

研究报告

蜡蚧刺束梗孢(*Akanthomyces lecanii*)的线粒体基因组特征与系统发育分析

常晓云¹, 汪婷^{1,2}, 李增智^{1,3}, 陈名君^{*1}

1 安徽农业大学 安徽省微生物防治重点实验室, 安徽 合肥 230036

2 蚌埠市自然资源和规划局, 安徽 蚌埠 233000

3 浙江泛亚生命科学研究院, 浙江 平湖 314200

常晓云, 汪婷, 李增智, 陈名君. 蜡蚧刺束梗孢(*Akanthomyces lecanii*)的线粒体基因组特征与系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3103-3118.

CHANG Xiaoyun, WANG Ting, LI Zengzhi, CHEN Mingjun. Sequence characteristics and phylogenetic relationship of the mitochondrial genome of *Akanthomyces lecanii*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3103-3118.

摘要:【背景】蜡蚧刺束梗孢(*Akanthomyces lecanii*)是重要的生防类虫生真菌, 其线粒体基因组详细信息未见报道。【目的】系统研究蜡蚧刺束梗孢线粒体基因组信息, 有助于明确该菌准确的系统发育地位, 并为虫草科(*Cordycipitaceae*)真菌物种的系统发育、资源保护和开发利用提供分子依据。【方法】通过对蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 完整线粒体基因组进行测序, 利用生物信息学分析其组成特征、序列重复、系统发育分析、共线性分析, 以及与其他虫草科真菌线粒体基因组进行比较。【结果】菌株 RCEF6920 的环状线粒体基因组全长 24 577 bp, 共编码 43 个基因, 由 15 个蛋白质编码基因、2 个 rRNA 基因和 26 个 tRNA 基因组成。仅鉴定出一个内含子, 其阻断 *rnl* 基因并鉴定出编码核糖体蛋白 S3 (*rps3*)的开放阅读框(open reading frame, ORF) *orf447*。基因组核苷酸组成存在 A+T 偏移(72.89%)。26 个 tRNA 基因可转运全部 20 种氨基酸, 并表现为典型的三叶草结构。蛋白质编码基因中频率最高的密码子是 AGA, 其中精氨酸和亮氨酸出现频率最高, 蛋氨酸和色氨酸出现频率最低。蛋白编码基因的系统发育关系显示, 刺束梗孢属(*Akanthomyces*)和萨姆森虫草属(*Samsoniella*)互为姊妹属。与虫草科其他物种相比, 蜡蚧刺束梗孢线粒体基因组较小, 除部分虫草属(*Cordyceps*)物种外, 在虫草科物种共线性较好。【结论】本研究获得了蜡蚧刺束梗孢的线粒体基因组全序列及相关信息。蛋白编码基因的系统发育分析支持了蜡蚧刺束梗孢的独立分类地位, 也表明虫草科真菌线粒体基因组结构较保守。

关键词: 蜡蚧刺束梗孢; 线粒体基因组; 虫草科; 比较分析; 系统发育分析

资助项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划(gxyqZD2019013); 安徽农业大学研究生创新基金(2020ysj-21)

This work was supported by the Outstanding Young Talents Support Program in Colleges and Universities of Anhui Province (gxyqZD2019013), and the Innovation Fund for the Postgraduate of Anhui Agricultural University (2020ysj-21).

*Corresponding author. E-mail: mjchen@ahau.edu.cn

Received: 2023-10-25; Accepted: 2023-12-15; Published online: 2024-01-25

Sequence characteristics and phylogenetic relationship of the mitochondrial genome of *Akanthomyces lecanii*

CHANG Xiaoyun¹, WANG Ting^{1,2}, LI Zengzhi^{1,3}, CHEN Mingjun^{*1}

1 Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

2 Natural Resources and Planning Bureau of Bengbu City, Bengbu 233000, Anhui, China

3 Zhenjiang BioAsia Life Science Institute, Pinghu 314200, Zhejiang, China

Abstract: [Background] *Akanthomyces lecanii* is an important entomogenous fungus for biocontrol, and its mitochondrial genome has not been reported. [Objective] The mitochondrial genome of *A. lecanii* was systematically studied, which would help clarify the taxonomic status of this fungus and provide a molecular basis for the phylogenetic research and the resource protection and utilization of *Cordycipitaceae*. [Methods] The full-length mitochondrial genome of *A. lecanii* RCEF6920 was sequenced, and bioinformatics tools were used to probe into the composition, sequence repeats, phylogenetic relationship, and collinearity. Furthermore, the mitochondrial genome was compared between *A. lecanii* and other species of *Cordycipitaceae*. [Results] The mitochondrial genome of *A. lecanii* RCEF6920 was a circular DNA molecule of 24 577 bp and contained 43 genes, including 15 protein-coding genes, 2 rRNA genes, and 26 tRNA genes. Only one intron was detected in the mitochondrial genome, and it interrupted *rnl* and contained *orf447* encoding ribosomal protein S3. The nucleotide composition of the mitochondrial genome was A+T biased (72.89%). The 26 tRNA genes could transfer all the 20 amino acids and presented a typical cloverleaf structure. AGA was the most frequently used codon of the protein-coding genes. Arginine and leucine were identified as the most common amino acids, while methionine and tryptophan were the least common amino acids in the protein-coding genes. The phylogenetic analysis based on the protein-coding genes revealed that *Akanthomyces* and *Samsoniella* were sister genera. Compared with other species of *Cordycipitaceae*, *A. lecanii* had a small mitochondrial genome. Except several species, other species of *Cordycipitaceae* had good mitochondrial genome collinearity. [Conclusion] We obtained the full-length mitochondrial genome sequence and related information of *A. lecanii*. The phylogenetic analysis supports the independent taxonomic status of *A. lecanii*, and the mitochondrial genomes of fungi belonging to *Cordycipitaceae* are conserved.

Keywords: *Akanthomyces lecanii*; mitochondrial genome; *Cordycipitaceae*; comparative analysis; phylogenetic analysis

刺束梗孢属(*Akanthomyces*)真菌主要包括无脊椎动物致病物种,最早由 Lebert^[1]于 1858 年从鳞翅目(*Lepidoptera*)成虫上分离得到。该类群真菌可产生对昆虫、线虫、真菌、细菌等具有活性的代谢产物^[2-5],相较于在农作物上使用的化

学药物,这些化合物对人体的毒性较低且杀虫作用强^[6]。自 20 世纪 80 年代以来,刺束梗孢属真菌被发现在温室园艺和观赏作物中具有控制害虫的潜力^[7],已被开发成生物制剂调节农林业生态系统中的昆虫和螨虫等^[8]。其中 *A. muscarius*

和 *A. dipterigenus* 在欧洲作为生物防治制剂被广泛关注^[9-11]。Nicoletti 等^[12]报道了该属物种还具有内寄生生活方式,可与植物建立共生关系。由此可见,该属真菌在植物保护方面具有广阔的应用潜力。

蜡蚧刺束梗孢 [*Akanthomyces lecanii* (Zimm.) Spatafora, Kepler & Shresthash]是肉座菌目(*Hypocreales*)虫草科(*Cordycipitaceae*)刺束梗孢属一种重要的虫生真菌。1899年 Zimmermann^[13]从印度尼西亚爪哇岛咖啡绿软蜡蚧(*Coccus viridis* Green)的虫尸上首次分离并描述了 *Akanthomyces lecanii*。该种曾被命名为 *Verticillium lecanii*、*Cordyceps confragosa*、*Torrubiella confragosa*、*Lecanicillium lecanii* 等^[14]。Kepler 等^[15]将其最终确定为 *Akanthomyces lecanii*。近年来发现 *A. lecanii* 不仅能够感染各种害虫,尤其对烟粉虱(*Bemisia tabaci*)具有很强的致病性^[16-18],而且对植物寄生线虫和植物真菌性病害[如草莓白粉病菌(*Sphaerotheca aphansis*)、咖啡叶锈病菌(*Hemileia vastratrix*)]等也具有很好的抑制作用^[2,19-20]。并且该菌种寄主多样、分布广泛且容易培养,具有较高的商业开发前景^[21]。

在真核生物中,线粒体负责细胞呼吸和能量的产生^[22]。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)呈环形,通常由核基因调节,并由同一 DNA 链编码^[23]。由于其高拷贝数、低突变率和进化速度快等特点,mtDNA 已被广泛用作系统发育分析和物种鉴定的分子标记^[24]。mtDNA 也被用于 DNA 条形码,以促进群体遗传学、比较基因组学和进化基因组学等领域的研究^[25-26]。真菌线粒体基因组是单环双链 DNA 分子,通常编码 14 个与电子传递和氧化磷酸化相关的基因(*atp6*、*8*、*9*、*cob*、*cox1-3*、*nad1-6* 和 *nad4L*)、转录调控的 *rps3* 基因^[27]、线粒体核糖体 RNA (*rns* 和 *rml*),以及一组 22-36 个 tRNA^[28-29]。比较分析表明,尽管真菌线粒体基因组的特征是相对保守

