

柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi* 微管蛋白基因的克隆及系统发育分析*

王 勇^{1,2**} 黄 伶^{2**} 姜义仁² 文 竹² 于 峰¹ 石生林² 秦 利^{2***}

(1. 沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学生物科学技术学院 辽宁省昆虫资源工程技术研究中心 沈阳 110866)

摘 要 【目的】柞蚕微孢子病的病原为柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi*, 为解明柞蚕微孢子虫微管蛋白基因的序列信息, 明确柞蚕微孢子虫的系统分类学地位。【方法】采用 RT-PCR、3' RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 等技术克隆得到了柞蚕微孢子虫的 α 、 β 和 γ -微管蛋白基因, 并利用 α 、 β -微管蛋白序列, 分别采用 NJ、ML 法构建进化树。【结果】将克隆得到的基因序列提交 NCBI (GenBank 登录号: KF154086、KF023271、KF740389)。构建的系统发育树显示, 微孢子虫类以一个独立群位于真菌群体中, 与真菌的虫霉门关系较近, 且与担子菌、球囊菌、壶菌、接合菌及部分子囊菌互为姐妹群。从部分微孢子虫的系统发育分析结果可以看出, 20 种微孢子虫分为 2 个分支, 柞蚕微孢子虫与其他 *Nosema* 属聚为一类。【结论】本研究克隆得到了柞蚕微孢子虫 α 、 β 和 γ -微管蛋白基因, 系统发育分析为更进一步了解柞蚕微孢子虫奠定了基础。

关键词 柞蚕微孢子虫, 微管蛋白基因, 系统发育分析

Cloning and phylogenetic analysis of the tubulin genes of *Nosema pernyi*

WANG Yong^{1,2**} HUANG Ling^{2**} JIANG Yi-Ren² WEN Zhu² YU Feng^{1,2}
SHI Sheng-Lin² QIN Li^{2***}

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Liaoning Engineering and Technology Resource Center for Insect Resource, Shenyang 110866, China)

Abstract [Objectives] The purpose of this project was to investigate tubulin gene sequences of *Nosema pernyi* in order to provide a foundation for further phylogenetic analysis. [Methods] Using RT-PCR, 3' RACE technology, α , β and γ -tubulin genes of *N. pernyi* were cloned. Neighbour-Joining and Maximum Likelihood were used to construct a phylogenetic tree. [Results] α , β and γ -tubulin cDNA sequences of *N. pernyi* were submitted to NCBI (GenBank accession numbers: KF154086, KF023271, KF740389). Phylogenetic analysis shows that the microsporidia are a single group in the fungi that are most closely related to the Entomophthoromycota, and are sistergroups to the Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota and some of the Ascomycota. *N. pernyi*, together with other *Nosema* spp., belongs to one of two groups in the microsporidia. [Conclusion] α , β and γ -tubulin genes of *N. pernyi* can be successfully cloned and the resultant phylogenetic analysis provides a foundation for further taxonomic research on *N. pernyi*.

Key words *Nosema pernyi*, tubulin genes, phylogenetic analysis

微管 (Microtubule) 是细胞骨架的重要组成部分, 也是纤毛、鞭毛等运动性器官及中心粒

* 资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-22); 沈阳市发改委科研项目 (2011154); 沈阳农业大学国家自然科学基金启动基金 (20112002); 沈阳农业大学青年基金项目 (201010002)

**同等贡献作者, E-mail: yongwang216@163.com; ling_74521@126.com

***通讯作者, E-mail: qinli1963@163.com

收稿日期: 2013-11-08, 接受日期: 2013-12-20

的重要组分(徐忠东和吴琴, 1999)。真核生物中已经确认的微管蛋白有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 和 η -微管蛋白, 其中 α 、 β -微管蛋白普遍存在于真核生物细胞中, 它们以异二聚体形式组装成多聚体而构成原纤丝, 13 条原纤丝纵向排列构成中空的圆柱状结构而构成微管 (Nogales *et al.*, 1998); δ 、 ϵ 、 ζ 和 η -微管蛋白在真核生物体内不常见 (Dutcher, 2001)。 α 、 β -微管蛋白序列高度保守, 常被用来进行不同物种之间亲缘关系的分析, 目前微孢子虫有关微管蛋白的研究主要集中在 α 、 β -微管蛋白。Keeling (2003) 利用部分微孢子虫的 α 和 β -微管蛋白与其他真菌进行进化分析, 结果显示微孢子虫在进化上属于接合菌 (Zygomycetes) 的分支。对家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 的 α 和 β -微管蛋白进行系统发育分析, 结果显示了家蚕微孢子虫与真菌的亲缘关系, 且与接合菌的噬虫酶属 *Entomophaga*、耳霉属 *Conidiobolus* 关系最近 (朱勃等, 2006; 张海燕等, 2007)。 γ -微管蛋白发现于构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 中 (Oakley and Oakley, 1989), 常位于各种微管组织中心 (Microtubule organizing centers, MTOCs), 参与微管蛋白的装配和取向, 该蛋白在细胞中的含量较低 (董辉等, 2002)。研究发现 γ -微管蛋白几乎存在于所有的真核生物中, 在人、果蝇、真菌、酵母、锥虫中都发现了 γ -微管蛋白, 其氨基酸同源性在 60% 以上 (徐忠东和吴琴, 1999)。此外, γ -微管蛋白和 α 、 β -微管蛋白之间也有 28%~35% 的同源性, 研究表明三者可能来源于相同的祖先 (Burns, 1995)。尽管 γ -微管蛋白的含量很少, 但对 α 、 β -微管的装配、取向起着重要的调节作用, 三者隶属于同一蛋白质超家族 (谭明等, 1998)。

