

研究报告

Research Report

基于全基因组重测序鉴定四株金针菇线粒体序列差异

吕晓萌 王祥锋 张大伟 王庆佶 王威*

山东农业大学植物保护学院, 山东省农业微生物重点实验室, 泰安, 271018

* 通信作者, uniwangwei@sdau.edu.cn

摘要 在真核细胞中, 线粒体是氧化磷酸化的发生部位。它广泛存在于生物体中, 具有独立的遗传物质 DNA, 能够参与细胞质遗传。目前金针菇线粒体基因组已经被解析, 但在不同菌株中的多态性仍未见报道。本研究结合已经公布的金针菇菌株 4019-20 线粒体基因组, 组装和注释了重测序的 3 株金针菇(6-3, 6-21, L22)线粒体序列。基因组比较分析表明: 金针菇线粒体基因组长度在 87 646~88 508 bp 之间, 编码蛋白数量均为 15 个, 编码 tRNA 数目为 26 个, 编码 rRNA 大亚基和小亚基的基因各 1 个。除 4019-20 菌株含有 9 个内含子外, 其余菌株均含有 10 个内含子。进一步对四株金针菇线粒体基因组结构共线性分析, 结果表明: 在 4 个菌株中含有 4 个差异片段, 其中差异片段 I 为 *cox1* 基因第 4 内含子(菌株 4019-20 缺失)。同时, 我们还检测到金针菇线粒体基因组中有两个片段存在移位现象, 在移位位点处存在 ~1.6 kbp 和 ~2.8 kbp 的多态性片段。本研究结果能为金针菇线粒体基因组结构和遗传特性研究提供一定数据基础。

关键词 金针菇; 线粒体; 差异片段; 基因组结构

Distinction Identification among Four *Flammulina velutipes* Mitochondrial Sequences based on whole Genome Resequencing

Lü Xiaomeng Wang Xiangfeng Zhang Dawei Wang Qingji Wang Wei*

College of Plant Protection of Shandong Agricultural University, Shandong Provincial Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Tai'an, 271018

* Corresponding author, uniwangwei@sdau.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0020

Abstract In eukaryotic cells, mitochondria are the sites of oxidative phosphorylation. It is widely present in organisms and has independent genetic material DNA, can participate in cytoplasmic inheritance. At present, the mitochondrial genome of *Flammulina velutipes* has been analyzed, but its polymorphism in different strains has not been reported yet. In this study, we assembled and annotated the mitochondrial sequences of three *F. velutipes* (6-3, 6-21, L22) in combination with the published mitochondrial genome of *F. velutipes* 4019-20. The comparative analysis of genomes showed that the mitochondrial genome length of *F. velutipes* was between 87 646~88 508 bp, the number of encoded proteins is 15, the number of encoded tR-NA is 26, and the gene encoding rRNA large and small subunits is 1 in each. All strains contained 10 introns except 4019-20, which contained 9 introns. Further synteny of the mitochondrial genome structure of the four *F. velutipes* strains showed that there were four different fragments among the four strains, among which the different fragment I was the 4th intron of COX1 gene (absent in strain 4019-20). Meanwhile, we also detected two translocation fragments in *F. velutipes*

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2021 年 5 月 12 日; 接受日期: 2021 年 5 月 12 日; 发表日期: 2021 年 5 月 19 日

引用格式: 吕晓萌, 王祥锋, 张大伟, 王庆佶, 王威, 2021, 基于全基因组重测序鉴定四株金针菇线粒体序列差异, 分子植物育种(网络版), 19(20): 1-6 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0020) (Lü X.M., Wang X.F., Zhang D.W., Wang Q.J., and Wang W., 2021, Distinction identification among four *Flammulina velutipes* mitochondrial sequences based on whole genome resequencing, *Fengzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding (online)), 19(20): 1-6 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0020))

表 1 四株金针菇菌株线粒体基因组基本特征

Table 1 Basic parameters of four *F. velutipes* mitochondrial genomes

菌株 Strains	长度(bp) Length (bp)	GC 含量(%) GC (%)	编码蛋白 Protein-coding genes	tRNA 数目 tRNA number	rRNA 数目 rRNA number	内含子个数 Intron number
4019-20	88,508	16.5	15	26	2	cox1 (7); cob (1); nad5 (1)
6-3	87,646	16.7	15	26	2	cox1 (8); cob (1); nad5 (1)
6-21	87,979	16.7	15	26	2	cox1 (8); cob (1); nad5 (1)
L22	88,390	16.7	15	26	2	cox1 (8); cob (1); nad5 (1)