的,但在基因组的大小和顺序上依然差异较大^[30]。目前 NCBI 已公布虫草科线粒体基因组仅 20 余种,大量虫草科物种线粒体基因组仍未报道。

Zhang 等^[31]曾简要报道了菌株 *A. lecanii* RCEF1005 的线粒体基因组基本信息,并证明线粒体基因组信息在研究真菌系统发育及进化关系是可靠的。但该物种线粒体基因组结构特征、基因功能、重复序列及与近缘物种的共线性和比较分析尚不清楚。在本研究中,拟对 *A. lecanii* RCEF6920 全线粒体基因组序列进行测序、组装和注释,并对其基因含量、基因组结构特征、蛋白质编码基因(protein-coding gene, PCG)、tRNA 二级结构和重复序列等进行分析,结合 NCBI 数据库相关物种线粒体基因组,对 *A. lecanii* 的线粒体基因组进行遗传特征和系统发育分析,为科学地建立该类群的系统发育关系提供新证据。值得注意的是,线粒体 tRNA 基因的二级结构是研究种群遗传和进化的理想的分子标记^[32]。Hopper 等^[33]认为基因组分析和新技术开辟了 tRNA 生物化学领域,tRNA 研究受到关注。目前对于不同分类阶元水平上 tRNA 二级结构的比较研究十分欠缺,如果将多种 tRNA 的二级结构信息综合分析,则其可能得到更好的应用。简单重复序列间扩增等随机性标记或线粒体 DNA 标记,是研究遗传多样性和种质资源的重要手段之一。本研究还对线粒体基因组中简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)进行分析,为设计扩增引物提供参考信息,并为后续物种遗传多样性研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究所用蜡蚧刺束梗孢(*Akanthomyces lecanii*) RCEF6920 分离自蜘蛛,由安徽省微生物防治重点实验室提供。

1.2 培养基

SDAY 基础培养基参考文献[34]配制。

1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖和酵母浸粉, 国药集团化学试剂有限公司; 蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 真菌基因组 DNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司。智能光照培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 荧光仪, Turner BioSystems 公司。

1.4 基因组 DNA 的提取与测序

先将菌种接种至 SDAY 培养基, 25 °C 培养 4 d 活化后转接于铺有玻璃纸的 SDAY 培养基上, 25 °C 培养 7 d 左右, 取适量纯菌丝备用。使用真菌基因组 DNA 试剂盒提取菌株基因组 DNA, 利用荧光仪检验总 DNA 质量, 并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

采用 Illumina NovaSeq 6000 测序技术对样品 DNA 进行双端测序(上海凌恩生物科技有限公司), 测序完成后对原始数据进行质量剪切获得 clean data, 以 FASTQ 格式存储^[35]。

1.5 线粒体基因组组装和注释

用 Trimmomatic v0.39 过滤原始读数, 过滤去除显示质量分数低于 20 ($Q < 20$) 的 reads, 包括含 N 比例达到 10% 的 reads。使用 *de novo* 和 reference-guided 组装相结合的方法重建线粒体基因组。利用 GetOrganelle v1.3.1 过滤后的 reads 进行线粒体基因组组装, 通过比对 NCBI 线粒体数据 (<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/mitochondrion/>) 提取潜在线粒体基因组 contigs^[36]。运用 BLAST v2.8+ 将潜在的线粒体 contigs 与参考线粒体基因组对齐, 并根据参考线粒体基因组 (>80% 的查询覆盖率) 进行排序和人工连接。后用 MUMmer v4 检查这些 contigs 是否为圆环^[37-38]。

使用 MFannot (<http://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/mfannot/mfannotInterface.pl/>) 在线工具对

真菌线粒体基因组进行编码蛋白、tRNA 和 rRNA 基因的预测。使用 SnapGene Viewer 人工校正基因的首尾及 exon/intron 边界, 获得高准确性的基因集。在 NCBI non-redundant (Nr) 蛋白质数据库进行 BLASTp ($E\text{-value} < 1e-5$) 比对完成功能注释。使用在线网站 Organellar Genome DRAW (OGDRAW) 工具绘制 *A. lecanii* 的线粒体基因组图谱^[39-40]。线粒体基因组测序和注释结果已上传至 GenBank 数据库, 获得登录号为 OR506462。

1.6 线粒体基因组结构分析

利用 MEGA 7.0 进行密码子使用情况分析并统计 AT 和 CG 含量。根据公式 $A+T\text{ skew} = (A-T)/(A+T)$ 和 $G+C\text{ skew} = (G-C)/(G+C)$ 计算核苷酸组成的不对称偏差。密码子的偏好性用 relative synonymous codon usage (RSCU) 值表示。使用在线软件 tRNAscan-SE2.0 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/index.html>) 对 tRNA 基因进行预测分析并绘制 tRNA 基因二级结构图^[41]。用 Mauve v2.4.0 对虫草科 8 个种的线粒体基因组进行共线性分析^[42]。

1.7 重复序列分析

为了确认线粒体基因组中的重复序列, 使用软件 REPuter (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/reputer/>) 进行长重复序列分析, 参数设置为: 最短 repeat 长度 (minimal repeat size) 为 30 bp, 错配数 (hamming distance) 为 3, 最大计算重复次数 (maximum computed repeats) 为 5 000 (相当于 $1e-3$)。查找以下 4 种重复类型: F (forward)、R (reverse)、C (complement)、P (palindromic)。

简单重复序列一般是以 1-6 bp 组成较低程度的重复序列, 主要以 2-3 个核苷酸为重复单位。基于 MicroSatellite identification tool (MISA) 软件对样本组装获得的 contig 序列进行微卫星位点分析。两个 SSR 之间的最小距离设置为 100 bp。

1.8 系统发育分析

为了研究 *A. lecanii* 在肉座菌目中与相关物

种间的系统发育关系, 从 GenBank 数据库下载肉座菌科(*Hypocreaceae*) 4 个种、生赤壳科(*Bionectriaceae*) 4 个种、麦角菌科(*Clavicipitaceae*) 6 个种、虫草科(*Cordycipitaceae*) 6 个种和线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*) 13 个种的线粒体基因组序列, 采用 MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)进行多序列比对, 利用 RAxML 7.0.3 软件^[43]基于最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树, 同时利用 MrModeltest v 2.3 和 MrBayes v3 软件^[44]基于贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组结构特征

菌株 RCEF6920 线粒体基因组呈闭合环状, 大小为 24 577 bp (图 1), 其中 A+T 含量为 72.89%, G+C 含量为 27.11%, 基因区域占比为 84.92%, 编码基因的平均长度 958 bp, 共编码 43 个基因 (表 1), 包括 15 个蛋白质编码基因 *rps3*、*nad2*、*nad3*、*atp9*、*cox2*、*nad4L*、*nad5*、*cob*、*cox1*、*nad1*、*nad4*、*atp8*、*atp6*、*cox3* 和 *nad6*; 2 个核糖体 RNA (rRNA) 基因(*rns* 和 *rnl*)和 26 个转运 RNA (tRNA)