微孢子虫 (Microsporidia) 是一类专性细胞内寄生的单细胞生物, 广泛寄生于脊椎和无脊椎动物, 最先于家蚕 *Bombyx mori* 体内发现, 目前已鉴定的微孢子虫有 160 个属 1 300 余种 (Corradi *et al.*, 2008)。柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi*, Wen *et al.* 是引起柞蚕 *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville 微孢子病的病原物, 是柞蚕蚕种生产中唯一的检疫对象 (秦利, 2003)。通过对核糖体小亚基 rRNA (SSU rRNA), 转录间隔区 (ITS), 5S rRNA 的全长, 和部分核糖体大亚基 rRNA (LSU rRNA) 分析表明柞蚕微孢子虫的核糖体基因排序为 LSU-ITS1-SSU-

ITS2-5S (王林玲等, 2006; Wang *et al.*, 2006)。Xu 和 Zhou (2010) 利用 RPB1, α 、 β -tubulin 分析了 *Nosema* 属 13 种微孢子虫的亲缘关系, 表明了 *Nosema antheraeae* 与家蚕微孢子虫较近的亲缘关系。本试验通过开展柞蚕微孢子虫的系统分类学研究, 对于更进一步了解柞蚕微孢子虫的分类地位, 明确与其他微孢子虫之间的亲缘关系, 为柞蚕微孢子虫分类和进化的研究提供更多的分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂和仪器

柞蚕微孢子虫由沈阳农业大学柞蚕研究所收集保存。试剂和仪器包括: Percoll (Amersham Pharmacia); RNAiso Plus、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、3'-Full RACE Core Set with Prime Script® RTase、DNA A-Tailing Kit、pMD®18-T Vector、Competent Cell DH5 α (TAKARA); DEPC、Ampicillin (Sigma); Quick Gel Extraction Kit (康为世纪); 超高速离心机 (Hitachi); 冷冻离心机 (中科中佳); T-100 PCR 仪、凝胶成像系统 (Bio-Rad)。

1.2 柞蚕微孢子虫的制备及纯化

选取 5 龄柞蚕幼虫, 每头舔食约 10^6 个柞蚕微孢子虫孢子, 常规饲养、化蛹羽化后收集病蛾, 去翅和头部, 孢子粗提参考邓真华等 (2010)、纯化采用姜义仁等 (2011) 方法进行。纯化后液氮速冻, -80°C 保存备用。

1.3 柞蚕微孢子虫 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

取纯化后的新鲜或冻存的柞蚕微孢子虫孢子经液氮研磨后, 加入 RNAiso Plus 中, 按照说明书操作提取总 RNA, 取 4 μL 电泳检测。按说明书配制 20 μL 的反应体系, cDNA 合成后 -20°C 保存备用。

1.4 引物设计和基因的克隆

α -tubulin 基因正向引物的设计以柞蚕微孢子虫 cDNA 文库中筛选的 EST 序列为依据; 相近物种同源序列的保守区域为模板设计反向引

物。其他各基因的引物设计类似： α -tub-F: (5'-ATGAG AGAAA TTATT TCAAT TCACA TC-3')， α -tub-R: (5'-TCTTC CATAC CTTCT CCTAC GTACC A-3')； β -tub-F: (5'-GGATG AGAGA AATTA TTCAC TTACA AACAG-3')， β -tub-R: (5'-GGCCT CAGAA CTCCA TCTCA TCCAT-3')； γ -tub-F: (5'-ATGAG AGAAA CGGTT ACATT AAAAA-3')， γ -tub-R: (5'-CACAT ACTTT CTCAC GACAT TCATC-3')。

50 μ L 反应体系：33 μ L ddH₂O、10 μ L 5×PrimeSTAR® Buffer (Mg²⁺ plus)、正向引物和反向引物各 1 μ L (10 μ M)，4 μ L dNTP，0.5 μ L PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L)、0.5 μ L cDNA 模板。PCR 反应程序：98℃，10 s；54℃，5 s；72℃，30 s；30 个循环。PCR 反应体系结束后，使用 DNA A-Tailing Kit 72℃ 延伸 20 min 进行加尾。取 4 μ L 胶回收产物与 pMD®18-T Vector 连接，转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，蓝白斑筛选后挑取白色菌落进行 PCR 鉴定，挑取阳性克隆进行测序。

1.5 利用 RACE 技术克隆柞蚕微孢子虫 α -tubulin、 β -tubulin 和 γ -tubulin 基因的 3' 端序列

参照试剂盒说明，以 3' RACE Adaptor 代替传统的 oligdT 进行逆转录反应。根据已经测序得到的基因序列，在序列的近 3' 端设计一条引物，以 3' RACE Outer Primer 为反向引物进行 PCR 扩增后连接 T 载，测序后与 5' 端序列进行拼接，得到序列全长，将序列提交 NCBI。

1.6 序列分析

氨基酸二级结构预测采用 SOPMA 工具进行 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html)；蛋白质分子量等电点预测利用 Computepl/Mw tool 工具 (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)；采用 TMpred 进行跨膜区预测 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)；蛋白质功能位点分析采用 PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)；3D 结构的构建利用 SWISS MODEL WORKSPACE (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线分析工具完成 (Schwede *et al.*, 2003)；并通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序