表明,菌株 4019-20 较其他三株菌株缺失第四个内含子(表 2)。四株单核体菌株之间所含内含子的种类、长度和开放阅读框也存在部分差异。

1.3 线粒体基因组差异片段鉴定

我们进一步在 NCBI 对四株金针菇线粒体差异片段进行了分析(图 2),经过与注释结果(表 3)比对,发现 4 个差异片段均注释到了 ORF。其中,差异片段 I 可以编码 GIY-YIG 型归巢核酸内切酶,差异片段 II 不能编码蛋白,差异片段 III 可以编码 RNA 聚合酶,差异片段IV 也不能编码蛋白。

1.4 移位片段鉴定

通过对四株金针菇线粒体基因组数据的共线性分析,我们还鉴定到在金针菇线粒体中存在着两个移位片段(~400 bp; ~600 bp)。菌株 6-3、菌株 6-21 和菌株 L22 基因片段 1 和基因片段 2 所在的位置基本一致,但是菌株 4019-20 的基因片段 1 和基因片段 2 所在的位置同其他三株测序菌株的位置相比较发生了移位(图 3)。

2 讨论

线粒体细胞器存在于大多数真核生物中(Karnkowska et al., 2016)。mtDNA 的共同特征是 A+T 含量高、缺乏甲基化、基因功能保守、拷贝数高

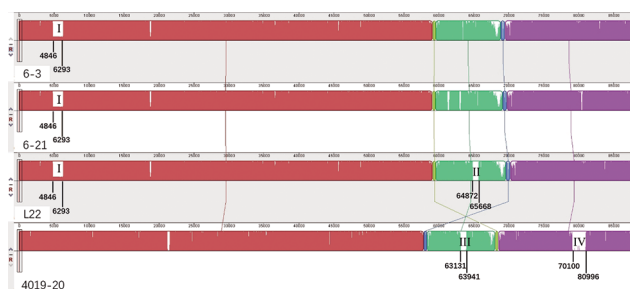


图 2 四株金针菇线粒体基因组共线性比对

Figure 2 Synteny comparison of four *F. velutipes* mitochondrial genomes

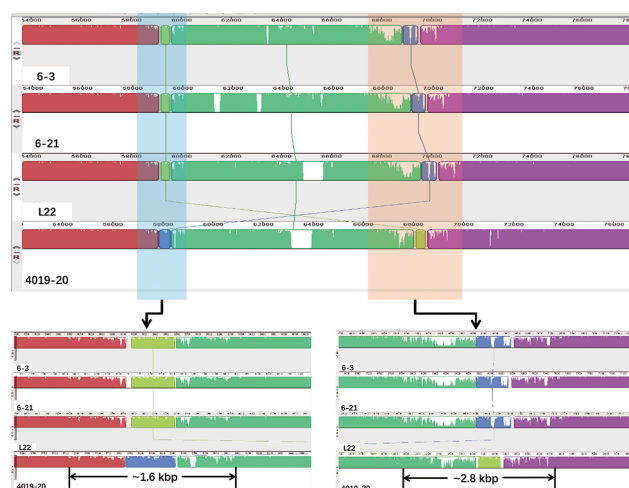


图 3 移位片段多态性对比

Figure 3 Polymorphisms of translocation fragments

(Campbell et al., 1999)。随着高通量测序技术的快速发展,越来越多的真菌线粒体基因组被测序和表征。所报道的基因组通常包含一组相似的保守基因,包括 14 个蛋白编码基因 (nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5, nad6, atp6, atp8, atp9, cox1, cox2, cox3 和 cob)、一组 tRNA 以及大小核糖体 RNA (rns 和 rnl),某些真菌还含有核糖体蛋白 S3 (rps3)。Sclerotinia borealis 的 mtDNA 长 203 051 bp 是已知最大的真菌线粒体基因组之一,主要取决于可移动的遗传元素的存在,其中包括 61 个内含子(Mardanov et al., 2014)。内含子分布在 12 个蛋白质编码基因和核糖体 RNA 基因中,共 125 394 bp。大多数内含子包含完整或截断的 ORF,与 LAGLIDADG 和 GIY-YIG 家族的归巢内切酶有关 (Mardanov et al., 2014)。真菌 mtDNA 中内含子的数量不等,至今为止尚未发现真菌线粒体基因中内含子具有物种特异性。通过研究发现,随着基因中内含子数量的减少,真菌线粒体基因组也随之变小。研究表明,真菌线粒体内含子的进化是复杂的,真菌线粒体基因组发生变化的重要原因可能是内含子的变化(Deng et al., 2018)。