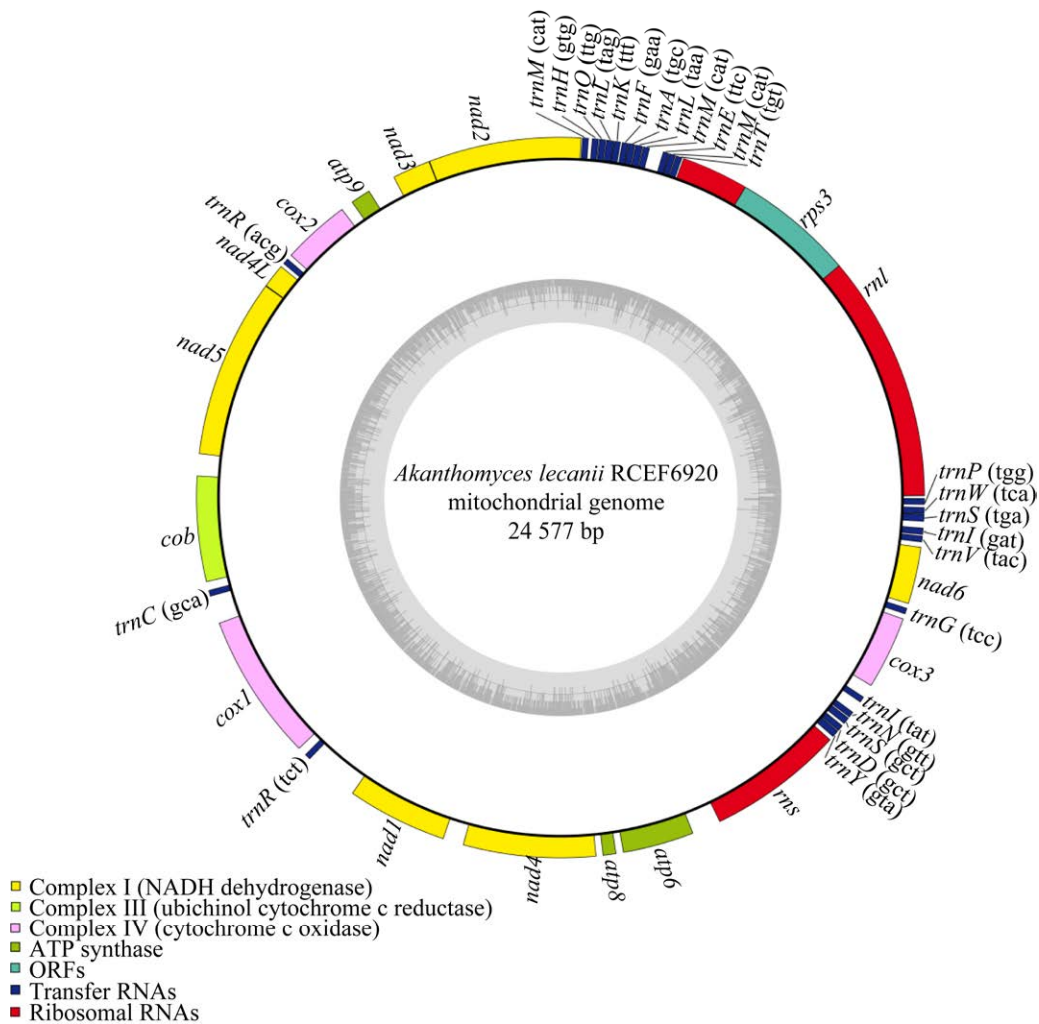


图 1 蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 线粒体基因组图谱

Figure 1 The circular map of the complete mitochondrial genome of *Akanthomyces lecanii* RCEF6920.

表 1 蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 线粒体基因组的组分汇总与统计

Table 1 Gene composition and statistics of the complete mitochondrial genome of *Akanthomyces lecanii* RCEF6920

基因 Gene	区域 Region	总长 Length (bp)	基因区间 Intergenic length (bp)	起始密码子 Start codon	终止密码子 End codon	反密码子 Anticodon
<i>rnl</i>	14-4 797	4 784	23	-	-	-
<i>rps3</i>	2 730-4 064	1 335	264	ATG	TAA	-
<i>trnT</i> (tgt)	4 810-4 880	71	12	-	-	TGT
<i>trnE</i> (ttc)	4 884-4 955	72	3	-	-	TTC
<i>trnM</i> (cat)	4 957-5 027	71	1	-	-	CAT
<i>trnM</i> (cat)	5 174-5 246	73	146	-	-	CAT
<i>trnL</i> (taa)	5 250-5 331	82	3	-	-	TAA
<i>trnA</i> (tgc)	5 335-5 406	72	3	-	-	TGC
<i>trnF</i> (gaa)	5 408-5 480	73	1	-	-	GAA
<i>trnK</i> (ttt)	5 493-5 565	73	12	-	-	TTT
<i>trnL</i> (tag)	5 567-5 650	84	1	-	-	TAG
<i>trnQ</i> (ttg)	5 654-5 726	73	3	-	-	TTG
<i>trnH</i> (gtg)	5 731-5 804	74	4	-	-	GTG
<i>trnM</i> (cat)	5 839-5 910	72	34	-	-	CAT
<i>nad2</i>	5 918-7 588	1 671	7	ATG	TAA	-
<i>nad3</i>	7 588-8 007	420	-1	ATG	TAA	-
<i>atp9</i>	8 308-8 532	225	300	ATG	TAA	-
<i>cox2</i>	8 660-9 409	750	127	ATG	TAA	-
<i>trnR</i> (acg)	9 457-9 527	71	47	-	-	ACG
<i>nad4L</i>	9 564-9 833	270	36	ATG	TAA	-
<i>nad5</i>	9 833-11 815	1 983	-1	ATG	TAA	-
<i>cob</i>	12 052-13 212	1 161	236	ATG	TAA	-
<i>trnC</i> (gca)	13 304-13 375	72	91	-	-	GCA
<i>cox1</i>	13 677-15 302	1 626	301	ATG	TAA	-
<i>trnR</i> (tct)	15 393-15 463	71	90	-	-	TCT
<i>nad1</i>	16 049-17 152	1 104	585	ATG	TAA	-
<i>nad4</i>	17 371-18 819	1 449	218	ATG	TAA	-
<i>atp8</i>	18 889-19 035	147	69	ATG	TAA	-
<i>atp6</i>	19 110-19 892	783	74	ATG	TAA	-
<i>rns</i>	20 202-21 697	1 496	309	ATG	TAA	-
<i>trnY</i> (gta)	21 739-21 822	84	41	-	-	GTA
<i>trnD</i> (gtc)	21 826-21 898	73	3	-	-	GTC
<i>trnS</i> (gct)	21 925-22 005	81	26	-	-	GCT
<i>trnN</i> (gtt)	22 014-22 084	71	8	-	-	GTT
<i>trnI</i> (tat)	22 215-22 285	71	130	-	-	TAT
<i>cox3</i>	22 428-23 237	810	142	ATG	TAA	-
<i>trnG</i> (tcc)	23 290-23 360	71	52	-	-	TCC
<i>nad6</i>	23 408-24 040	633	47	ATG	TAA	-
<i>trnV</i> (tac)	24 092-24 163	72	51	-	-	TAC
<i>trnI</i> (gat)	24 174-24 245	72	10	-	-	GAT
<i>trnS</i> (tga)	24 312-24 396	85	66	-	-	TGA
<i>trnW</i> (tca)	24 398-24 469	72	1	-	-	TCA
<i>trnP</i> (tgg)	244 96-24 567	72	26	-	-	TGG

-: 非编码蛋白基因无起始密码子和终止密码子

-: Non coding protein genes have no start codons and end codons.

基因,未发现基因间独立的 ORF。只有一个内含子存在于线粒体基因组 *rnl* 中,其阻断了 *rnl* 基因,将其分成两段,并含有编码核糖体蛋白 S3 (*rps3*)的 *orf447*。26 个 tRNA 基因长度范围为 71–85 bp, rRNA 基因中 *rnl* 长度为 4 784 bp, *rns* 长度为 1 495 bp。

在基因区域中 43 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 14.66%,共存在 41 个基因间区区域,最长基因间区在 *trnR* (*tct*) 与 *nad1* 间,长度为 585 bp。蛋白质编码基因 *nad2* 与 *nad3* 重叠 1 bp, *nad4L* 与 *nad5* 重叠 1 bp,其余基因区域未发现基因重叠现象。

2.2 蛋白质编码基因及密码子使用情况

菌株 RCEF6920 线粒体基因组中共有 15 个

PCG,全长为 14 367 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 (*rps3*) (图 1、表 1)。其中, *nad5* 序列最长为 1 982 bp,最短的 *atp8* 为 146 bp。15 个 PCG 均以 ATG 为起始密码子,以 TAA 为终止密码子(表 1)。

各氨基酸在菌株 RCEF6920 线粒体基因组编码蛋白中使用频率存在较大差异(图 2),其中精氨酸(Arg)、亮氨酸(Leu)和丝氨酸(Ser)出现频率最高,蛋氨酸(Met)和色氨酸(Trp)出现频率最低。