列的同源性比对，选取真菌类的同源序列，利用 MEGA 5.0 软件，使用邻近归并法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 α 、 β 和 γ -tubulin 基因 cDNA 序列的克隆

提取柞蚕微孢子虫总 RNA 后 (图 1: A)，逆转录成 cDNA，利用设计的引物进行 PCR 反应，产物大小约为 1 200 bp (图 1: B)，与预期的长度一致，连接 T 载体后测序，根据已知的序列进行 3' RACE，得到的序列进行拼接，得到一段含有 polyA 结尾的 cDNA 序列。

2.2 α 、 β 和 γ -tubulin cDNA 序列的生物信息学分析

通过 RT-PCR 和 3' RACE 技术得到序列进行测序并进行序列拼接，得到了一段完整的 cDNA 序列，通过与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对，检索到的都是同源物种相关的微管蛋白基因序列。由此推断克隆得到的 cDNA 序列为柞蚕微孢子虫的微管蛋白基因序列，其中 α -tubulin、 β -tubulin 和 γ -tubulin 基因 ORF 长度分别为 1 323、1 326 和 1 299 bp，分别编码 440、439 和 431 个氨基酸 (GenBank 登录号分别为 KF154086、KF023271 和 KF740389)。 α -微管蛋白的 α 螺旋约占 42.95%，延伸链约占 14.77%， β 转角约占 5.23%，随机卷曲结构约占 37.05%，推测的蛋白分子量 (Mw) 49.21 ku，等电点 (pI) 5.48，跨膜区预测显示有 6 个跨膜氨基酸跨膜结构； β -微管蛋白的 α 螺旋约占 45.12%，延伸链约占 15.42%， β 转角约占 4.31%，随机卷曲结构约占 35.15%，推测的蛋白分子量 (Mw) 49.36 ku，等电点 (pI) 4.91，有 6 个跨膜氨基酸跨膜结构； γ -微管蛋白的 α 螺旋约占 43.52%，延伸链约占 15.28%， β 转角约占 3.47%，随机卷曲结构约占 37.73%，理论推测的蛋白分子量 (Mw) 48.74 ku，等电点 (pI) 5.90，有 9 个跨膜氨基酸跨膜结构。 α 、 β 和 γ -微管蛋白 3D 结构的构建基于模型 3du7.1.C、3edl.1.E 和 1z5v.1.A 完成，其序列一致性分别达到 71.14%、77.05% 和 48.49% (图 2)。

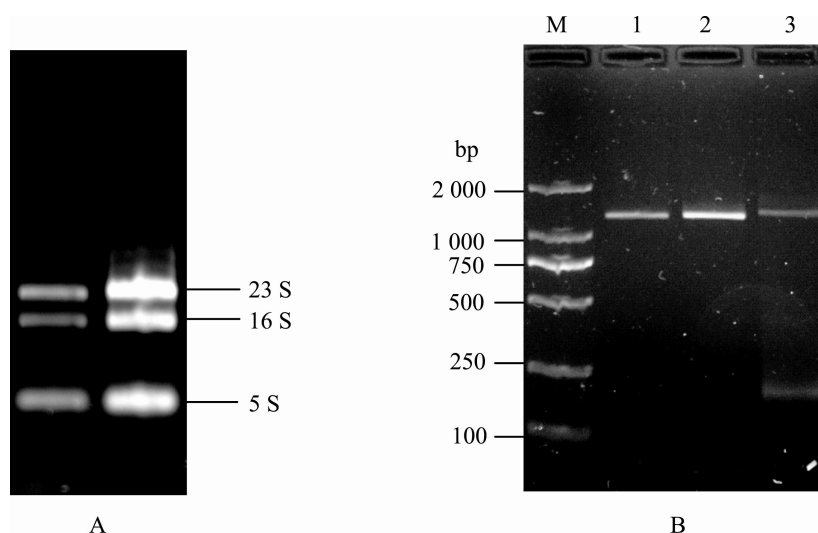


图1 柞蚕微孢子虫 RNA 的提取 (A) 及 α 、 β 和 γ -微管蛋白基因的 PCR 扩增片段 (B)

Fig. 1 RNA extraction of *Nosema pernyi* (A), α , β and γ -tubulin PCR products (B)

M: 2 000 bp 分子质量标准; 1: α -微管蛋白基因; 2: β -微管蛋白基因; 3: γ -微管蛋白基因。

M: 2 000 bp DNA marker; 1: α -tubulin; 2: β -tubulin; 3: γ -tubulin.

