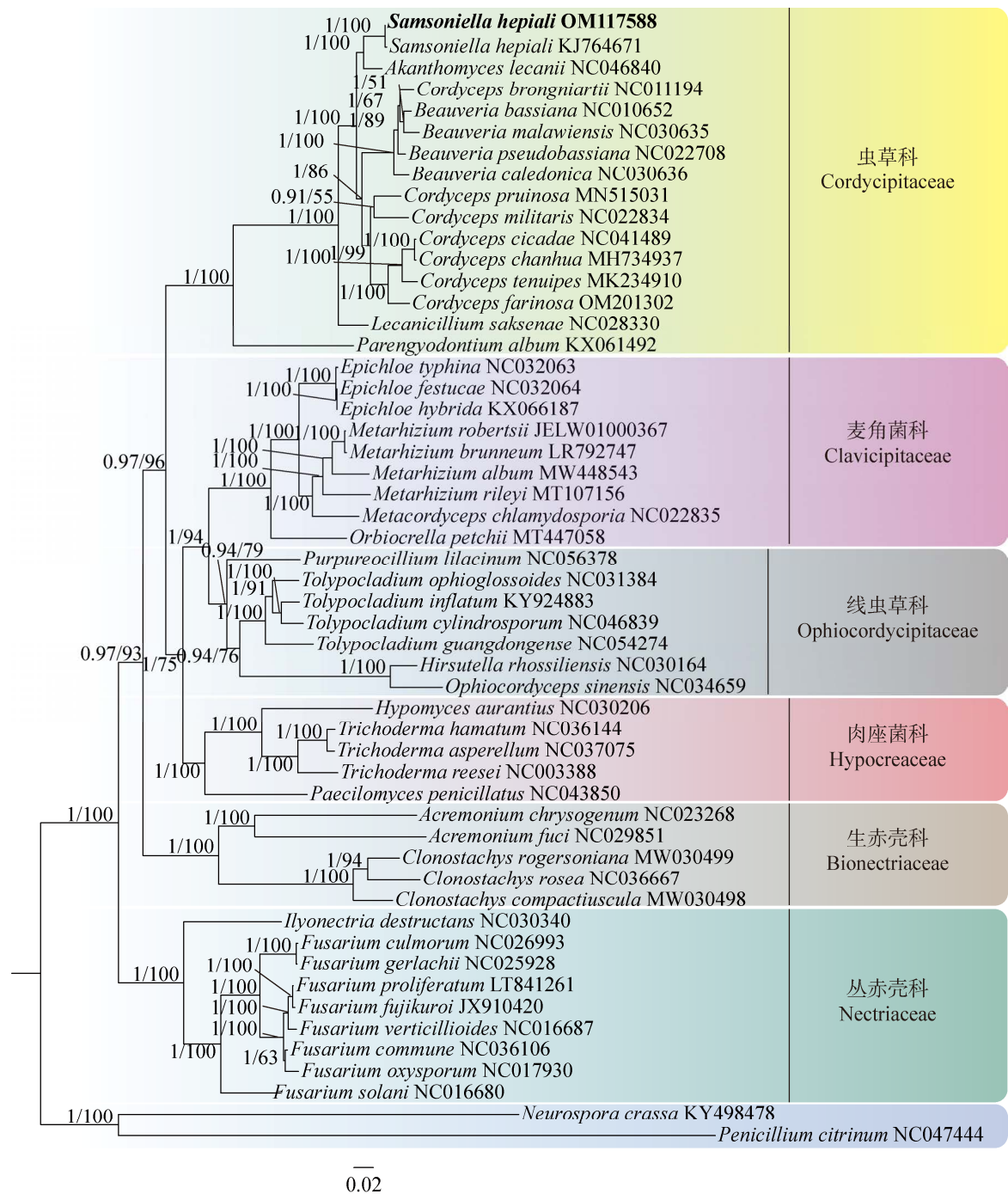


图 4 基于贝叶斯法和最大似然法构建肉座菌目线粒体基因组 14 个编码蛋白基因(PCGs)系统发育树 14 个 PCGs 基因包括 *cob*、*cox1*、*cox2*、*cox3*、*atp6*、*atp8*、*atp9*、*nad1*、*nad2*、*nad3*、*nad4*、*nad4L*、*nad5* 和 *nad6*；拓扑点上数字分别表示该分枝的贝叶斯法和最大似然法支持率；以 *Neurospora crassa* 和 *Penicillium citrinum* 作为外类群，本研究所用菌株加粗表示，下同

Fig. 4 Phylogenetic tree of Hypocreales based on Bayesian inference (BI) and maximum likelihood (ML) analyses of 14 PCGs. The 14 PCG genes include *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, *atp8*, *atp9*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* and *nad6*; Values at the nodes are BI posterior probabilities and ML bootstrap proportions, respectively; *Neurospora crassa* and *Podospora anserina* are designed as the outgroup. The strain in this study is shown in bold. The same below.