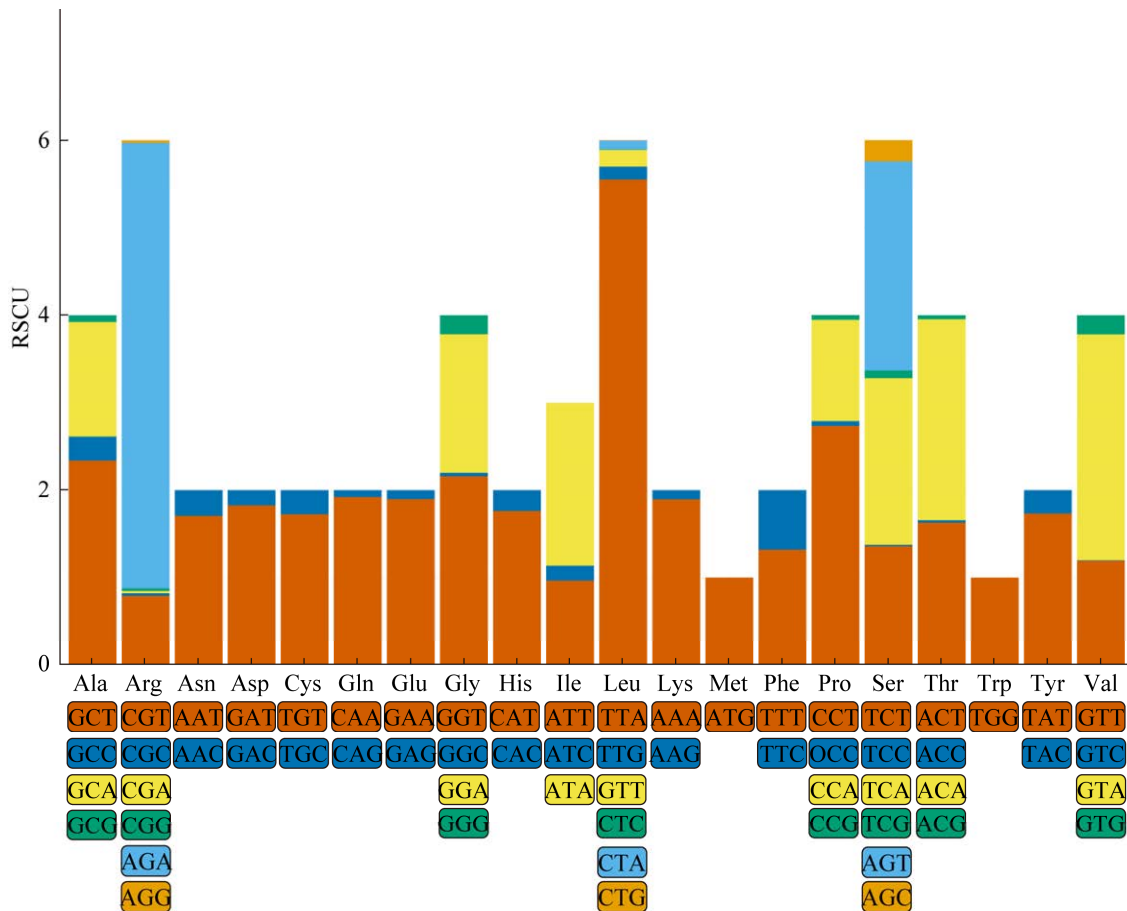


图 2 各氨基酸在菌株 RCEF6920 线粒体基因组编码蛋白基因中的使用频率及密码子偏好性分析

Figure 2 The frequencies of amino acids in the protein-coding genes and analysis of codon preference of the complete mitochondrial genome of strain RCEF6920.

15 个蛋白质编码基因共计使用 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 AGA、TTA、CCT 和 GTA, 导致菌株 RCEF6920 线粒体基因组中碱基组成 A+T 含量高达 72.89%。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 TTA (5.556)、AGA (5.094)、CCT (2.737)和 GTA (2.584)。

2.3 tRNA 基因及二级结构

菌株 RCEF6920 线粒体基因组中存在 26 个 tRNA 基因, 分布较为集中, *rnl* 和 *nad2* 间集中分布 12 个 tRNA 基因, *rns* 和 *cox3* 间集中分布 5 个 tRNA 基因, *nad6* 和 *rnl* 间集中分布 5 个 tRNA 基因, 其余 4 个分布在 *cox2* 和 *nad4L* 间、*cob* 和 *cox1* 间、*cox1* 和 *nad1* 间、*cox3* 和 *nad6* 间。

这些 tRNA 预测的二级结构具有典型的三叶草特征, 并发现 46 处 G-U 错配(图 3)。tRNA 基因总长度 1 928 bp, 占线粒体基因组总长度的 7.84%, tRNA 长度最大相差 14 bp, 主要由于额外臂的影响, *trnL* (taa)、*trnL* (tag)、*trnY* (gta)、*trnS* (gct)和 *trnS* (tga)中均存在一个额外臂, *trnA* (tgc)和 *trnH* (gtg)中均存在一个额外环。26 个 tRNA 共可转运全部 20 种氨基酸, 精氨酸(Arg)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)和丝氨酸(Ser)分别是由 2 个具有不同反密码子的 tRNA 基因编码, 蛋氨酸(Met)是由 3 个具有相同反密码子的 tRNA 基因编码。

2.4 线粒体基因组功能注释

将得到的序列与 NCBI 中 Nr 蛋白质数据库数据进行比对, 对提交比对的序列进行功能注释, 比对结果如表 2 所示。

2.5 线粒体基因组重复序列

分析发现, 菌株 RCEF6920 存在 7 处正向重

复, 2 处回文重复, 其中 1 处回文重复在 *nad1* 附近。30–34 bp 长度重复序列最多, 其次为 40–44 bp 长度序列。

菌株 RCEF6920 线粒体基因组中含有 14 个 SSR 位点, 包含 4 个二核苷酸、7 个三核苷酸和 3 个四核苷酸。二核苷酸重复有 AT/TA 这 2 种类型, 未检测到 CG/GC 重复, 三核苷酸重复有 ATA、ATT、TTA、TAT 和 TAA 这 5 种类型, 四核苷酸重复有 ATTA、AATA 和 ATTT 这 3 种类型, 所有 SSR 均未发现含 C 或 G 的重复(表 3)。

2.6 基于线粒体基因组的肉座菌目系统发育分析

为分析菌株 RCEF6920 的系统发育位置, 构建基于 14 个 PCG 基因的肉座菌目 5 科(肉座菌科、生赤壳科、麦角菌科、线虫草科、虫草科) 36 个物种的系统发育树(图 4)。菌株 RCEF6920 位于肉座菌目虫草科分支中, 与 *A. lecani* RCEF1005 (GenBank 号为 MN904747)聚为一支, 遗传距离为 0.00, 即菌株 RCEF6920 为 *A. lecani*。根据系统发育树判断, *Akanthomyces* 和 *Samsoniella* 为姐妹属。

2.7 虫草科线粒体基因组共线性分析

虫草科中虫草属线粒体基因组较大, 而菌株 RCEF6920 线粒体基因组长度则相对偏小, 较 *C. farinosa* 小 8.71 kb, 但是虫草属线粒体基因组编码区域长度占比相对较低。虫草科线粒体基因组中 C+G 含量在 27%左右, 不同物种差距很小。其蛋白质编码基因 15–17 个, 这可能是 ORF 数量不一致导致的, *Paragyodontium album* ATCC:5648 线粒体基因组存在 2 个基因编码 ORF, 即 *orf77* 和 *orf148*^[45]。虫草科线粒体基因组均有 2 个 rRNA 基因(*rnl* 和 *rns*), 24–27 个 tRNA, 可能是由于 tRNA 预测的保守程度导致