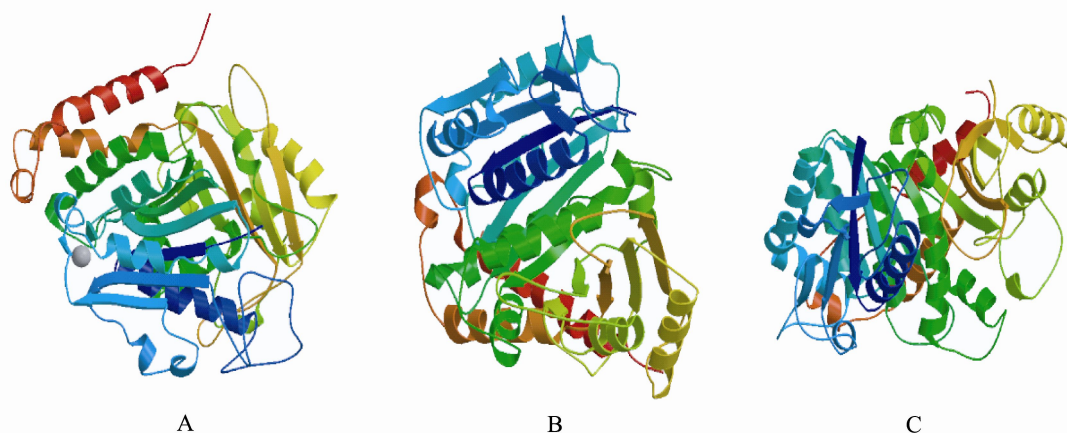


图2 柞蚕微孢子虫 α 、 β 和 γ -微管蛋白三维结构带状图

Fig. 2 The ribbon models of *Nosema pernyi* α , β and γ -tubulin

A: α -微管蛋白; B: β -微管蛋白; C: γ -微管蛋白。

A: α -tubulin; B: β -tubulin; C: γ -tubulin.

α 、 β -微管蛋白氨基酸序列包含 MREI 保守区、GTP 核苷酸结合位点 (GGGTGSG) (图 3)。该氨基酸片段在一部分物种中为 GGGTGSG, 但有些物种中, 第 6 位 S 变为了 A, 但其功能未发

生改变, 仍然是 GTP 核苷酸结合位点, 是微管蛋白的标志信号片段 (图 3)。

2.3 基于 α 、 β -微管蛋白序列进行柞蚕微孢子虫

* 资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-22); 沈阳市发改委科研项目 (2011154); 沈阳农业大学国家自然科学基金启动基金 (20112002); 沈阳农业大学校青年基金项目 (201010002)

**同等贡献作者, E-mail: yongwang216@163.com; ling_74521@126.com

***通讯作者, E-mail: qinli1963@163.com

收稿日期: 2013-11-08, 接受日期: 2013-12-20

的系统进化分析

从 NCBI 中收集 41 个真菌物种和 1 个原生动物的 α 、 β -微管蛋白序列，合并之后用 NJ 法构建系统发育树，以原生动物盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 作为外群，1 000 次重复，构建的系统树见图 4。

以 α 、 β -微管蛋白构建的系统进化树表明，微孢子虫类以一个独立群位于真菌群体中，与真菌的虫霉门关系较近，且与担子菌、球囊菌、壶菌、接合菌及部分子囊菌互为姐妹群，子囊菌中的 *C. albicans* 和 *S. cerevisiae* 与其他子囊菌关系较远。柞蚕微孢子虫与家蚕微孢子虫 *N. bombycis*、蓖麻蚕微孢子虫 *N. philosamiae*、小菜蛾微孢子虫 *N. plutellae* 及家蚕内网虫属微孢子虫（镇江）*Endoreticulatus* sp. zhenjiang 的氨基酸序列一致，亲缘关系近。

由于 *Nosema* 属的氨基酸序列相似度高，为了进一步探讨不同种微孢子虫之间的亲缘关系，利用 α 、 β -微管的核苷酸序列，以 *N. pernyi* 的 γ -微管核苷酸序列为外群，1 000 次重复，采用 ML 法构建了进化树（图 5）。

从部分微孢子虫的系统发育分析结果可以看出，20 种微孢子虫分为两个分支，其中 *Nosema* 属聚在一起，与 *H. magnivora*、*A. algerae*、鮡鰈微孢子虫 *S. lophii* 等起源于同一节点；香鱼微孢

子虫 *G. plecoglossi*、蝗虫微孢子虫 *A. locustae*、按蚊微孢子虫 *E. aedis* 与脑炎微孢子虫等聚为另外的一支。

3 讨 论

α 、 β -微管蛋白已经成为很多研究者进行系统发育分析的靶基因之一，已经广泛用于动植物及真菌的分类学研究（秦松柏等，2008；徐建强等，2012；饶国栋和张建国，2013）。在研究微孢子虫与真菌的关系中，微管蛋白基因与其他蛋白基因得到的结果最为一致（张平和刘吉平，2007）。本研究克隆得到的柞蚕微孢子虫 α 、 β 和 γ -微管蛋白基因，BLAST 分析表明与同源序列的相似度达到 90% 以上，与 NCBI 中提交的家蚕微孢子虫 α -微管蛋白（GenBank 登录号：EOB13968）、兔脑炎微孢子虫 β -微管蛋白（GenBank 登录号：NP_597591）和家蚕微孢子虫 γ -微管蛋白（GenBank 登录号：EOB14892）全长序列的氨基酸长度一致。其中， α 、 β -微管蛋白中都包含 MREI 保守区、GTP 核苷酸结合位点。MREI 是转录后调控信号，GTP 核苷酸结合位点是 α 、 β -微管蛋白结合的必要结构（Kirschner and Mitchison, 1986）。柞蚕微孢子虫 α 、 β -微管蛋白氨基酸序列与 *N. antheraeae*、*N. philosamiae*、

```

1  ATGAGAGAAATTATTTCAATTCACATCGGACAGGCAGGTATCCAAATAGGTAATGCGTGT
   M R E I I S I H I G Q A G I Q I G N A C
61  TGGGAAGTGTACTGTAAGAACACGGTATAATCCAGATGGTACACTGGATGATAATGCT
   W E L Y C K E H G I N P D G T L D D N A
361 AGAATGGCTGATAATTGTGAAGTCTTCAAGGATTTTAAATTTTCATTCTTTGGTGGT
   R M A D N C E G L Q G F L I F H S F G G
421 GGTACTGTTCTGTTTGGGTCTCTTCTTATGGACAGACTTGATGCTGAATTGGAAAG
   G T G S G F G S L L M D R L D A E F G K

