东方蜜蜂微孢子虫 *γ-tubulin* 基因的表达验证与分子特性分析*

叶亚萍[1**] 高旭泽[1**] 樊 念[1] 张佳欣[1] 赵浩东[1] 钱加珺[1]
张文德[1] 赵红霞[3] 徐细建[4] 陈大福[1, 2***] 郭 睿[1, 2***]

（1. 福建农林大学动物科学学院（蜂学学院），福州 350002；2. 福建省蜂疗研究所，福州 350002；
3. 广东省科学院动物研究所，广州 510260；4. 江西省养蜂研究所，南昌 330000）

摘 要 【目的】 本研究对东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 的 γ-微管蛋白（γ-tubulin）基因 *γ-tubulin* 进行表达验证，明确 *γ-tubulin* 的分子特性，并对东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 γ-tubulin 蛋白进行保守基序和系统进化分析，以期丰富东方蜜蜂微孢子虫的 *γ-tubulin* 信息，并为深入开展 *γ-tubulin* 的功能研究提供基础。【方法】 通过 PCR 验证 *γ-tubulin* 的表达。通过 Expasy 网站上的相关软件预测和分析 γ-tubulin 的理化性质、信号肽、磷酸化位点、二级结构和三级结构。使用 MEME 软件预测东方蜜蜂微孢子虫和其他物种 γ-tubulin 的保守基序。通过 Mega 11.0 软件对东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 γ-tubulin 进行氨基酸序列多重比对，并采用邻接法构建基于 γ-tubulin 的系统进化树。【结果】 *γ-tubulin* 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实表达。γ-tubulin 编码 433 个氨基酸，分子量约为 49.11 kD，分子式为 $C_{2186}H_{3422}N_{582}O_{663}S_{20}$，脂溶系数为 86.65，等电点为 5.75；γ-tubulin 包含 29 个丝氨酸酸化位点，5 个酪氨酸酸化位点及 14 个苏氨酸磷酸化位点，包含 191 个 α-螺旋，66 条延长链，17 个 β-转角及 159 个无规则卷曲。另外，γ-tubulin 同时定位于细胞核、细胞质和线粒体。东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 等 9 个物种的 γ-tubulin 均含有 5 个相同的保守基序。系统进化分析结果显示，东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫、家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*、兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*、海伦脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon hellem*、角膜条孢虫 *Vittaforma corneae* 的 γ-tubulin 蛋白聚为一个大支，而小孢根霉 *Rhizopus microsporus* 与奇孢根霉 *Rhizopus azygosporus* 的 γ-tubulin 聚为另一个大支；东方蜜蜂微孢子虫及其姐妹种蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 进化距离最近。【结论】 证实了东方蜜蜂微孢子虫孢子中 *γ-tubulin* 的真实表达，明确了 *γ-tubulin* 的分子特性，并揭示东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 蛋白亲缘关系最近，γ-tubulin 蛋白在东方蜜蜂微孢子虫、蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫及角膜条孢虫中具有较高的保守性。

关键词 微孢子虫，东方蜜蜂微孢子虫，γ-微管蛋白，蜜蜂，分子特性，系统进化

Expression, validation and molecular characteristics of the *Nosema ceranae γ-tubulin* gene

YE Ya-Ping[1**] GAO Xu-Ze[1**] FAN Nian[1] ZHANG Jia-Xin[1]
ZHAO Hao-Dong[1] QIAN Jia-Jun[1] ZHANG Wen-De[1] ZHAO Hong-Xia[3]
XU Xi-Jian[4] CHEN Da-Fu[1, 2 ***] GUO Rui[1, 2 ***]

(1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Apitherapy Research Institute of Fujian Province,, Fuzhou 350002, China; 3. Institute of Zoology, Guangdong Academy of

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金面上项目（32172792）；国家现代农业产业技术体系专项资金项目（CARS-44-KXJ7）；福建省自然科学基金面上项目（2022J01131334）；福建农林大学硕士生导师团队项目（郭睿）；福建农林大学科技创新专项（郭睿）；福建农林大学动物科学学院（蜂学学院）科研扶持项目（郭睿）；福建省大学生创新创业训练计划（202310389028，X202310389073）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：15259907927@163.com；gxz13845381765@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：ruiguo@fafu.edu.cn；dfchen826@fafu.edu.cn

收稿日期 Received：2022-04-29；接受日期 Accepted：2023-04-09

Sciences, Guangzhou 510260, China; 4. Apicultural Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330000, China)