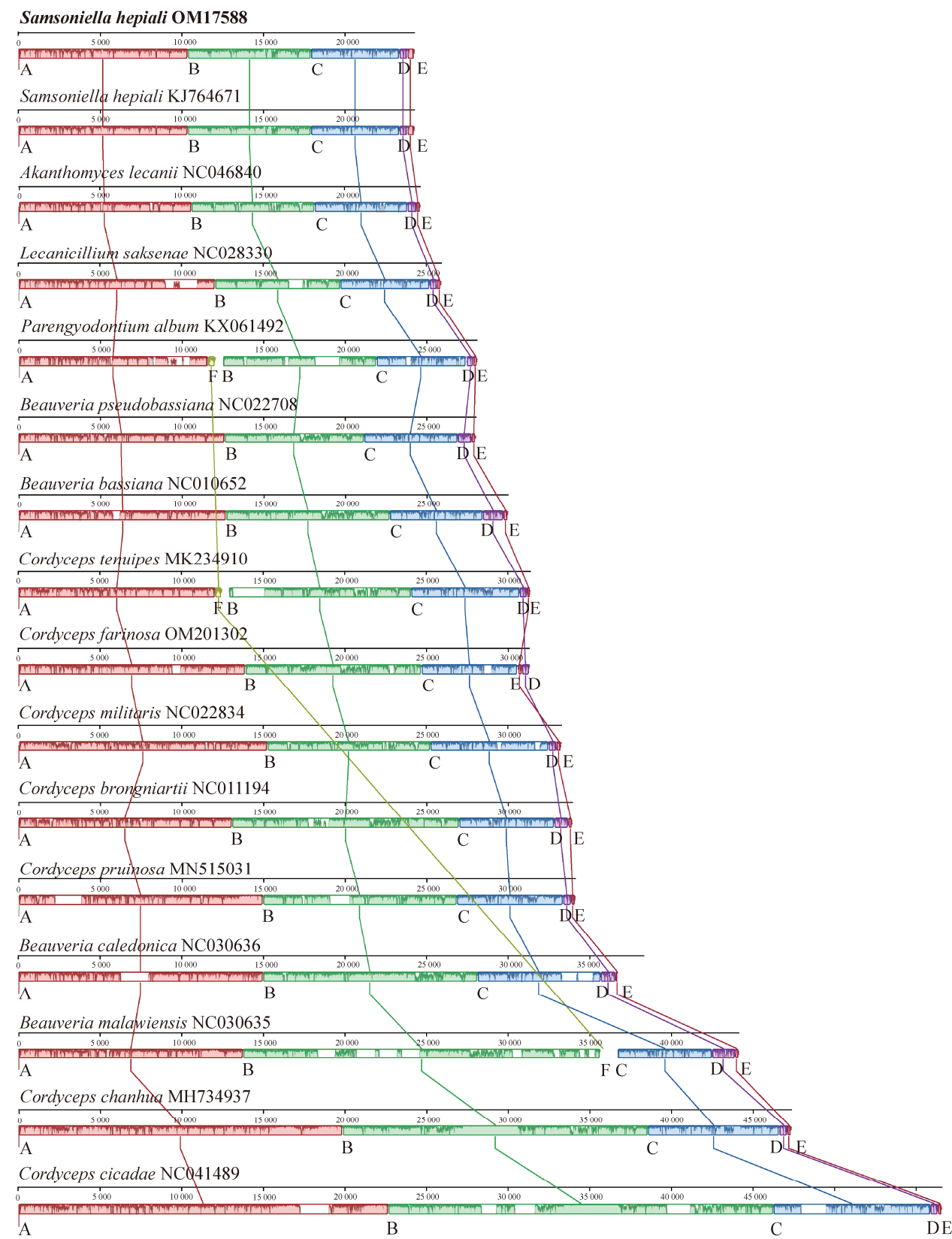


图 5 虫草科线粒体基因组共线性分析

Fig. 5 Collinearity analysis of the mitochondrial genome of Cordycipitaceae.

研究注释结果不同,本研究注释的 15 个 PCGs 基因均以 ATG 为起始密码子。这可能与线粒体组装方式以及统计方法不同有关,也可能是种内遗传分化的差异。

本研究基于线粒体基因组 14 个 PCGs 基因构建肉座菌目系统发育树(包括 6 科 50 个物种),确定蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株的系统发育位置,隶属于肉座菌目虫草科,成为一独立分支,再一次证实蝙蝠蛾鳞翅虫草模式菌株隶属于鳞翅虫草属,这与 Wang *et al.* (2020)研究结果一致。通过对虫草科线粒体基因组进行共线性分析,发现其中 12 个物种存在 5 个同源区,3 个物种存在 6 个同源区,同源区域 A 和 B 长度变异较大。粉质虫草 *Cordyceps farinose* 同源区域 D 和 E 的位置与其他虫草科物种相反。与其他虫草科物种相比,蝙蝠蛾鳞翅虫草的线粒体基因组较小,同源区域相对较短,进一步验证蝙蝠蛾鳞翅虫草区别于其他虫草科物种,证明虫草科物种间变异与线粒体基因组大小有关,且同源区长度不同是造成物种线粒体基因组大小差异的主要因素。蝙蝠蛾鳞翅虫草是我国重要的药用虫草真菌,对其系统发育研究意义重大。通过线粒体基因组分析,鉴别蝙蝠蛾鳞翅虫草物种特异性,确定其系统发育关系,将为虫草系统发育研究提供新思路,为继续研究鳞翅虫草属物种药用价值提供系统发育依据。

[REFERENCES]