```

A

```

1  ATGAGAGAAATTATTTCACTTACAAACAGGTCAGTGTGTAATCAAGTAGGAGGAAAGTTC
   M R E I I H L Q T G Q C G N Q V G G K F
61  TGGGAGACTATTTCTAATGAACATGGTATAAGTCTGAGGTAATACGTAGGAACATCA
   W E T I S N E H G I S P E G K Y V G T S
361 AGAAAAGAAGCTGAATCTTCGGATTGTCTTCAGGGATTTAGATTACACACTCTTTGGGT
   R K E A E S S D C L Q G F Q I T H S L G
421 GGGGTAAGTGTGTCAGGAATGGGAACCTTCTCATTCTAAAATTAGAGAAGAATTTTCA
   G G T G A G M G T L L I S K I R E E F S

```

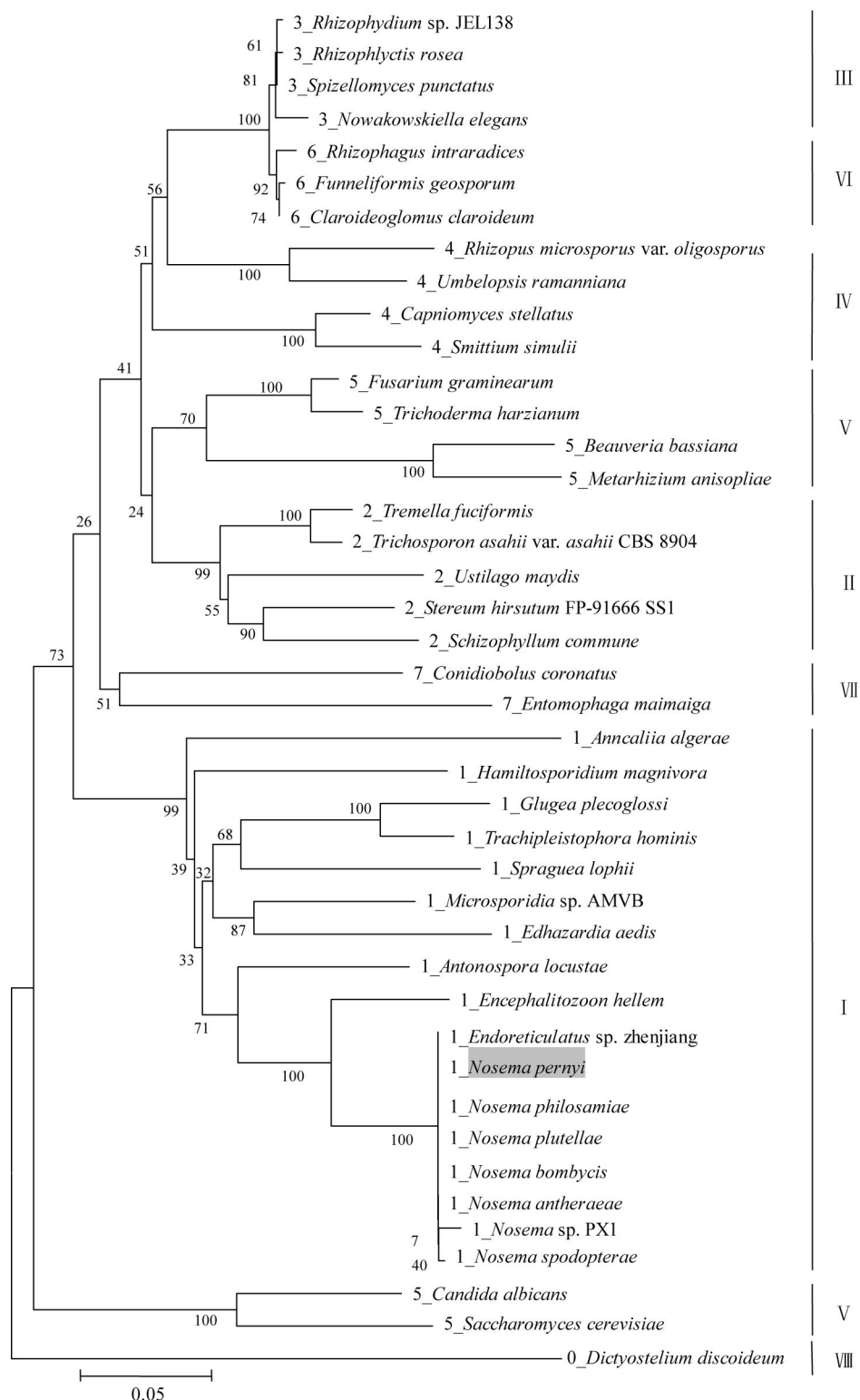
B

图 3 柞蚕微孢子虫 α 、 β -微管蛋白 MREI、GTP 核苷酸结合位点保守区

Fig. 3 The conserved motif of MREI, GTP nucleotide binding site of α , β -tubulin in *Nosema pernyi*

A: α -微管蛋白; B: β -微管蛋白; 保守区氨基酸用灰色阴影表示。

A: α -tubulin; B: β -tubulin; Conserved region of amino acid are under gray background.

图 4 基于 α 、 β -微管蛋白序列构建的系统发育树Fig. 4 Phylogenetic tree based on α and β -tubulin amino acid sequence

I. 微孢子虫门 Microsporidia; II. 担子菌门 Basidiomycota; III. 壶菌门 Chytridiomycota; IV. 接合菌门 Zygomycota; V. 子囊菌门 Ascomycota; VI. 球囊菌门 Glomeromycota; VII. 虫霉门 Entomophthoromycota; VIII. 原生动物 Protozoa.