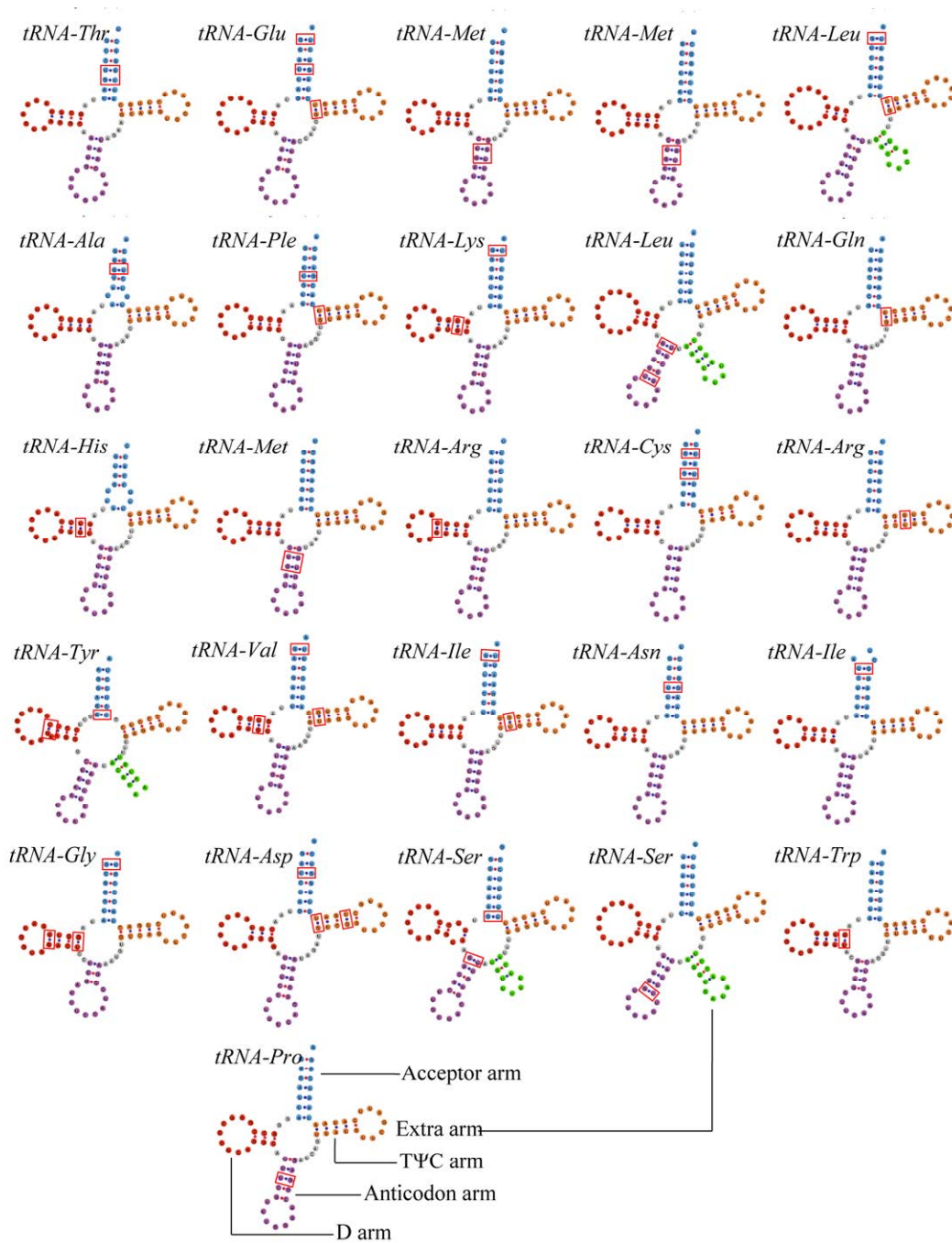


图3 蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 线粒体基因组 tRNA 结构预测

Figure 3 The predicted tRNA structures of the complete mitochondrial genome of *Akanthomyces lecanii* RCEF6920.

的。蛹虫草(*Cordyceps militaris*)相较于虫草科其他物种编码区域长度占比较低,可能是受内含子、重复序列和基因区间较长的影响(表 4)。从共线性分析上看,虫草科整体上共线性较好,但

虫草属共线一致性较低,这可能是该属物种发生了基因重排(图 5)。相较于虫草科其他物种,刺束梗孢属和萨姆森虫草属(*Samsoniella*)的基因组较小,亲缘关系很近,共线一致性高。

表 2 蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 的 Nr 注释结果解析

Table 2 Explanation of Nr annotation results for *Akanthomyces lecanii* RCEF6920

基因 Gene	序列一致率 Sequence concordance (%)	比对得分 Comparison score	GenBank 登录号 GenBank accession number	Nr 注释功能分析 Analysis of Nr annotation function
<i>nad4L</i>	100.0	147.0	GBT68143	NADH-quinone oxidoreductase subunit 11
<i>cox3</i>	99.3	535.8	AAL27688	Cytochrome oxidase subunit III
<i>atp6</i>	99.6	394.0	QEX95825	ATP synthase F0 subunit 6
<i>nad6</i>	99.0	385.2	AKM22584	NADH dehydrogenase subunit 6
<i>atp8</i>	100.0	88.6	AKM22539	ATP synthase F0 subunit 8
<i>cob</i>	99.5	761.0	QGX43798	Apocytochrome b
<i>nad1</i>	99.5	644.0	QGX43800	NADH dehydrogenase subunit 1
<i>cox1</i>	98.9	1 049.3	QGX43799	Cytochrome c oxidase subunit 1
<i>cox2</i>	99.6	512.7	QBG64912	Cytochrome c oxidase subunit 2
<i>nad2</i>	98.6	995.7	QGX43792	NADH dehydrogenase subunit 2
<i>nad4</i>	98.3	865.0	AOR87399	NADH dehydrogenase subunit 4
<i>atp9</i>	100.0	130.2	VFV16866	ATP synthase F0 subunit 9, partial
<i>nad5</i>	99.5	1 250.3	QGX43797	NADH dehydrogenase subunit 5
<i>nad3</i>	100.0	269.2	AKM22644	NADH dehydrogenase subunit 3
<i>rps3</i>	91.7	773.0	QGX43791	Ribosomal protein S3

表 3 蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 线粒体基因组 SSR 位点类型及分布

Table 3 Type and distribution of SSRs in the mitogenome of *Akanthomyces lecanii* RCEF6920

编号 No.	SSR 类型 SSR type	重复单元 Repeating unit	长度 Size (bp)	起始位置 Start site	终止位置 End site	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')	产物长度 Product size (bp)
1	p2	(TA) 7	14	4 781	4 794	ACGGCAGGAAAGCTAAGTTG	TCCTTAAGCCCAATGCAAGT	270
2	p3	(ATA) 5	15	7 413	7 427	-	-	-
3	p3	(ATT) 4	12	8 508	8 519	AGCAGGAGCAGGAGTAGGAA	CACCCACCTCCATCCCTTAT	250
4	p4	(ATTA) 4	16	9 547	9 562	CGGATGTCTTGATAATAGTTTCG	GATTCTGCTCCAGCAATAACAA	274
5	p3	(TTA) 4	12	13 054	13 065	GCTAACCCAATGCAAACACC	TCCAAATTCTATAAATGGACTT TCAAC	279
6	p3	(TTA) 4	12	14 037	14 048	TAAGTGGACCTGGGGTTCAA	TTCATCCTGTACTACTCCACC	261
7	p3	(TAT) 5	15	14 290	14 304	TTGCTTTACACTTATCAGGGG	ACCACCGGCTACTTCAAAGA	234
8	p4	(AATA) 3	12	15 927	15 938	ACGAAGCATAACAGTGCACAA	CCTTAGCTTTTTCGCTATGGT	258
9	p3	(TAA) 4	12	16 521	16 532	TCATCATTAGCCACATATGGAA	GGTGCTCTATTTGTTTCGGC	266
10	p4	(ATTT) 3	12	16 826	16 837	GACAGAACATGCCGCTGTAA	TGAACCAGTTAATGCTCTCTGA	226
11	p2	(AT) 7	14	18 819	18 832	GAACAGCATTTGGTGGTTCA	AAAAAGGTGTTAATGAGGCA	270
12	p3	(ATA) 4	12	19 985	19 996	GCCCCATTTATAGCTTTATTGT TTT	TGATAAGCTTGCTTACTTTTCT ACGA	256
13	p2	(AT) 5	10	20 717	20 726	TGAACTGGCAACTTGAGAA	ACTGCTGGCACGTAATTGGT	177
14	p2	(AT) 5	10	23 258	23 267	CACCATTTAGGTTATGAAGCA GG	CATTTCCGGATGGAAATCGAG	193

-: SSR 序列不满足引物设计条件

-: The SSR sequence fails to meet the primer design conditions.