- Aguileta G, de Vienne DM, Ross ON, Hood ME, Giraud T, Petit E, Gabaldón T, 2014. High variability of mitochondrial gene order among fungi. *Genome Biology and Evolution*, 6(2): 451-465
- Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S, 2013. The maintenance of mitochondrial DNA integrity critical analysis and update. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 5(5): a012641
- Cao Y, Zhang SH, Liang C, Li BT, Dong S, Zhang GG, 2019. Study on the chemical constituents of the mycelium of *Paecilomyces hepiali*. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 29(4): 300-304 (in Chinese)
- Chen PP, Lin BY, Mak AJ, Lowe TM, 2019. tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 49(16): 9077-9096
- Chen SQ, Wang YB, Zhu KF, Yu H, 2021. Phylogeny and morphology reveal *Ophiocordyceps pingbianensis* sp. nov., an entomopathogenic fungus from China. *Mitogenomics*, 11(7): 686
- Dai RQ, Lan JL, Chen WH, Li XM, Chen QT, Shen CR, 1989. Research on *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai, sp. nov. *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis*, 15(2): 221-224 (in Chinese)
- Dai RQ, Li XM, Shao AJ, Lin SF, Lan JL, Chen WH, Shen CR, 2008. Nomenclatural validation of *Paecilomyces hepiali*. *Mycosystema*, 27(5): 641-644 (in Chinese)
- Gao H, Zhao Y, Hu XY, Zheng DQ, 2019. Study on the anti-diabetic effects of *Paecilomyces hepiali*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 38(12): 116-122 (in Chinese)
- Ge M, Guo R, Lou HX, Zhang W, 2018. Extract of *Paecilomyces hepiali* mycelia induces lipolysis through PKA-mediated phosphorylation of hormone-sensitive lipase and ERK-mediated downregulation of perilipin in 3T3-L1 adipocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1): 326
- Gordon JL, Byrne KP, Wolfe KH, 2009. Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Genetics*, 5(5): e1000485
- Hu ZY, Liu SC, Xu ZG, 2021. Sequencing and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome of the “jinhua-jun” isolated from fermented dark tea. *Mycosystema*, 40(1): 135-151 (in Chinese)
- Jiang L, Bao HY, Yang M, 2010. Antitumor activity of a petroleum ether extract from *Paecilomyces hepiali* mycelium. *Acta Edulis Fungi*, 17(4): 58-60 (in Chinese)
- Jin JJ, Yu WB, Yang JB, Song Y, dePamphilis CW, Yi TS, Li DZ, 2020. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes. *Genome Biology*, 21(1): 241
- Jung SJ, Jung ES, Choi EK, Sin HS, Ha KC, Chae SW, 2019. Immunomodulatory effects of a mycelium extract of *Cordyceps* (*Paecilomyces hepiali*; CBG-CS-2): a randomized and double-blind clinical trial. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 19(1): 1-8
- Li N, Guo SP, 2019. Auxiliary protective effects of cordyceps fermentation powder (C1501) extract of *Ganoderma lucidum* and extract of *Pueraria lobata* on chemical liver injury. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 11(22): 1-4 (in Chinese)