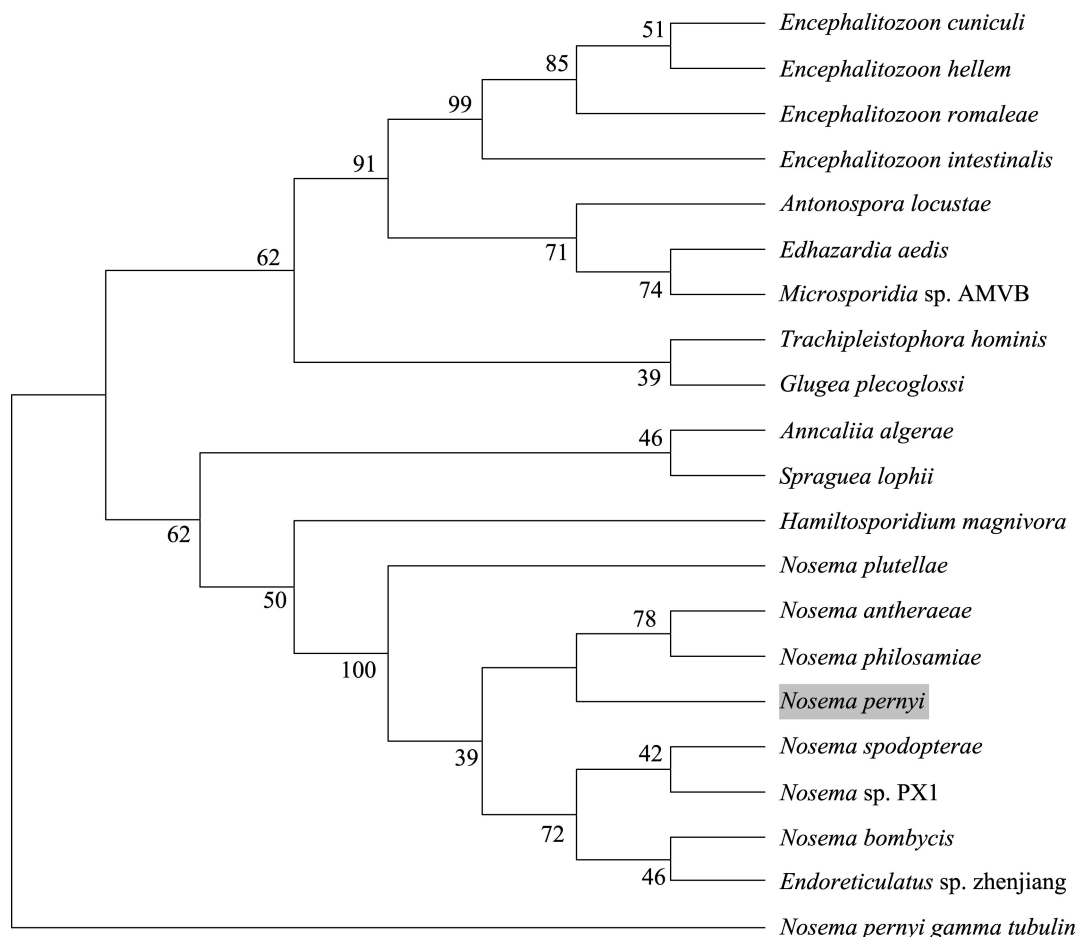


图 5 基于 α 、 β -微管蛋白核苷酸序列构建的部分微孢子虫系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of some microsporidiums based on α and β -tubulin nucleic acid sequence

N. bombycis 及 *N. plutellae* 同源性达到 100%。微管作为细胞骨架的基本成分，蛋白序列相当保守，这类基因的表达量在细胞内比较稳定，利用这一特点，可以开发作为定量 PCR 的内参基因使用（闫硕等，2012）。

根据构建的系统发育树，微孢子虫类聚为一支，与其他真菌起源于同一个节点，而原生动物则为单独的一支位于整个真菌界外的另一个节点。这也是 Keeling（2003）认为微孢子虫起源于真菌的主要依据。随着微孢子虫分类研究的深入，利用 (SSU) rRNA、ITS、RPB1、HSP70 等序列对微孢子虫进行发育分析（Germot *et al.*, 1997；潘敏慧等，2003；Rao *et al.*, 2004），使得微孢子虫起源于真菌这一观点更加广泛的被人们所认可。但微孢子虫在真菌内部的具体分类地位仍比较混乱，Gill 和 Fast（2006）认为，微孢子虫与子囊菌和担子菌互为姐妹群；James 等

（2006）利用 6 个基因构建的进化树支持微孢子虫与壶菌的亲缘关系；本研究结果表明，微孢子虫与虫霉及由担子菌、子囊菌、接合菌、壶菌组成的集合共同起源于同一分支。微孢子虫与虫霉门的关系较近，而虫霉门在早期的分类中属于接合菌的虫霉目，这与 Gill 和 Fast（2006）及张海燕等（2007）的研究结果相似。微孢子虫以独立的一支与其他聚集的真菌起源于同一个节点，从这个结果判断，不能得出结论微孢子虫就属于真菌，但在其外侧仍有部分子囊菌，说明微孢子虫与真菌之间还是有着一定的联系。向恒等（2010）认为，微孢子虫应归属于真菌，且与接合菌之间的亲缘关系较近，可能来源于一株接合菌的祖先。不同的学者对于微孢子虫的分类结果有一定差异，有关微孢子虫在真菌中的定位还需要更进一步的研究。