Abstract **[Objectives]** To validate the expression of the *Nosema ceranae γ-tubulin* gene, clarify its molecular characteristics, and conduct a conserved motif and phylogenetic investigation of γ-tubulin proteins in *N. ceranae* and other species. **[Methods]** The expression of *γ-tubulin* was verified by PCR. Its physical and chemical properties, signal peptide, phosphorylation site and secondary and tertiary structures, were predicted and analyzed using related software on the Expasy website. MEME software was used to predict conserved motifs in the γ-tubulin of *N. ceranae* and other species. Mega 11.0 software was used to perform multiple alignment of amino acid sequences of γ-tubulin from *N. ceranae* and other species, followed by construction of a phylogenetic tree based on the neighbor-joining method. **[Results]** The expression of *γ-tubulin* was confirmed in *N. ceranae* spores. The molecular formula of the gene is $C_{2186}H_{3422}N_{582}O_{663}S_{20}$. It contains 433 amino acids and has a molecular weight of about 49.11 kD. Its lipid solubility coefficient is 86.65, and its hydrophilic coefficient is 5.75. The *N. ceranae* γ-tubulin gene contains 29 serine, 5 tyrosine and 14 threonine phosphorylation sites, and also includes a 191 α-helix, 66 extension, 17 β-turn and 159 random coil. The gene is found in the nucleus, cytoplasm and mitochondria. The same five conserved motifs were identified in the γ-tubulin gene of *N. ceranae* and those of another nine species. Phylogenetic analysis indicates that the γ-tubulin gene of *N. ceranae*, *Nosema apis*, *Nosema bombycis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* and *Vittaforma corneae* cluster within a single large clade, whereas that of *Rhizopus microsporus* and *Rhizopus azygosporus* cluster in another large clade. The closest evolutionary distance was that between the γ-tubulin protein of *N. ceranae* and that of its sister species *N. apis*. **[Conclusion]** Our results confirm the expression of *γ-tubulin* in *N. ceranae* spores, clarify the molecular characteristics of this gene, reveal a close genetic relationship between γ-tubulin in *N. ceranae* and that in *N. apis*, and show that γ-tubulin is highly conserved in *N. ceranae*, *N. apis*, *N. bombycis*, *E. cuniculi*, *E. hellem* and *V. corneae*.

Key words microsporidian; *Nosema ceranae*; γ-tubulin; honey bee; molecular characteristics; systematic evolution

东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 是一种寄生成年蜜蜂中肠组织的单细胞真菌病原，对蜂王、工蜂、雄蜂和幼虫均有感染性（梁勤和陈大福, 2009）。东方蜜蜂微孢子虫侵染可对蜜蜂宿主造成细胞结构破坏、免疫抑制和寿命缩短等负面影响（Macías-Macías *et al.*, 2020；Özgör, 2021）。虽然东方蜜蜂微孢子虫的参考基因组早在 2009 年就已公布，但受限于缺乏成熟的转基因技术平台，绝大多数基因的功能研究仍不清楚（Cornman *et al.*，2009）。

γ-微管蛋白(γ-tubulin)是真核生物微管蛋白家族成员之一，在细胞质中大量表达（Lindström and Alvarado-Kristensson，2018）。γ-tubulin 作为细胞周期和应激信号转导的靶点，在微管成核和细胞周期相关过程中起到重要作用（Binarová and Tuszynski，2019）。王琳琳等（2009）采用免疫荧光染色技术检测 γ-tubulin 在胶质瘤中的表达量，发现随着肿瘤恶化程度增加 γ-tubulin 的表达量增高，说明 γ-tubulin 与胶质瘤发展过程密切相关。研究表明 *γ-tubulin* 基因在真菌中也发挥重要功能，例如 Vogel 和 Snyder（2000）研究发现敲减 *γ-tubulin* 导致出芽酵母细胞质中的微管缺陷甚至丢失，突变 *γ-tubulin* 使出芽酵母细胞活力降低，而过表达 *γ-tubulin* 对出芽酵母无负面影响。然而，东方蜜蜂微孢子虫 *γ-tubulin* 的研究迄今仍然缺失。因此，探究东方蜜蜂微孢子虫 *γ-tubulin* 的分子特性并进行系统进化分析，可为相关功能研究提供参考信息和理论依据。

本研究发现 nce-miR-12220 及其靶基因 *γ-tubulin* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*（以下简称“意蜂”）工蜂的过程中均呈现总体下降的表达趋势，nce-miR-12220 通过正调控 *γ-tubulin* 基因表达潜在参与调节东方蜜蜂微孢子虫侵染（吴鹰等，2022）。目前，东方蜜蜂微孢子虫的 *γ-tubulin* 相关研究缺失，功能未明。因此，本研究拟对东方蜜蜂微孢子虫的 *γ-tubulin* 进行表达验证，全面分析 *γ-tubulin* 的分子特性，进而对东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 γ-tubulin 进行系统进化分析，以期为持续深入开展 *γ-tubulin* 的功能研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试生物材料