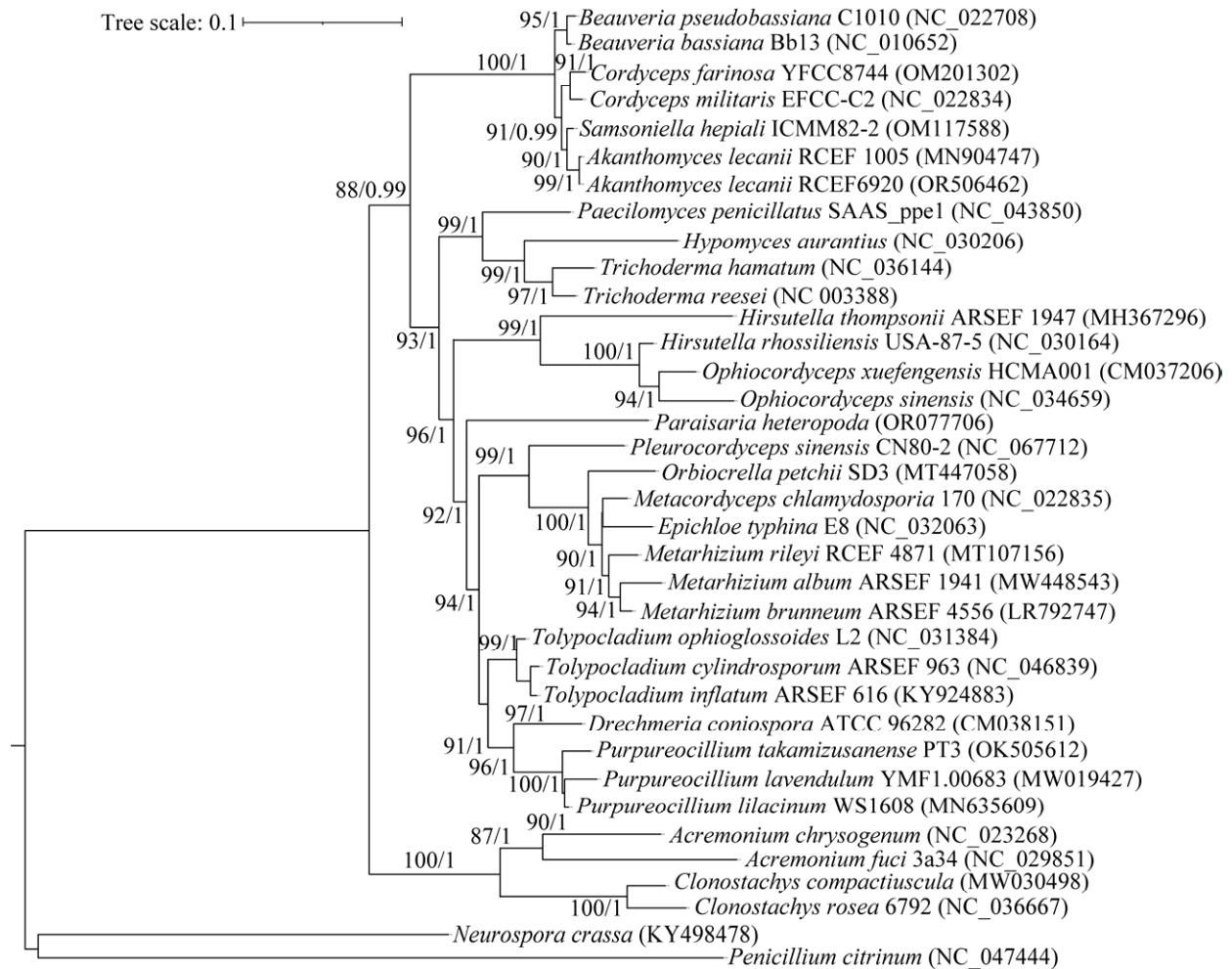


图 4 基于线粒体基因组 14 个编码蛋白基因串联序列构建肉座菌目系统发育树 分支上显示的是节点支持率, 反斜杠前是最大似然自举检验值(BP), 后是贝叶斯后验概率值(PP); 标尺表示进化距离; 括号中为菌株的 GenBank 登录号

Figure 4 Phylogenetic analysis of *Hypocreales* species based on concatenated sequences of 14 mitochondrial protein-coding genes. Numbers at the significant nodes represent Maximum likelihood bootstrap values (BP) and Bayesian posterior probabilities (PP); scale label presented distance scale; the numbers in parentheses are GenBank accession numbers of related strains.

表 4 虫草科线粒体基因组的比较

Table 4 Comparison of *Cordycipitaceae* mitochondrial genomes

物种 Species	基因组大小 Genome size (bp)	G+C 含量 G+C content (%)	基因数 Number of genes PCGs			编码区域长度占比 Percentage of coding region (%)
			rRNA	tRNA		
<i>Akanthomyces lecanii</i>	24 577	27.11	15	2	26	84.92
<i>Cordyceps militaris</i>	33 277	26.79	15	2	27	73.00
<i>Samsoniella hepiali</i>	24 246	26.60	15	2	25	85.10
<i>Cordyceps farinosa</i>	24 225	26.60	15	2	25	87.00
<i>Beauveria bassiana</i>	28 816	27.00	15	2	24	83.00
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	28 006	27.50	16	2	25	85.80
<i>Lecanicillium saksenae</i>	25 919	—	15	2	26	—
<i>Parengyodontium album</i>	28 081	25.87	17	2	24	81.88

—: 暂未发现相关数据

—: No relevant data has been found yet.

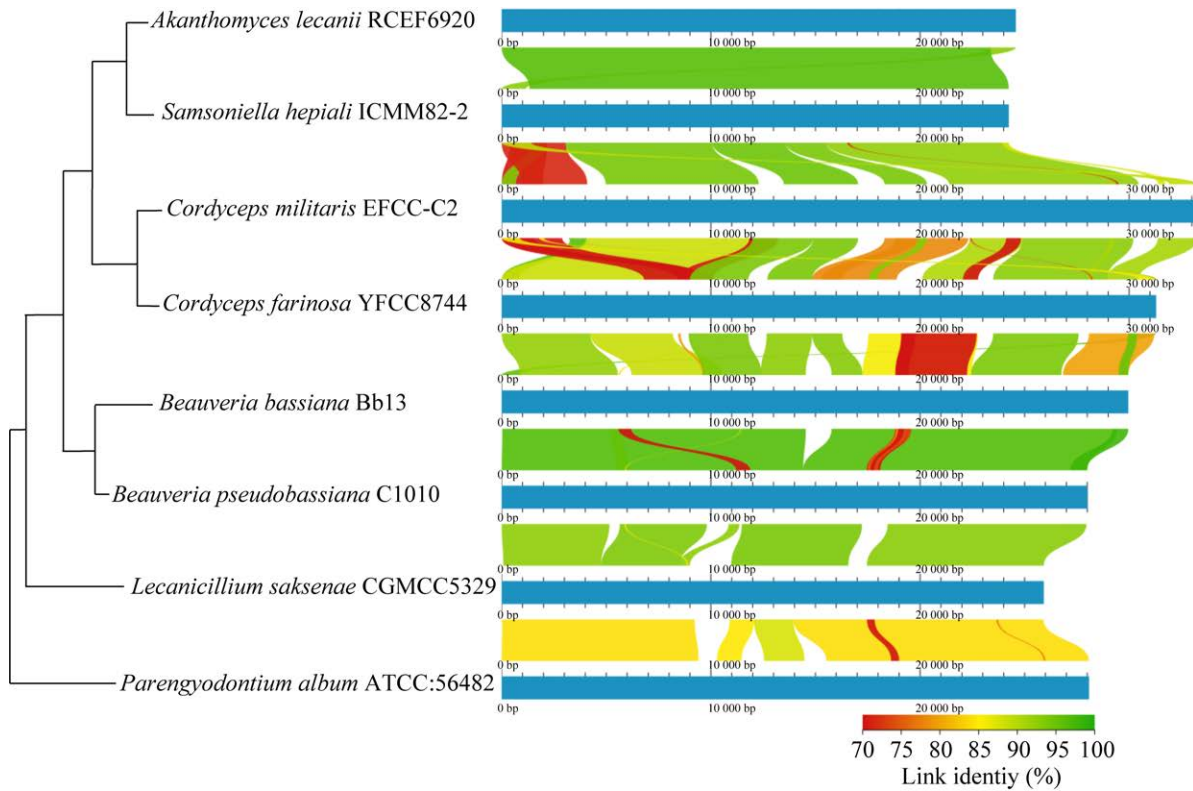


图5 八种虫草科物种线粒体基因组序列共线性分析

Figure 5 Collinearity analysis of the mitochondrial genome of eight species of *Cordycipitaceae*.

3 讨论与结论

线粒体基因组分析是快速发展的物种系统发育分类和进化关系研究新技术之一^[46]。截至2022年,已公布的真菌线粒体基因组数据约680种,其中肉座菌目60余种,虫草科10余种,依然有大量的真菌物种线粒体基因组仍未报道^[35,47-48]。因此需要对真菌物种线粒体基因组进行更多的探索,以获得真菌系统发育及其进化关系更深入的了解。

由于线粒体基因组突变率比核基因组编码序列高,源自线粒体基因组的基因序列对于系统发育、进化和群体遗传学研究具有重要价值,而且可利用的分子标记数量多^[49-50]。本研究通过对菌株 RCEF6920 线粒体基因组进行二代基因组测序、组装和注释,发现其线粒体基因组呈闭合

环状,大小为 24 577 bp。其基因区域占比 84.92%,共编码 43 个基因,包括 15 个 PCG、2 个 rRNA 基因和 26 个 tRNA 基因。本研究与 Zhang 等^[31]发表的蜡蚧刺束梗孢 RCEF1005 线粒体基因组(GenBank 登录号为 MN904747)中的基因数量和排列顺序相同,但基因组长度存在部分差异。本研究线粒体基因组总长度比已报道的 RCEF1005 多 66 bp,其中 *rnl* 基因长度多 19 bp, *cox1* 基因长度少 27 bp, *trnL* (*tag*)和 *trnQ* (*ttg*)、*trnC* (*gca*)和 *cox1*、*atp9* 和 *cox2* 基因区间分别多 39、27 和 8 bp。我们推测与线粒体测序组装方式和起始位置、统计方法以及种间拷贝数多态性不同有关,也可能是物种内环境等因素导致遗传分化的差异。