在对微孢子虫之间亲缘关系的研究中，脑炎

微孢子虫聚在一起, *Nosema* 属聚为一支, 说明微孢子虫的分类与其寄主有着一定的联系。其中 *Nosema* 属中包含的内网虫属 *Endoreticulatus* sp. zhenjiang 是家蚕体内 4 种微孢子虫中的一种, 与 *Nosema* 属的亲缘关系很近, 与家蚕微孢子虫核苷酸序列相似度达到 98%, 因此也与其他 *Nosema* 属聚在一起。大型蚤微孢子虫 *H. magnivora* 鲢鳊微孢子虫 *S. lophii* 位于分支的外侧, 蝗虫微孢子虫以前归属于 *Nosma* 属 (*N. locustae*, 后改名为 *A. locustae*), Slamovits 等 (2004) 认为其亲缘关系与 *Nosema* 属较远, 本试验的结果与其一致。柞蚕微孢子虫 *N. pernyi* 和蓖麻蚕微孢子虫 *N. philosamiae* 核苷酸序列相似度很高, 相对于家蚕微孢子虫亲缘关系更近, 可能是由于柞蚕与蓖麻蚕同为野蚕, 且柞蚕微孢子虫可以感染蓖麻蚕而不能感染家蚕。 *N. pernyi* 和 *N. antheraeae* 寄主都是柞蚕, *N. pernyi* 为柞蚕微孢子虫新种 (丁杰等, 1992), 在辽宁地区为优势种。两者之间可能会因为不同的地理环境, 造成了核苷酸序列之间的微小差异 (*N. antheraeae* 来自我国的河南省南阳一化性地区, 而 *N. pernyi* 则来自于辽宁省沈阳二化性地区)。本研究通过克隆柞蚕微孢子虫 α 、 β 和 γ -微管蛋白基因, 并以 α 、 β -微管蛋白基因序列对柞蚕微孢子虫进行系统发育分析, 探讨了柞蚕微孢子虫与其他微孢子虫之间的亲缘关系, 但有关微孢子虫在真菌界的具体分类地位仍需进一步的研究。

参考文献 (References)

- Burns RG, 1995. Analysis of the γ -tubulin sequences: Implication for the functional properties of γ -tubulin. *J. Cell Sci.*, 108(6): 2123–2130.
- Corradi N, Gangaeva A, Keeling PJ, 2008. Comparative profiling of overlapping transcription in the compacted genomes of microsporidia *Antonosporea locustae* and *Encephalitozoon cuniculi*. *Genomics*, 91(4): 388–393.
- Dutcher SK, 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13(1): 49–54.
- Germot A, Philippe H, Le Guyader H, 1997. Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasit.*, 87(2): 159–168.
- Gill EE, Fast NM, 2006. Assessing the microsporidia-fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene*, 375(1): 103–109.
- James TY, Kauff F, Schöck CL, 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113): 818–822.
- Keeling PJ, 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of Microsporidia. *Fungal. Genet. Biol.*, 38(3): 298–309.
- Kirschner M, Mitchison T, 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*, 45(3): 329–342.
- Nogales E, Wolf SG, Downing KH, 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391(6663): 199–203.
- Oakley CE, Oakley BR, 1989. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 338(6217): 662–664.
- Rao SN, Muthalakshmi M, Kanginakudru S, Nagaraju J, 2004. Phylogenetic relationships of three new microsporidian isolates from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, 86(3): 87–95.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC, 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3381–3385.
- Slamovits CH, Williams BA, Keeling PJ, 2004. Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonosporea locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51(2): 207–213.
- Wang LL, Chen KP, Zhang Z, Yao Q, Gao GT, Zhao Y, 2006. Phylogenetic analysis of *Nosema antheraeae* (Microsporidia) isolated from Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53(4): 310–313.
- Xu JS, Zhou ZY, 2010. Improving phylogenetic inference of microsporidian *Nosema antheraeae* among *Nosema* species with RPB1, α - and β -tubulin sequences. *Afr. J. Biotechnol.*, 9(46): 7900–7904.
- 邓真华, 姜义仁, 杨瑞生, 张涛, 秦利, 姜德富, 2010. 应用 PCR 技术检测柞蚕微孢子虫. 蚕业科学, 36(2): 359–362. [DENG ZH, JIANG YR, YANG RS, ZHANG T, QIN L, JIANG DF, 2010. Application of PCR Technology in the Inspection of *Nosema pernyi*. *Science of Sericulture*, 36(2): 359–362.]
- 丁杰, 宿桂梅, 问锦曾, 1992. 中国柞蚕微孢子虫病病原的研究. 蚕业科学, 18(2): 88–92. [DING J, SU GM, WEN JZ, 1992. Study on the Pebrine Pathogens in Chinese Tussah Silkworm, *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville. *Science of Sericulture*, 18(2): 88–92.]
- 董辉, 李越中, 胡玮, 2002. γ -微管蛋白研究进展. 生物化学与生物物理进展, 29(5): 686–690. [DONG H, LI YZ, HU W, 2002. Progress in Gamma-tubulin. *Progress In Biochemistry and*