东方蜜蜂微孢子虫的纯净孢子由福建农林大学动物科学学院（蜂学学院）蜜蜂保护课题组实验室制备（张文德等，2022）。

1.2 *γ-tubulin* 的 PCR 扩增及电泳

本研究团队前期已通过链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 技术对东方蜜蜂微孢子虫的纯净孢子样品进行测序，获得了高质量的转录组数据（Guo *et al.*，2018）。基于上述转录组数据，根据 γ-微管蛋白（γ-tubulin）基因 *γ-tubulin* 序列设计合成特异性扩增引物（F：5′-ATGCGAGAAATAATTACTCT-3′；R：5′-TTACATCTCTGGCTCTTGGT-3′）。利用 Trizol 法提取东方蜜蜂微孢子虫孢子样品的总 RNA 作为模板，利用 Oligo dt 引物及随机引物进行反转录得到 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。反应体系（25 μL）为 PCR mix 22 μL，cDNA 模板 1 μL，上下游引物各 1 μL。反应程序为 98 ℃ 2 min；98 ℃ 20 s，50 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，34 个循环；72 ℃ 5 min。PCR 产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪（上海培清，中国）进行观察和拍照。

1.3 γ-tubulin 的生物信息学分析

根据前期预测出的东方蜜蜂微孢子虫 *γ-tubulin* 序列，利用 NCBI 网站上（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）的 ORF 工具对 γ-tubulin 的氨基酸序列进行预测。通过 Expasy 网站（https://www.espasy.org/resources）上的 Protparam、ProtScale 和 SWISS-model 等软件分析 γ-tubulin 的理化性质、亲水性和三级结构；利用 SignalP 4.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/）、NetPhos 3.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）和 TMHMM (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0) 及 SOPMA（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html）等软件（Ison *et al.*，2013）预测 γ-tubulin 的信号肽、磷酸化位点、跨膜结构域及二级结构。使用 PSORTⅡ（https://www.genscript.com/psort.html）软件（Sedaghat-Nejad *et al.*，2021）预测 γ-tubulin 蛋白的亚细胞定位。

1.4 γ-tubulin 蛋白的结构域预测

使用 MEME 软件（Bailey and Elkan, 1994）（https://meme-suite.org/）预测东方蜜蜂微孢子虫和其他物种 γ-tubulin 的保守基序，参数设置为：结构域最小氨基酸残基数为 6 aa，结构域最大氨基酸残基数为 50 aa，不同结构域的数量为 5，其余参数为默认设置。

1.5 γ-tubulin 蛋白的系统进化分析

利用 Blast 工具将东方蜜蜂微孢子虫 γ-tubulin 蛋白的氨基酸序列比对到 NCBI GeneBank 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）以搜索序列相似性较高的其他物种的 γ-tubulin。通过 Mega 11.0 软件（Tamura *et al.*，2021）对东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 γ-tubulin 进行氨基酸序列多重比对，并采用邻接法构建基于 γ-tubulin 的系统进化树，选择软件默认参数。

2 结果与分析

2.1 *γ-tubulin* 的表达验证

琼脂糖凝胶电泳结果显示，通过 PCR 扩增出约 1 300 bp 的目的片段，符合预期大小（图 1），说明 *γ-tubulin* 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实表达。

2.2 γ-tubulin 的分子特性分析

γ-tubulin 共含有 1 302 个核苷酸，可编码 433 个氨基酸。γ-tubulin 蛋白分子量约为 49.11 kD，脂溶系数为 86.65，等电点为 5.75，分子式为 $C_{2186}H_{3422}N_{582}O_{663}S_{20}$。γ-tubulin 中含量最高的氨基酸为丝氨酸，含量最低的氨基酸为半胱氨酸；此外，γ-tubulin 包含 52 个负电荷氨基酸，其中天冬氨酸和谷氨酸分别有 25 和 27 个；44 个正

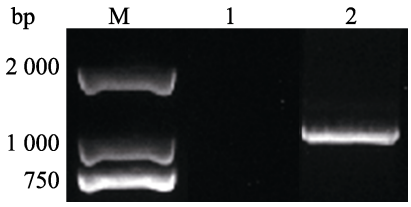


图 1　*γ-tubulin* 的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis for PCR amplification product from *γ-tubulin*

泳道 M：DNA marker；泳道 1：DEPC 水；泳道 2：*γ-tubulin* 的扩增产物。

Lane M: DNA marker; Lane 1: DEPC water; Lane 2: Amplified product from *γ-tubulin*.