研究表明,重复基因元素呈现高度多样性,在真菌线粒体基因组中的积累可能促进重组,因

此通常被认为是导致线粒体基因组结构变异的主要因素^[30],包括属内变异^[51]。本研究发现,蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 存在 7 处正向重复,2 处回文重复,重复元素较少,这可能是刺束梗孢属线粒体基因组缺乏大规模重排的机制。简单重复序列(SSR),也被称为微卫星,代表了基因组的另一组重复元素。SSR 由于其高多态性、共显性遗传和多等位基因的特点,被广泛应用于包括真菌在内的许多生物的群体遗传学、遗传多样性或指纹分析等^[50,52-53]。蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 线粒体基因组中含有 14 个 SSR 位点,包含 4 个二核苷酸、7 个三核苷酸和 3 个四核苷酸。大多数的 SSR 位点富含碱基 A 和 T,其中三核苷酸重复序列是线粒体基因组中最丰富的 SSR 序列,这与之之前相关研究结果一致^[54-56]。此外,位于编码区域的 SSR 不会引起编码序列内的移码,它们被翻译成氨基酸重复序列,可能有助于蛋白质的生物学功能^[50,55]。

真菌主要类群的线粒体基因组在基因顺序、基因组大小、基因间区域的组成,以及重复序列、内含子和相关非规范开放阅读框(noncanonical ORF, ncORF)存在与否等方面具有显著差异^[30]。基因组大小、基因间区域的组成,重复序列、内含子等方面会有所不同,但基因含量和同源性在肉座菌目中保持高度保守^[57]。G+C 含量是常规报道基因组的基本特征之一,虽然有报道称高 G+C 含量对 DNA 结构的稳定性有积极影响^[58],并且可能与基因组大小呈正相关^[59],但也有研究表明在丛赤壳科(*Nectriaceae*)中线粒体基因组中 G+C 含量与基因组大小无任何相关性^[50]。本研究发现虫草科物种之间基因组大小差异较大,蜡蚧刺束梗孢基因组为 24 577 bp,蛹虫草线粒体基因组可达 33 277 bp,但 G+C 含量稳定在 27%左右,可见 G+C 含量与基因组大小无相关性,这可能与内含子、基因间区域的数量和大小、

重复序列的丰度等有关。虫草科物种线粒体基因组一般包含 15 个保守 PCG、2 个 rRNA 基因和 24-27 个 tRNA 基因。*Lecanicillium saksenae* (GenBank 登录号为 NC_028330)^[60]与本研究线粒体基因组中的基因类型和数量完全一致。而 *Parengyodontium album* (GenBank 登录号为 KX061492)^[45]线粒体基因组含有 17 个 PCG,多了 2 个基因编码开放阅读框,即 *orf77* 和 *orf148*。关于 *orf* 的鉴定和注释通常也仅仅基于生物信息学分析,很多无法确定其真实特征,即还不清楚它们是活性蛋白还是无功能性假基因^[50]。虽然 *orf* 是真菌线粒体基因组的常见结构元素,但它们的功能仍不清楚^[61]。本研究对蜡蚧刺束梗孢 RCEF6920 的线粒体基因组进行了测序、注释和分析,并比较了虫草科物种间线粒体基因组特征。研究结果发现真菌线粒体基因组信息适用于探索该物种的生物学、遗传多样性和医药药学以及虫草科和肉座菌目的系统发育及进化关系。

REFERENCES

- [1] LEBERT H. Ueber Einige Neue Oder Unvollkommen Gekannte Krankheiten der Insekten, Welche Durch Entwicklung Niederer Pflanzen im Lebenden Körper Entstehen[J]. Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie, 1858, 9: 439-453.
- [2] SHINYA R, AIUCHI D, KUSHIDA A, TANI M, KURAMOCHI K, KOIKE M. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 97(3): 291-297.
- [3] ISHIDOH KI, KINOSHITA H, IGARASHI Y, IHARA F, NIHIRA T. Cyclic lipodepsipeptides verlamelin A and B, isolated from entomopathogenic fungus *Lecanicillium* sp.[J]. The Journal of Antibiotics, 2014, 67(6): 459-463.
- [4] ALI ABDULLE Y, NAZIR T, SAYED S, MAHMOUD SF, MAJEED MZ, ASLAM HMU, IQBAL Z, NISAR MS, KEERIO AU, ALI H, QIU DW. Sub-lethal effects of *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann)-derived partially

- purified protein and its potential implication in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) defense against *Bemisia tabaci* *Gennadius* (Aleyrodidae: Hemiptera)[J]. Agriculture, 2021, 11(8): 778.
- [5] OBERHOFER M, WACKERLIG J, ZEHL M, BÜYÜK H, CAO JJ, PRADO-ROLLER A, URBAN E, ZOTCHEV SB. Endophytic *Akanthomyces* sp. LN303 from edelweiss produces emestrin and two new 2-hydroxy-4 pyridone alkaloids[J]. ACS Omega, 2021, 6(3): 2184-2191.
- [6] ALI KHAN A, BACHA N, AHMAD B, LUTFULLAH G, FAROOQ U, COX RJ. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2014, 4(11): 859-870.
- [7] HALL RA. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales[M]//BURGES HD ed. Microbial Control of Pests and Plant Diseases. London: Academic Press, 1981, 483-498.
- [8] AINI AN, MONGKOLSAMRIT S, WIJANARKA W, THANAKITPIPATTANA D, LUANGSA-ARD JJ, BUDI HARJO A. Diversity of *Akanthomyces* on moths (*Lepidoptera*) in Thailand[J]. MycoKeys, 2020, 71: 1-22.
- [9] de FARIA MR, WRAIGHT SP. *Mycoinsecticides* and *Mycoacaricides*: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types[J]. Biological Control, 2007, 43(3): 237-256.
- [10] RAVENSBERG WJ. A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.
- [11] WRAIGHT SP, LOPES RB, FARIA M. Microbial Control of Mite and Insect Pests of Greenhouse Crops[M]//Microbial Control of Insect and Mite Pests. Amsterdam: Elsevier, 2017: 237-252.
- [12] NICOLETTI R, BECCHIMANZI A. Endophytism of *Lecanicillium* and *Akanthomyces*[J]. Agriculture, 2020, 10(6): 205.
- [13] ZIMMERMANN A. Over een schimmel-epidemie der groene Luizen, Lorte Berichten uit's Lands Plantentuin[J]. Teusmania, 1899, 9: 240-243.
- [14] ZARE R, GAMS W. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov.[J]. Nova Hedwigia, 2001, 73(1/2): 1-50.
- [15] KEPLER RM, LUANGSA-ARD JJ, HYWEL-JONES NL, QUANDT CA, SUNG GH, REHNER SA, AIME MC, HENKEL TW, SANJUAN T, ZARE R, CHEN MJ, LI ZZ, ROSSMAN AY, SPATAFORA JW, SHRESTHA B. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*)[J]. IMA Fungus, 2017, 8(2): 335-353.
- [16] ABDEL-RAHEEM MA, AHMED AL-K L. Virulence of three entomopathogenic fungi against whitefly, *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) (*Hemiptera*: *Aleyrodidae*) in tomato crop[J]. Journal of Entomology, 2017, 14(4): 155-159.
- [17] ESPINOSA DJL, Da SILVA IHS, DUARTE RT, GONÇALVES KC, POLANCZYK RA. Potential of entomopathogenic fungi as biological control agents of whitefly (*Bemisia tabaci* biotype B) (Genn.) (*Hemiptera*: *Aleyrodidae*)[J]. Journal of Experimental Agriculture International, 2019, 36(6): 1-8.
- [18] BROUMANDNIA F, RAJABPOUR A, PARIZIPOUR MHG, YARAHMADI F. Morphological and molecular identification of four isolates of the entomopathogenic fungal genus *Akanthomyces* and their effects against *Bemisia tabaci* on cucumber[J]. Bulletin of Entomological Research, 2021, 111(5): 628-636.
- [19] MILLER TC, GUBLER WD, LAEMMLEN FF, GENG S, RIZZO DM. Potential for using *Lecanicillium lecanii* for suppression of strawberry powdery mildew[J]. Biocontrol Science and Technology, 2004, 14(2): 215-220.
- [20] VANDERMEER J, PERFECTO I, LIERE H. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web[J]. Plant Pathology, 2009, 58(4): 636-641.
- [21] GOETTEL MS, KOIKE M, KIM JJ, AIUCHI D, SHINYA R, BRODEUR J. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(3): 256-261.
- [22] HENZE K, MARTIN W. Evolutionary biology: essence of mitochondria[J]. Nature, 2003, 426(6963): 127-128.
- [23] HU M, CHILTON NB, GASSER RB. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics[J]. Advances in Parasitology, 2004, 56: 133-212.
- [24] BOTERO-CASTRO F, TILAK MK, JUSTY F, CATZEFLIS F, DELSUC F, DOUZERY EJP. Next-generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats

- (*Phyllostomidae*)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 69(3): 728-739.
- [25] NOVIČIĆ ZK, IMMONEN E, JELIĆ M, ANĐELKOVIĆ M, STAMENKOVIĆ-RADAK M, ARNQVIST G. Within-population genetic effects of mtDNA on metabolic rate in *Drosophila subobscura*[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2015, 28(2): 338-346.
- [26] QIU F, KITCHEN A, BEERLI P, MIYAMOTO MM. A possible explanation for the population size discrepancy in tuna (genus *Thunnus*) estimated from mitochondrial DNA and microsatellite data[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 66(2): 463-468.
- [27] KOROVIŠI AG, NTERILIS M, KOUVELIS VN. Mt-*rps3* is an ancient gene which provides insight into the evolution of fungal mitochondrial genomes[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2018, 127: 74-86.
- [28] BULLERWELL CE, LANG BF. Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 362-369.
- [29] COSTA GGL, CABRERA OG, TIBURCIO RA, MEDRANO FJ, CARAZZOLLE MF, THOMAZELLA DPT, SCHUSTER SC, CARLSON JE, GUILTINAN MJ, BAILEY BA, MIECZKOWSKI P, PEREIRA GAG, MEINHARDT LW. The mitochondrial genome of *Moniliophthora roreri*, the frosty pod rot pathogen of cacao[J]. *Fungal Biology*, 2012, 116(5): 551-562.
- [30] AGUILETA G, de VIENNE DM, ROSS ON, HOOD ME, GIRAUD T, PETIT E, GABALDÓN T. High variability of mitochondrial gene order among fungi[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(2): 451-465.
- [31] ZHANG YJ, YANG XB, ZHANG S. Complete mitogenome of the entomopathogenic fungus *Akanthomyces lecanii*[J]. *Mitochondrial DNA Part B, Resources*, 2020, 5(1): 1021-1022.
- [32] BOORE JL. Animal mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [33] HOPPER AK, PHIZICKY EM. tRNA transfers to the limelight[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(2): 162-180.
- [34] 汪婷. 蜘蛛病原真菌物种多样性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2022.
- WANG T. Study on species diversity of spider-pathogenic fungi[D]. Hefei: Master's thesis of Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [35] ZHAO ZY, ZHU KF, TANG DX, WANG YB, WANG Y, ZHANG GD, GENG YP, YU H. Comparative analysis of mitochondrial genome features among four *Clonostachys* species and insight into their systematic positions in the order *Hypocreales*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5530.
- [36] GREINER S, LEHWARK P, BOCK R. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W59-W64.
- [37] VALACH M, BURGER G, GRAY MW, LANG BF. Widespread occurrence of organelle genome-encoded 5S rRNAs including permuted molecules[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(22): 13764-13777.
- [38] MARÇAIS G, DELCHER AL, PHILLIPPY AM, COSTON R, SALZBERG SL, ZIMIN A. MUMmer 4: a fast and versatile genome alignment system[J]. *PLoS Computational Biology*, 2018, 14(1): e1005944.
- [39] LOHSE M, DRECHSEL O, BOCK R. Organellar Genome DRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes[J]. *Current Genetics*, 2007, 52(5): 267-274.
- [40] BIBI S, WANG D, WANG YB, MUSTAFA G, YU H. Mitogenomic and phylogenetic analysis of the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps lanpingensis* and comparative analysis with other *Ophiocordyceps* species[J]. *Genes*, 2023, 14(3): 710.
- [41] CHAN PP, LOWE TM. tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences[M]//Gene Prediction. New York: Humana, 2019: 1-14.
- [42] DARLING ACE, MAU B, BLATTNER FR, PERNA NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394-1403.
- [43] STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [44] RONQUIST F, HUELSENBECK JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [45] YUAN XL, MAO XX, LIU XM, CHENG S, ZHANG P, ZHANG ZF. The complete mitochondrial genome of *Engyodontium album* and comparative analyses with *Ascomycota* mitogenomes[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2017, 40(4): 844-854.
- [46] WANG TH, ZHANG SQ, PEI TW, YU ZJ, LIU JZ. Tick mitochondrial genomes: structural characteristics and phylogenetic implications[J]. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1): 451.

- [47] 孙涛, 李天昊, 黄偶, 祝孔福, 陈思琪, 王雅南, 王垚, 王元兵, 虞泓. 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[J]. 菌物学报, 2022, 41(10): 1572-1584.
- SUN T, LI TH, HUANG O, ZHU KF, CHEN SQ, WANG YN, WANG Y, WANG YB, YU H. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome of the *Samsoniella hepiali* holotype strain[J]. Mycosystema, 2022, 41(10): 1572-1584 (in Chinese).
- [48] CHEN SQ, WANG YB, ZHU KF, YU H. Mitogenomics, phylogeny and morphology reveal *Ophiocordyceps pingbianensis* sp. nov., an entomopathogenic fungus from China[J]. Life, 2021, 11(7): 686.
- [49] DOYLE JM, BELL DA, BLOOM PH, EMMONS G, FESNOCK A, KATZNER TE, LaPRÉ L, LEONARD K, SanMIGUEL P, WESTERMAN R, ANDREW DEWOODY J. New insights into the phylogenetics and population structure of the prairie falcon (*Falco mexicanus*)[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 233.
- [50] ANDROSIUK P, OKORSKI A, PAUKSZTO Ł, JASTRZĘBSKI JP, CIESIELSKI S, PSZCZÓŁKOWSKA A. Characterization and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the pathogenic fungus *Ilyonectria destructans*[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 2359.
- [51] LI Q, WANG QF, JIN X, CHEN ZQ, XIONG C, LI P, ZHAO J, HUANG WL. Characterization and comparison of the mitochondrial genomes from two *Lyophyllum* fungal species and insights into phylogeny of *Agaricomycetes*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 364-372.
- [52] MAHFOOZ S, SINGH P, MAURYA DK, YADAV MC, TAHOOR A, SAHAY H, SRIVASTAVA A, PRAKASH A. Microsatellite repeat dynamics in mitochondrial genomes of phytopathogenic fungi: frequency and distribution in the genic and intergenic regions[J]. Bioinformatics, 2012, 8(23): 1171-1175.
- [53] JIMÉNEZ-BECERRIL MF, HERNÁNDEZ-DELGADO S, SOLÍS-OBA M, GONZÁLEZ PRIETO JM. Analysis of mitochondrial genetic diversity of *Ustilago maydis* in Mexico[J]. Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2018, 29(1): 1-8.
- [54] KARAOGLU H, LEE CMY, MEYER W. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes[J]. Molecular Biology and Evolution, 2005, 22(3): 639-649.
- [55] KIM TS, BOOTH JG, GAUCH HG Jr, SUN Q, PARK J, LEE YH, LEE K. Simple sequence repeats in *Neurospora crassa*: distribution, polymorphism and evolutionary inference[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 31.
- [56] KANG XC, HU LQ, SHEN PY, LI R, LIU DB. SMRT sequencing revealed mitogenome characteristics and mitogenome-wide DNA modification pattern in *Ophiocordyceps sinensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1422.
- [57] LI Y, LIN J, WANG YH, WANG K, WANG RL, ZHAO XC, YAO YJ. Complete mitochondrial genome of *Pleurocordyceps sinensis* (*Hypocreales*, *Ascomycota*), a species with uncertain family-level taxonomic assignment[J]. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2022, 14(4): 212-226.
- [58] GALTIER N, LOBRY JR. Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes[J]. Journal of Molecular Evolution, 1997, 44(6): 632-636.
- [59] VINOGRADOV AE. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship[J]. Cytometry, 1998, 31(2): 100-109.
- [60] XIN B, LIN RM, SHEN BM, MAO ZC, CHENG XY, XIE BY. The complete mitochondrial genome of the nematophagous fungus *Lecanicillium saksenae*[J]. Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2017, 28(1): 52-53.
- [61] DUÒ A, BRUGGMANN R, ZOLLER S, BERNT M, GRÜNIG CR. Mitochondrial genome evolution in species belonging to the *Phialocephala fortinii* s.l. - *Acephala applanata* species complex[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 166.