- Biophysics*, 29(5): 686–690.]
- 姜义仁, 邓真华, 王伯阳, 段玉玺, 秦利, 2011. 柞蚕微孢子虫分离纯化方法. *应用昆虫学报*, 48(2): 452–456. [JIANG YR, DENG ZH, WANG BY, DUAN YX, QIN L, 2011. Study on the method of separation and purification in *Nosema pernyi*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 452–456.]
- 潘敏慧, 万永继, 鲁成, 周泽扬, 向仲怀, 2003. 家蚕内网虫属微孢子虫核糖体小亚单位 RNA (SSUrRNA) 核心序列的克隆和序列分析. *动物学报*, 49(3): 414–420. [PAN MH, WAN YJ, LU C, ZHOU ZY, XIANG ZH, 2003. Cloning and analysis of the core sequence of small subunit ribosomal RNA of *Endoreticulatus bombycis*. *Current Zoology*, 49(3): 414–420.]
- 秦利, 2003. 中国柞蚕学. 北京: 中国科学文化出版社. 347–352. [QIN L, 2003. Chinese Tussah. Beijing: China Scientific & Cultural Press. 347–352.]
- 秦松柏, 樊东, 李春杰, 许艳丽, 2008. 小卷蛾斯氏线虫 β -微管蛋白基因的克隆与序列分析. *东北林业大学学报*, 36(7): 72–74. [QIN SB, FAN D, LI CJ, XU YL, 2008. Cloning and Sequences analysis of β -Tubulin cDNA from *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Northeast Forestry University*, 36(7): 72–74.]
- 饶国栋, 张建国, 2013. 植物微管蛋白基因研究进展. *世界林业研究*, 26(3): 17–20. [RAO GD, ZHANG JG, 2013. Advances of Studies on Plant Tubulin Gene. *World Forestry Research*, 26(3): 17–20.]
- 谭明, 谷福, 梁爱华, 1998. γ -微管蛋白: 微管蛋白超家族的新成员. *山西大学学报 (自然科学版)*, 21(3): 297–302. [TAN M, GU F, LIANG AH, 1998. γ -Tubulin: A New Member of the Tubulin Superfamily. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 21(3): 297–302.]
- 王林玲, 陈克平, 姚勤, 高贵田, 赵远, 2006. 柞蚕微孢子核糖体基因和转录间隔区的序列及系统进化分析. *中国农业科学*, 39(8): 1674–1679. [WANG LL, CHEN KP, YAO Q, GAO GT, ZHAO Y, 2006. The Sequence and Phylogenetic Analysis of the Ribosomal RNA Gene and the ITS Region of *Nosema antheraeae*. *Scientia Agricultura Sinica*, 39(8): 1674–1679.]
- 向恒, 潘国庆, 陶美林, 李田, 王营, 周泽扬, 2010. 家蚕微孢子虫全基因组分析支持微孢子虫与真菌的亲缘关系. *蚕业科学*, 36(3): 442–446. [XIANG H, PAN GQ, TAO ML, LI T, WANG Y, ZHOU ZY, 2010. Genetic Relationship Between Microsporidia and Fungi is Supported by the Whole Genomic Analysis of *Nosema bombycis*. *Science of Sericulture*, 39(8): 1674–1679.]
- 徐建强, 张聪, 于金凤, 彭迪, 周明国, 2012. 小麦赤霉病菌 α -微管蛋白原核表达及纯化研究. *植物病理学报*, 42(3): 252–259. [XU JQ, ZHANG C, YU JF, PENG D, ZHOU MG, 2012. Expression and purification of *Fusarium graminearum* α -tubulin in *Escherichia coli*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 42(3): 252–259.]
- 徐忠东, 吴琴, 1999. 微管蛋白的研究进展. *安徽教育学院学报*, (2): 73–74. [XU ZD, WU Q, 1999. Progress in tubulin. *Journal of Anhui Institute of Education*, (2): 73–74.]
- 闫硕, 刘小侠, 韩娜娜, 倪慧, 孙洁茹, 张青文, 2012. 棉铃虫 β -微管蛋白基因 cDNA 序列的克隆与序列分析. *应用昆虫学报*, 49(1): 130–137. [YAN S, LIU XX, HAN NN, NI H, SUN JR, ZHANG QW, 2012. Molecular cloning and sequence analysis of β -tubulin in *Helicoverpa armigera*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(1): 130–137.]
- 张海燕, 万淼, 费晨, 钱永华, 鲁兴萌, 2007. 家蚕微孢子虫 (浙江株) α -微管蛋白基因部分片段的克隆及系统发育分析. *蚕业科学*, 33(1): 49–56. [ZHANG HY, WAN M, FEI C, QIAN YH, LU XM, 2007. Clone and Phylogenetic Analysis of Partial α -Tubulin Gene of *Nosema bombycis* (Zhejiang Strain). *Science of Sericulture*, 33(1): 49–56.]
- 张平, 刘吉平, 2007. 微孢子虫 (microsporidia) 功能蛋白的研究进展. *蚕业科学*, 33(2): 329–334. [ZHANG P, LIU JP, 2007. Reviews of Studying on Microsporidian Functional Protein. *Science of Sericulture*, 33(2): 329–334.]
- 朱勃, 沈中元, 曹喜涛, 徐莉, 唐顺明, 2006. 家蚕微孢子虫 (镇江株) β -微管蛋白基因部分片段的克隆及系统发育分析. *蚕业科学*, 32(4): 505–509. [ZHU B, SHEN ZY, CAO XT, XU L, TANG SM, 2006. Cloning and Phylogenetic Analysis of Beta-tubulin DNA Fragment of *Nosema bombycis* (ZJ Strain). *Science of Sericulture*, 32(4): 505–509.]