- Lu HF, Wang Z, Wu HX, Wang JF, 2020. Research progress on mycelium of *Paecilomyces hepiali*. Modern Agricultural Science and Technology, 20: 197-200 (in Chinese)
- Meng GL, Zeng PM, Wang ZY, Cheng B, Ye LY, Wu XP, 2020. Application of the *Ganoderma multipileum* mitogenome to identification of *Ganoderma* species. Mycosystema, 39(1): 23-33 (in Chinese)
- Nie Y, Wang L, Cai Y, Tao W, Zhang YJ, Huang B, 2019. Mitochondrial genome of the entomophthoroid fungus *Conidiobolus heterosporus* provides insights into evolution of basal fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(1): 1379-1391
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19(12): 1572-1574
- Stothard P, 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques, 28(6): 1102-1104
- Valach M, Burger G, Gray MW, Lang BF, 2014. Widespread occurrence of organelle genome-encoded 5S rRNAs including permuted molecules. Nucleic Acids Research, 42(22): 13764-13777
- Wang J, Liu YG, Li LZ, Qi YD, 2017. Dopamine and serotonin contribute to *Paecilomyces hepiali* against chronic unpredictable mild stress induced depressive behavior in Sprague Dawley rats. Molecular Medicine Reports, 16(4): 5675-5682
- Wang LP, Xu JY, Li HC, Song LP, Yu Y, Zhang WS, Liu GM, Feng CQ, 2014. The complete mitochondrial genome of *Paecilomyces hepiali* (Ascomycota, Eurotiomycetes). Mitochondrial DNA, 27(2): 916-917
- Wang YB, Wang Y, Fan Q, Duan DE, Yu H, 2020. Multigene phylogeny of the family Cordycipitaceae (Hypocreales): new taxa and the new systematic position of the Chinese cordycipitoid fungus *Paecilomyces hepiali*. Fungal Diversity, 103(1): 1-46
- Wei T, Wei WL, Gong XJ, Jin ZL, 2002. Study on functions of *Cordyceps sinensis* mycelium about cough-relief, expectorant effect, antiseptis and anti-inflammatory effect. Food Science, 23(3): 126-130 (in Chinese)
- Williams S, Foster P, Littlewood D, 2014. The complete mitochondrial genome of a turbinid vetigastropod from MiSeq Illumina sequencing of genomic DNA and steps towards a resolve gastropod phylogeny. Gene, 533(1): 38-47
- Yan J, 2019. Screening of soybean medium and recovery effect of kidney and testis damage of *Paecilomyces hepiali*. Master Thesis, Jilin Agricultural University, Changchun. 1-97 (in Chinese)
- Zhang JH, Zhao P, Li B, Huang CP, Tan HY, 2013. Study on enhancing immunity of *Paecilomyces hepiali* mycelium. Journal of Guangxi Medical University, 30(4): 520-522 (in Chinese)
- Zhang S, Wang XN, Zhang XL, Liu XZ, Zhang YJ, 2017. Complete mitochondrial genome of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*: features and evolution. Applied Microbiology and Biotechnology, 101(4): 1593-1604
- Zhao ZY, Zhu KF, Tang DX, Wang YB, Wang Y, Zhang GD, Geng YP, Yu H, 2021. Comparative analysis of mitochondrial genome features among four *Clonostachys* species and insight into their systematic positions in the order Hypocreales. International Journal of Molecular Sciences, 22(11): 5530