目前,对于金针菇线粒体基因组的比较分析研究较

表 2 金针菇线粒体内含子概况

Table 2 Overview of mitochondrial introns in *F. velutipes*

菌株	内含子	种类	长度	开放阅读框	保守区域
Strains	Intron	Class	Length (bp)	ORF	Conserved domain
4019-20	Cox1-i1	IB	1 576	orf381	GIY-YIG_SF superfamily
	Cox1-i2	IB (3')	1 515	orf372	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i3	IB	1 257	orf387	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i4	I (derived)	1 496	orf240	*
	Cox1-i5	IB (5'), IB (3')	1 116	orf345	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i6	IB	1 619	orf330; orf111	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i7	IA	1 343	orf234	GIY-YIG_Cterm
	Cob-i1	ID	1 525	orf344	grplintron_endonuclease
	Nad5-i1	IC2	1 282	orf418_2	LAGLIDADG_1 superfamily
	6-3	Cox1-i1	IB	1 566	orf381
Cox1-i2		IB (3')	1 534	orf372	LAGLIDADG_1 superfamily
Cox1-i3		IB	1 257	orf387	LAGLIDADG_1 superfamily
Cox1-i4		IB	1 449	orf375	GIY-YIG_SF superfamily
Cox1-i5		I (derived)	1 496	orf240	*
Cox1-i6		IB (5')	1 116	orf345	LAGLIDADG_1 superfamily
Cox1-i7		IB	1 618	orf330; orf111	LAGLIDADG_1 superfamily
Cox1-i8		IA	1 332	orf283	grplintron_endonuclease
Cob-i1		ID	1 525	orf344	grplintron_endonuclease
Nad5-i1		IC2	1 282	orf327	LAGLIDADG_1 superfamily
6-21	Cox1-i1	IB	1 566	orf381	GIY-YIG_SF superfamily
	Cox1-i2	IB (3')	1 534	orf372	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i3	IB	1 257	orf387	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i4	IB	1 449	orf349	GIY-YIG_SF superfamily
	Cox1-i5	*	1 496	orf240	*
	Cox1-i6	*	1 116	orf345	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i7	IB	1 618	orf330; orf111	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i8	IA	1 332	orf283	grplintron_endonuclease
	Cob-i1	ID	1 526	orf314	grplintron_endonuclease
	Nad5-i1	IC2	1 282	orf327	LAGLIDADG_1 superfamily
L22	Cox1-i1	IB	1 566	orf381	GIY-YIG_SF superfamily
	Cox1-i2	IB (3')	1 534	orf372	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i3	IB	1 257	orf387	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i4	IB	1 449	orf375	GIY-YIG_SF superfamily
	Cox1-i5	I (derived)	1 496	orf240	*
	Cox1-i6	IB (5')	1 116	orf345	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i7	IB	1 618	orf330; orf111	LAGLIDADG_1 superfamily
	Cox1-i8	IA	1 332	orf283	grplintron_endonuclease
	Cob-i1	ID	1 525	orf344	grplintron_endonuclease
	Nad5-i1	IC2	1 282	orf327	LAGLIDADG_1 superfamily

注: *: 表示 " 无 "

Note: *: means "none"

少。本实验着重对 4 株金针菇线粒体基因组结构进行共线性分析, 实验结果最终表明: 在这 4 个不同的

菌株中含有 4 个差异片段, 其中差异片段 I 为 *cox1* 基因第 4 内含子(菌株 4019-20 缺失)。同时, 我们还

表 3 四株金针菇线粒体基因组差异片段注释

Table 3 Annotation on the different fragments of four *Flammulina velutipes* mitochondrial genomes