电荷氨基酸，其中赖氨酸和精氨酸分别有 25 和 19 个。

γ-tubulin 的平均亲水系数为-0.25，亲水氨基酸数量比疏水氨基酸多（图 2：A），说明该蛋白为亲水性蛋白。另外，γ-tubulin 中不存在典型的信号肽，说明其为胞内蛋白（图 2：B）。在 γ-tubulin 中预测到 48 个磷酸化位点，包含 29 个丝氨酸磷酸化位点、5 个酪氨酸磷酸化位点及 14 个苏氨酸磷酸化位点（图 2：C）。

γ-tubulin 含有 191 个（44.11%）α-螺旋，66 个（15.24%）延长链，17 个（3.93%）β-转角，159 个（36.72%）无规则卷曲（图 3：A）。图 3（B）所示为 γ-tubulin 的三级结构，其模板为 7qj0.1.K，与之同源性为 48.96%，其中 58.01% 的残基自信度达到 70%以上。另外，预测 γ-tubulin 同时定位于细胞核、细胞质和线粒体，占比分别为 56.50%、17.40%和 13.00%。

2.3　γ-tubulin 的保守基序分析

在东方蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 中预测到 5 个保守基序：Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4 和 Motif 5；类似地，在蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis*、家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*、兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*、海伦脑炎微

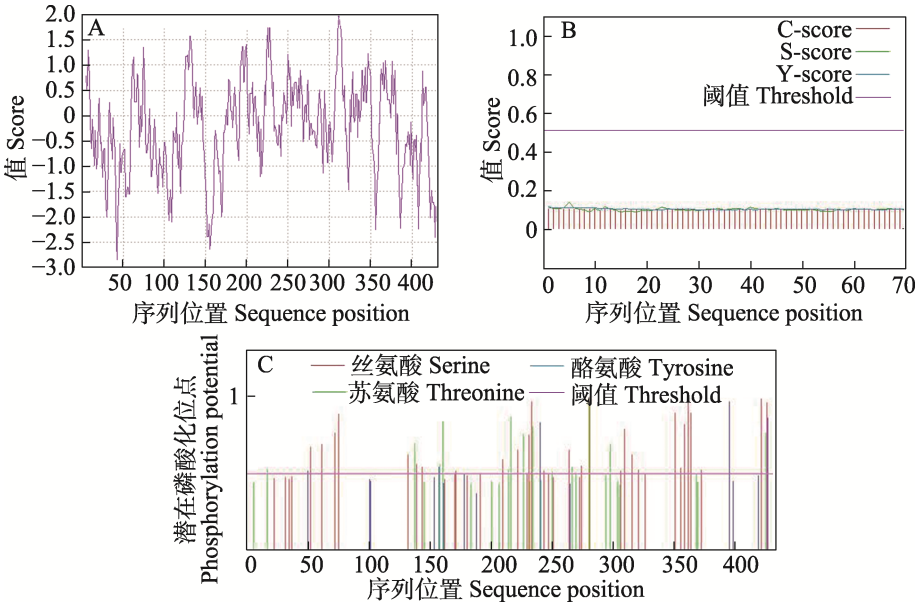


图 2　γ-tubulin 的亲水性（A）、信号肽（B）和磷酸化位点（C）

Fig. 2　Hydrophilic (A), signal peptide (B) and phosphorylation site (C) of γ-tubulin

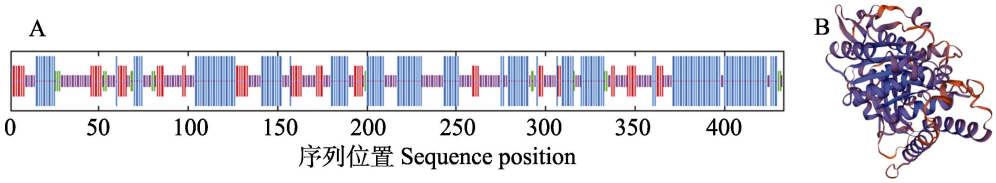


图 3　γ-tubulin 的二级结构（A）和三级结构（B）

Fig. 3　Secondary structure (A) and tertiary structure (B) of γ-tubulin

孢子虫 *Encephalitozoon hellem*、角膜条孢虫 *Vittaforma corneae*、小孢根霉 *Rhizopus microsporus* 和奇孢根霉 *Rhizopus azygosporus* 的 γ-tubulin 蛋白中同样预测到上述 5 个保守基序（图 4），说明 γ-tubulin 在东方蜜蜂微孢子虫和其他 7 个物种中高度保守。

2.4 γ-tubulin 的系统进化分析

除家蚕微孢子虫中含有 2 个 γ-tubulin 外，东方蜜蜂微孢子虫、蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫、角膜条孢虫、小孢根霉和奇孢根霉均仅含有 1 个 γ-tubulin（表 1）。氨基酸多重比对结果显示，东方蜜蜂微孢子虫与其他 7 种微孢子虫及 2 种根霉菌的 γ-tubulin 的序列一致性较高（图 5）。系统进化分析结果显示，东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫、家蚕微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫及角膜条孢虫的 γ-tubulin 聚为一个大支，而小孢根霉与奇孢根霉的 γ-tubulin 聚为另一个大支（图 6）；东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 进化距离最近，其次为家蚕微孢子虫（图 6）。以上结果说明东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 亲缘关系最近，γ-tubulin 在不同微孢子虫中具有较高的保守性。