[附中文参考文献]

- 曹阳, 张淑华, 梁冲, 李博腾, 董升, 张国刚, 2019. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体化学成分研究. 中国药物化学杂志, 29(4): 300-304
- 戴如琴, 兰江丽, 陈伟华, 李晓明, 陈庆涛, 沈崇尧, 1989. 蝙蝠蛾拟青霉新种的研究. 北京农业大学学报, 15(2): 221-224
- 戴如琴, 李晓明, 邵爱娟, 林淑芳, 兰江丽, 陈伟华, 沈崇尧, 2008. 蝙蝠蛾拟青霉名称的合格化. 菌物学报, 27(5): 641-644
- 高寒, 赵毅, 胡馨予, 郑德庆, 2019. 蝙蝠蛾拟青霉治疗 1 型糖尿病活性研究. 食品与生物技术学报, 38(12): 116-122
- 胡治远, 刘素纯, 徐正刚, 2021. 黑茶中“金花菌”线粒体基因组序列测定及系统发育分析. 菌物学报, 40(1): 135-151
- 姜磊, 包海鹰, 杨明, 2010. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体石油醚提取物抗肿瘤活性. 食用菌学报, 17(4): 58-60
- 李娜, 郭素萍, 2019. 虫草蝙蝠蛾拟青霉(C1501)发酵菌粉, 灵芝提取物及葛根提取物对化学性肝损伤的辅助保护作用. 中医临床研究, 11(22): 1-4
- 陆海峰, 王忠, 吴鸿雪, 王锦锋, 2020. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体研究进展. 现代农业科技, 20: 197-200
- 孟国良, 曾培明, 王紫瓅, 程冰, 叶丽云, 吴小平, 2020. 重伞灵芝线粒体基因组在灵芝种间鉴定中的应用. 菌物学报, 39(1): 23-33
- 魏涛, 魏威凛, 贡晓娟, 金宗濂, 2002. 冬虫夏草菌丝体镇咳、祛痰及抗菌消炎作用的研究. 食品科学, 23(3): 126-130
- 闫俊, 2019. 蝙蝠蛾拟青霉的大豆培养基的筛选及其对肾脏和睾丸损伤的恢复作用. 吉林农业大学硕士论文, 长春. 1-97
- 张洁宏, 赵鹏, 李彬, 黄超培, 覃辉艳, 2013. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体增强免疫力功能动物试验研究. 广西医科大学学报, 30(4): 520-522