差异片段	菌株	位置	注释结果	编码蛋白	E 值	GenBank 登录号
Differential fragments	Strains	Position	Annotation	Encoding proteins	E-value	GenBank Accession no.
I	6-3	4 846-6 293	Cox1-i4; orf375	GIY-YIG type homing endonuclease	1e-166	YP_009129959.1
	6-21	4 846-6 293	Cox1-i4; orf349	GIY-YIG type homing endonuclease	2e-166	YP_009129959.1
	L22	4 846-6 293	Cox1-i4; orf375	GIY-YIG type homing endonuclease	1e-166	YP_009129959.1
II	L22	64 872-65 668	orf657	*	*	*
III	4019-20	63 131-63 941	orf832	RNA polymerase	6e-14	BAB13498.1
IV	4019-20	79 100-80 996	orf370;	*	*	*

注: *: 表示 "无"

Note: *: means "none"

表 4 位移片段注释

Table 4 Annotation of translocation fragments

菌株	片段 1		片段 2	
	Fragment 1		Fragment 2	
	位置	注释	位置	注释
Strains	Position	Annotation	Position	Annotation
6-3	59177-59583	orf379	68 856-69 486	orf500
6-21	59120-59526	orf379	69 144-69 729	orf485
L22	59178-59584	orf379	69 600-70 230	orf500
4019-20	68102-68508	orf245	57 857-58 326	orf384

检测到金针菇线粒体基因组中有两个片段存在移位现象, 在移位位点处存在 ~1.6 kbp 和 ~2.8 kbp 的多态性片段。这些差异片段的获得可为下一步开发分子标记用于金针菇菌株鉴定以及种质资源分析提供帮助。本研究对金针菇线粒体基因组结构差异进行了分析, 也有助于对基于线粒体遗传特性的金针菇新品种选育。

3 材料与方 法

3.1 供试菌株基因组数据

本研究共选用四株金针菇菌株的基因组序列进行分析。单核菌株 4019-20 线粒体基因组下载自 GenBank, 登录号为 JN190940.1。重测序的单核菌株 6-3、6-21 和 L22 基因组数据均由福建省食用菌种质资源保藏与管理中心提供。

3.2 线粒体基因组的组装

使用本地本地 BLASTN 同源搜索程序 ($E \leq 1e-5$), 将 6-3、6-21 和 L22 菌株的全基因组序列与 4019-20 菌株线粒体基因组进行比对分析, 分别筛选出各菌株的线粒体基因组片段(Scaffolds, Contigs 和

Nodes)。各菌株线粒体基因组长度、GC 含量由 DNAMAN 软件进行计算分析。使用 Mauve 软件对各菌株线粒体基因组进行共线性比对分析, 校正各菌株线粒体基因组(Darling et al., 2004)。线粒体图谱采用在线程序 CGView Server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cg-view_server/)绘制。

3.3 线粒体基因组的注释

分将四株金针菇线粒体基因组序列输入线粒体在线注释程序 MFannot (<http://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/mfannot/mfannotInterface.pl>) (Genetic code: Yeast Mitochondrial), 对其进行注释。使用该程序能够对线粒体基因组的蛋白编码基因、rRNA、tRNA、内含子类型和 ORF 完成注释。对四株金针菇菌株的内含子类型、长度、内含子 ORF 进行统计, 并将内含子序列使用 BLASTX 程序进行在线比对, 分析其保守区域。

3.4 移位片段分析

使用 Mauve 软件共线性分析, 对线粒体 DNA 上基因排列进行比较, 筛选大于和等于 500 bp 的 DNA 差异片段, 并对其注释结果进行分析(Darling et al., 2004)。使用 BLASTX 程序进行在线比对, 分析差异片段可能的基因功能。同时, 根据线性比对结果, 鉴定移位片段的位置特征。

作者贡献

吕晓萌是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 王祥锋、张大伟、王庆佳参与实验设计和试验结果分析; 王威是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目 (31902086)和山东省自然科学基金项目(ZR2018BC041)共同资助。