3 讨论

γ-tubulin 广泛存在于中心体和纺锤体等微

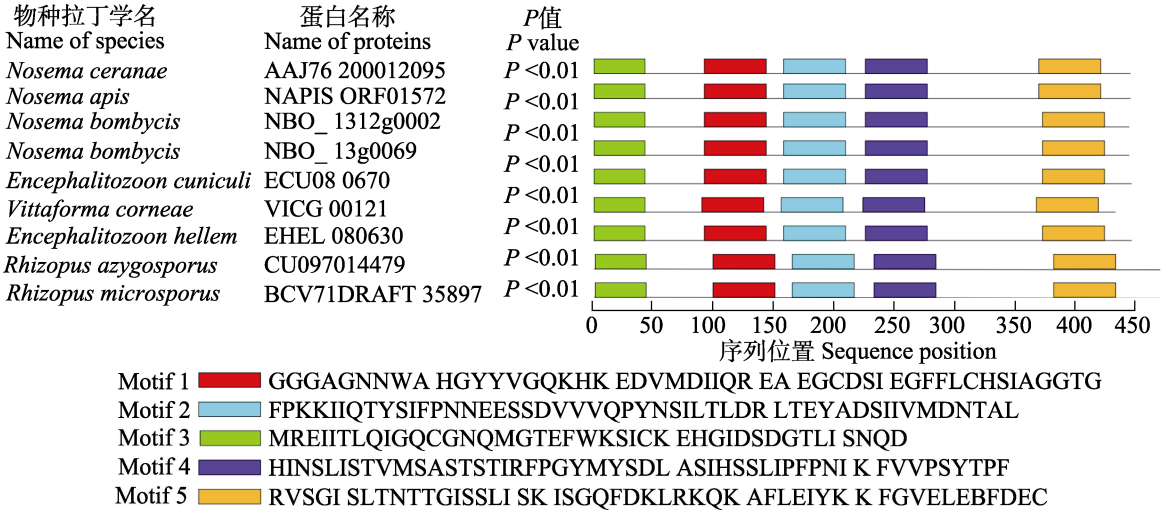


图 4 东方蜜蜂微孢子虫和其他 7 个物种的 γ-tubulin 蛋白含有的保守基序

Fig. 4 Conserved motifs in γ-tubulin proteins in *Nosema ceranae* and other seven species

图中拉丁学名的中文名称同表 1。The Chinese name in the figure is the same as table 1.

表 1 东方蜜蜂微孢子虫与其他 7 个物种的 γ-tubulin 概览

Table 1 Overview of γ-tubulin proteins from *Nosema ceranae* and other seven species

物种 Species	数量 Number	NCBI GeneBank 数据库收录号 Accession number in NCBI GeneBank database
东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*	1	AAJ76_200012095
蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis*	1	NAPIS_ORF01572
家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*	2	NBO_1312g0002, NBO_13g0069
兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*	1	ECU08_0670
海伦脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon hellem*	1	EHEL_080630
角膜条孢虫 *Vittaforma corneae*	1	VICG_00121
小孢根霉 *Rhizopus microsporus*	1	BCV71DRAFT_35897
奇孢根霉 *Rhizopus azygosporus*	1	CU097_014479

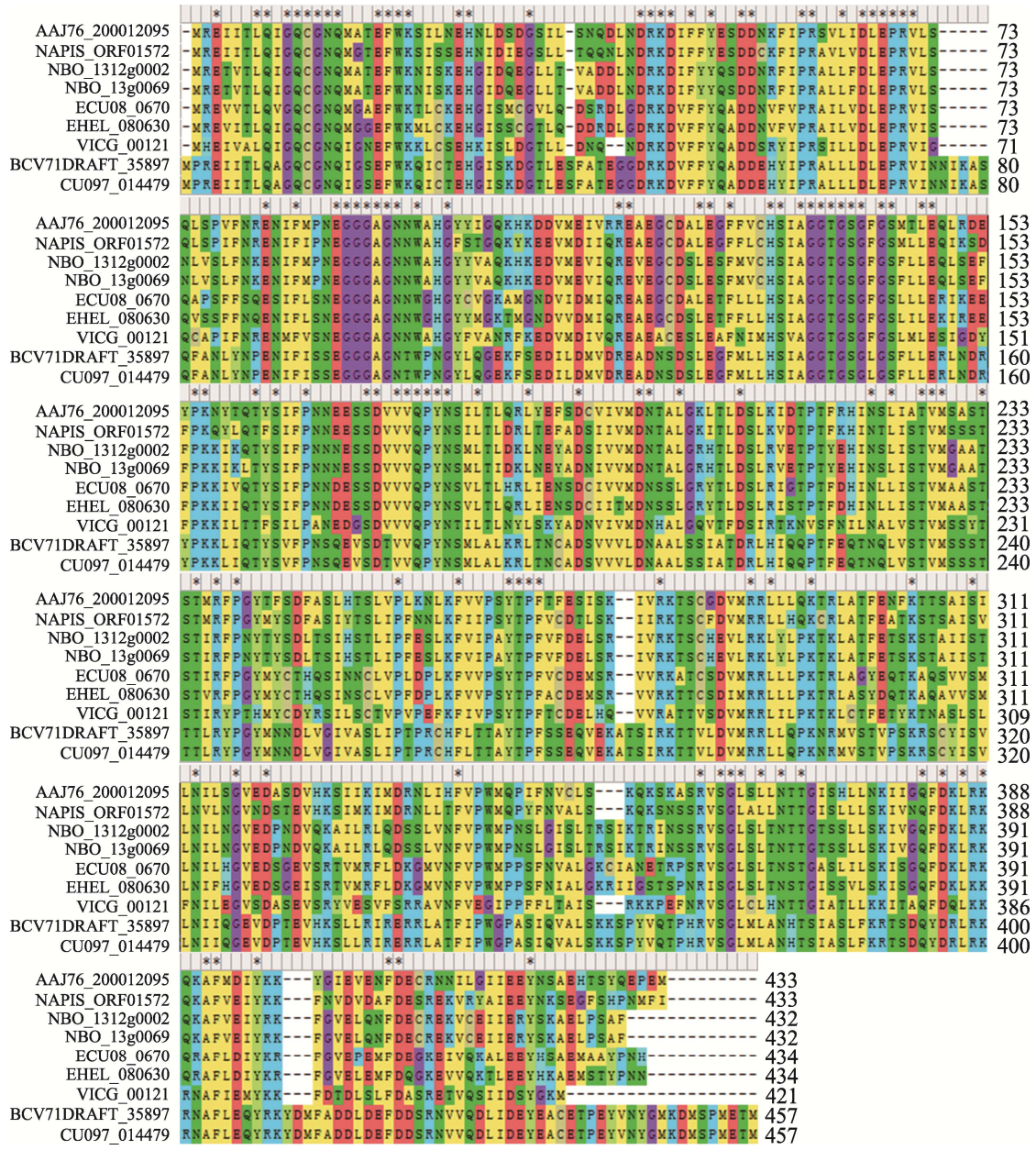


图 5　东方蜜蜂微孢子虫与其他 7 个物种 γ-tubulin 蛋白的氨基酸序列多重比对

Fig. 5　Multiple alignment of amino acid sequences of γ-tubulin proteins from *Nosema ceranae* and other seven species

*表示同源性为 100%，- 表示氨基酸缺失。

* indicates the homology is 100%, - indicates amino acid deficiency.

管组织中心（Stearns *et al.*，1991；Zheng *et al.*，1991），参与控制有丝分裂纺锤体的复制（Bornens，2002）。Farache 等（2018）在研究中发现 γ-TuSC 和 γ-TuRC 的缺失可引起纺锤体形成的严重缺陷，细胞周期阻滞及细胞死亡。真菌孢子是一种休眠体，仅维持较低的代谢水平。本研究通过 PCR 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中扩增出约 1 000 bp 的目的片段（图 1），证实 *γ-tubulin* 的真实表达。这暗示 *γ-tubulin* 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中发挥功能，值得进一步研究。生物信息学分析结果显示，东方蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 的分子式为 $C_{2186}H_{3422}N_{582}O_{663}S_{20}$，分子量约为 49.11 kD，亲水氨基酸数量比疏水氨基酸多（图 2：A），说明该蛋白为亲水性蛋白；另外，γ-tubulin 不含信

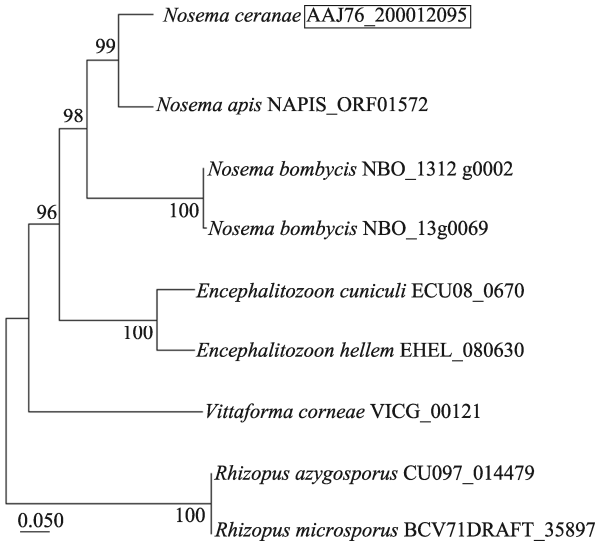


图 6 邻接法构建基于 γ-tubulin 的东方蜜蜂微孢子虫与其他 7 个物种的系统进化树

Fig. 6 Phelogenetic tree of *Nosema ceranae* and other seven species based on γ-tubulin by neighbor-joining method