参考文献

- Adams K.L., and Palmer J.D., 2003, Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29(3): 380-395.
- Brankovics B., Peter V.D., Martijn R., Sybren D.H.G., Lee T.A.J., Cees W. and Van D.A.D., 2017, Mitochondrial genomes reveal recombination in the presumed asexual *Fusarium oxysporum* species complex, *BMC Genomics*, 18(1): 735.
- Campbell A., Mrázek J., and Karlin S., 1999, Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(16): 9184-9189.
- Darling A.C.E., Mau B., Blattner F.R., and Perna N.T., 2004, Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements, *Genome Res.*, 14:1394-1403.
- Deng Y.J., Hsiang T., Li S.X., Lin L.J., Wang Q.F., Chen Q.F., Xie B.G., and Ming R., 2018, Comparison of the Mitochondrial Genome Sequences of Six *Annulohyphomyces stygium* Isolates Suggests Short Fragment Insertions as a Potential Factor Leading to Larger Genomic Size, *Front. Microbiol.*, 9: 2079.
- Jimenez M., Goodchild S.C., Stockwell C.A., and Lema S.C., 2017, Characterization and phylogenetic analysis of complete mitochondrial genomes for two desert cyprinodontoid fishes, *Empetrichthys latos* and *Crenichthys baileyi*, *Gene*, 626: 163-172.
- Kang X.C., Hu L.Q., Shen P.Y., Li R., and Liu D.B., 2017, SM-RT Sequencing Revealed Mitogenome Characteristics and Mitogenome-Wide DNA Modification Pattern in *Ophiocordyceps sinensis*, *Front. Microbiol.*, 8:1422.
- Karnkowska A., Vacek V., Zubáková Z., Treitli S., Petrůšková P., Eme L., Novák L., Šárský V., Barlow L.D., Herman E.K., Soukal P., Hroudová M., Doležal P., Stairs C.W., Roger A.J., Eliáš M., Dacks J.B., and Vlček J., Hampel V., 2016, A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle, *Curr. Biol.*, 1274-1284
- Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kadnikov V.V., Ignatov A.N., and Ravin N.V., 2014, The 203 kbp Mitochondrial Genome of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotinia borealis* Reveals Multiple Invasions of Introns and Genomic Duplications, *Plos One*, 9(9): e107536.
- Mumo K.A., Diana W.B., Theodora S.E., Sanushka N., Albertus V.D.M.N., and Borkovich K.A., 2016, Intron Derived Size Polymorphism in the Mitochondrial Genomes of Closely Related *Chrysosporthe* Species, *Plos One*, 11(6): e0156104.
- Park Y.J., Baek J.H., Lee S., Kim C., Rhee H., Kim H., Seo J.S., Park H.R., Yoon D.E., Nam J.Y., Kim H.I., Kim J.G., Yoon H., Kang H.W., Cho J.Y., Song E.S., Sung G.H., Yoo Y.B., Lee C.S., Lee B.M., and Kong W.S., 2014, Whole Genome and Global Gene Expression Analyses of the Model Mushroom Reveal a High Capacity for Lignocellulose Degradation, *Plos One*, 9(4): e93560-.
- Shen X.Y., Li T., Chen S., Fan L., Gao J., and Hou C.L., 2015, Characterization and Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome of *Shiraia bambusicola* Reveals Special Features in the Order of Pleosporales, *Plos One*, 10(3): e0116466.
- van Peer A.F., Park S.Y., Shin P.G., Jang K.Y., Yoo Y.B., Park Y.J., Lee B.M., Sung G.H., James T.Y., and Kong W.S., 2011, Comparative Genomics of the Mating-Type Loci of the Mushroom *Flammulina velutipes* Reveals Widespread Synteny and Recent Inversions, *Plos One*, 6(7): e22249.
- Yamasaki H., Izumiyama S., and Nozaki T., 2017, Complete sequence and characterization of the mitochondrial genome of *Diphyllobothrium stemmacephalum*, the type species of genus *Diphyllobothrium* (Cestoda: Diphyllobothriidae), using next generation sequencing, *Parasitol. Int.*, 66(5): 573-578.
- Yoon H., You Y.H., Woo J.R., Park Y.J., Kong W.S., Lee B.M., and Kim J.G., 2012, The mitochondrial genome of the white-rot fungus *Flammulina velutipes*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58(4): 331-337.
- Yuan X.L., Feng C., Zhang Z.F., and Zhang C.S., 2017, Complete Mitochondrial Genome of *Phytophthora nicotianae* and Identification of Molecular Markers for the Oomycetes, *Front. Microbiol.*, 08: 1484
- Zhang S., Wang X.N., Zhang X.L., Liu X.Z., and Zhang Y.J., 2017a, Complete mitochondrial genome of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*: features and evolution, *Appl. Microbiol. Biot.*, 101(4): 1593-1604
- Zhang Y.J., Zhang H.Y., Liu X.Z., and Zhang S., 2017b, Mitochondrial genome of the nematode endoparasitic fungus *Hirsutella vermicola* reveals a high level of synteny in the family *Ophiocordycipitaceae*, *Appl. Microbiol. Biot.*, 101(8): 3295-3304