号肽(图 2:B),说明该蛋白为胞内蛋白;γ-tubulin 同时定位于细胞核、细胞质和线粒体,其广泛的分布进一步体现出 γ-tubulin 功能的广泛性和重要性。关于昆虫的微管蛋白家族,此前 *α-tubulin* 和 *β-tubulin* 研究较多,已有研究证明 *α-tubulin* 在果蝇 *Drosophila* 的雄性生殖细胞系干细胞维持中起着至关重要的作用(Tao *et al.*, 2021),*β-tubulin* 已被证实与昆虫致病真菌绿僵菌 *Metarhizium acridum* 的附着分化、毒力和产孢相关(Zhang *et al.*, 2017)。前期研究测定了侵染意大利蜜蜂工蜂的东方蜜蜂微孢子虫 *γ-tubulin* 表达谱,发现 *γ-tubulin* 在病原接种后 2-12 d 的表达量总体表现为显著下调趋势(吴鹰等, 2022),暗示 *γ-tubulin* 与东方蜜蜂微孢子虫的增殖和侵染存在相关性。下一步拟通过饲喂 dsRNA(Goto *et al.*, 2003)或 siRNA(Huang and Evans, 2020)的方法对意大利蜜蜂工蜂体内的东方蜜蜂微孢子虫 *γ-tubulin* 进行 RNAi,以明确其在侵染过程中的功能。

东方蜜蜂微孢子虫及其姐妹种蜜蜂微孢子虫是自然界中感染蜜蜂的 2 种微孢子虫。本研究发现,东方蜜蜂微孢子虫和蜜蜂微孢子虫均含有 1 个 *γ-tubulin*;兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫和角膜条孢虫也只含有 1 个 *γ-tubulin*。这说明东方蜜蜂微孢子虫在进化过程中发生了 *γ-tubulin* 的复制。鉴于东方蜜蜂微孢子虫具有更强的毒力,正在逐渐取代自然界中的蜜蜂微孢子虫(Mayack and Naug, 2009),推测 *γ-tubulin* 在东方蜜蜂微孢子虫的生存和增殖中起到重要作用。家蚕微孢子虫含有 2 个 *γ-tubulin*(表 1)。本研究在东方蜜蜂微孢子虫 γ-tubulin 中预测到 5 个保守基序(Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4 和 Motif 5);在蜜蜂微孢子虫、家蚕微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫、角膜条孢虫、小孢根霉和奇孢根霉的 γ-tubulin 中同样预测到上述 5 个保守基序(图 4);此外,上述 8 个物种的 γ-tubulin 氨基酸序列一致性较高(图 5)。上述结果表明 γ-tubulin 在东方蜜蜂微孢子虫和其他 9 个物种中高度保守。系统进化分析结果显示,东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫等 5 种微孢子虫的 γ-tubulin 聚为一个大支,东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 进化距离最近(图 6),进一步表明 γ-tubulin 在不同微孢子虫中具有高度保守性,推测不同微孢子虫的 γ-tubulin 发挥相同或类似的功能。

4 结论

本研究证实了 *γ-tubulin* 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实存在,明确了 *γ-tubulin* 的分子特性,并揭示东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 γ-tubulin 亲缘关系最近,γ-tubulin 在东方蜜蜂微孢子虫、蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫及角膜条孢虫中具有较高的保守性。

参考文献 (References)

Bailey TL, Elkan C, 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. San Diego, California, USA. 28–36.

Binarová P, Tuszynski J, 2019. Tubulin: structure, functions and roles in disease. *Cells,* 8(10): 1294.

Bornens M, 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(1): 25–34.

Cornman RS, Chen YP, Schatz MC, Street C, Zhao Y, Desany B, Egholm M, Hutchison S, Pettis JS, Lipkin WI, Evans JD, 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*, 5(6): e1000466.

Farache D, Emorine L, Haren L, Merdes A, 2018. Assembly and regulation of γ-tubulin complexes. *Open Biology*, 8(3): 170266.

Goto A, Blandin S, Royet J, Reichhart JM, Levashina EA, 2003. Silencing of Toll pathway components by direct injection of double-stranded RNA into *Drosophila* adult flies. *Nucleic Acids Research*, 31(22): 6619–6623.

Guo R, Chen DF, Xiong CL, Hou CS, Zheng YZ, Fu ZM, Liang Q, Diao QY, Zhang L, Wang HQ, Hou ZX, Kumar D, 2018. First identification of long non-coding RNAs in fungal parasite *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 49: 660–670.

Huang Q, Evans JD, 2020. Targeting the honey bee gut parasite *Nosema ceranae* with siRNA positively affects gut bacteria. *BMC Microbiology,* 20(1): 258.

Ison J, Kalas M, Jonassen I, Bolser D, Uludag M, McWilliam H, Malone J, Lopez R, Pettifer S, Rice P, 2013. EDAM: An ontology of bioinformatics operations, types of data and identifiers, topics and formats. *Bioinformatics*, 29(10): 1325–1332.

Liang Q, Chen DF, 2009. Bee Conservation. Beijing: China Agriculture Press. 108–110. [梁勤, 陈大福, 2009. 蜜蜂保护学. 北京: 中国农业出版社. 108–110.]

Lindström L, Alvarado-Kristensson M, 2018. Characterization of gamma-tubulin filaments in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research,* 1865(1): 158–171.

Macías-Macías JO, Tapia-Rivera JC, De la Mora A, Tapia-González JM, Contreras-Escareño F, Petukhova T, Morfin N, Guzman-Novoa E, 2020. *Nosema ceranae* causes cellular immunosuppression and interacts with thiamethoxam to increase mortality in the stingless bee *Melipona colimana*. *Scientific Reports*, 10(1): 17021.

Mayack C, Naug D, 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3): 185–188.

Özgör E, 2021. The effects of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* infection on survival and phenoloxidase gene expression in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Galleriidae) compared to *Apis mellifera*. *Insects*, 12(10): 953.

Sedaghat-Nejad E, Fakharian MA, Pi J, Hage P, Kojima Y, Soetedjo R, Ohmae S, Medina JF, Shadmehr R, 2021. P-sort: An open-source software for cerebellar neurophysiology. *Journal of Neurophysiology*, 126(4): 1055–1075.

Stearns T, Evans L, Kirschner M, 1991. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell,* 65(5): 825–836.

Tamura K, Stecher G, Kumar S, 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution,* 38(7): 3022–3027.

Tao X, Dou Y, Huang G, Sun M, Lu S, Chen D, 2021. *α-Tubulin* regulates the fate of germline stem cells in *Drosophila* testis. *Scientific Reports*, 11(1): 10644.

Vogel J, Snyder M, 2000. Gamma-tubulin of budding yeast. *Current Topics in Developmental Biology*, 49: 75–104.

Wang LL, Sun ML, Sun YP, Zhang N, Liu CY, 2009. Expressions of α-tubulin and γ-tubulin in human glioma and their relation with Survivin. *Journal of Shandong University* (*Health Science*), 47(6): 103–105, 113. [王琳琳, 孙美丽, 孙玉萍, 张楠, 刘传勇, 2009. 中心体 α-微管蛋白、γ-微管蛋白在脑胶质瘤中的表达及其与 Survivin 表达的相关性研究. 山东大学学报(医学版), 47(6): 103–105, 113.]

Wu Y, Ye YP, Zhang JX, Qian JJ, Zhang WD, Yu KJ, Ji T, Lin ZG, Zhao HX, Chen DF, Guo R, 2022. Expression profiles of nce-miR-12220 during the *Nosema ceranae* infection process of *Apis mellifera ligustica* workers. *Mycosystema*, 41(10): 1546–1557. [吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 钱加珺, 张文德, 余岢骏, 吉挺, 蔺哲广, 赵红霞, 陈大福, 郭睿, 2022. 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中 nce-miR-12220 及其靶基因的表达谱. 菌物学报, 41(10): 1546–1557.]

Zhang J, Jin K, Xia Y, 2017. Contributions of β-tubulin to cellular morphology, sporulation and virulence in the insect-fungal pathogen, *Metarhizium acridum*. *Fungal Genetics and Biology*, 103: 16–24.

Zhang WD, Zhao HD, Sun MH, Yu KJ, Guo YL, Zhu LR, Hu Y, Zhao X, Ye YP, Chen DF, Guo R, 2022. Identification and analysis of miRNAs in *Nosema ceranae* spores. *Acta Entomologica Sinica*, 65(6): 708–717. [张文德, 赵浩东, 孙明会, 余岢骏, 郭意龙, 朱乐冉, 胡颖, 赵萧, 叶亚萍, 陈大福, 郭睿, 2022. 东方蜜蜂微孢子虫孢子中 microRNA 的鉴定与分析. 昆虫学报, 65(6): 708–717.]

Zheng Y, Jung MK, Oakley BR, 1991. Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell*, 65(5): 817–823.