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】** 柞蚕微粒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-Ren[2] WEN Zhu[2] YU Feng[1, 2]
SHI Sheng-Lin[2] 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（Microtububle）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* Ding 是引起柞蚕 *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville 微粒子病的病原物，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 DH5α (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℃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℃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 ACAAA-3′)，γ-tub-R: (5′-CACAT ACTTT CTCAC GACAT TCATC-3′)。

50 μL 反应体系：33 μL ddH_2O、10 μL 5×PrimeSTAR® Buffer (Mg^{2+} plus)、正向引物和反向引物各 1 μL (10 μM)， 4 μL dNTP， 0.5 μL PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (2.5 U/μL)、0.5 μL 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 μL 胶回收产物与 pMD®18-T Vector 连接，转化大肠杆菌 DH5α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）。

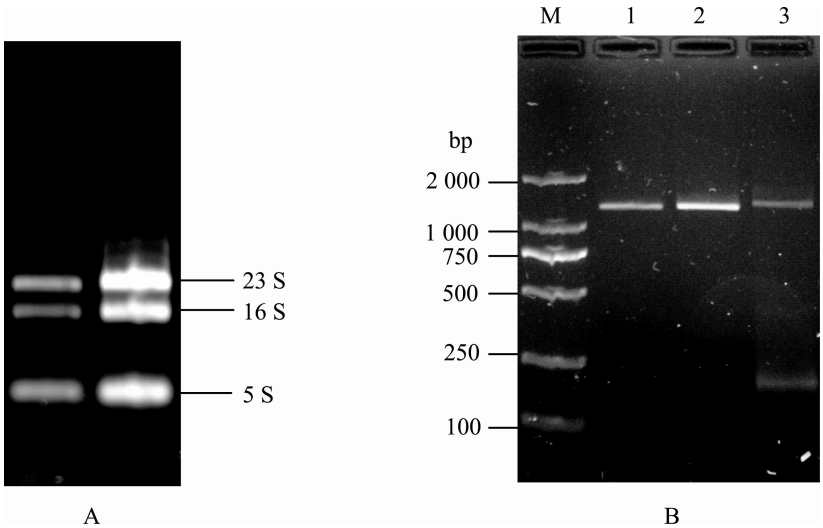

图 1 柞蚕微孢子虫 RNA 的提取（A）及*α*、*β*和*γ*-微管蛋白基因的 PCR 扩增片段（B）
Fig. 1 RNA extraction of *Nosema pernyi* (A), *α*, *β* and *γ-tubulin* PCR products (B)

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*.

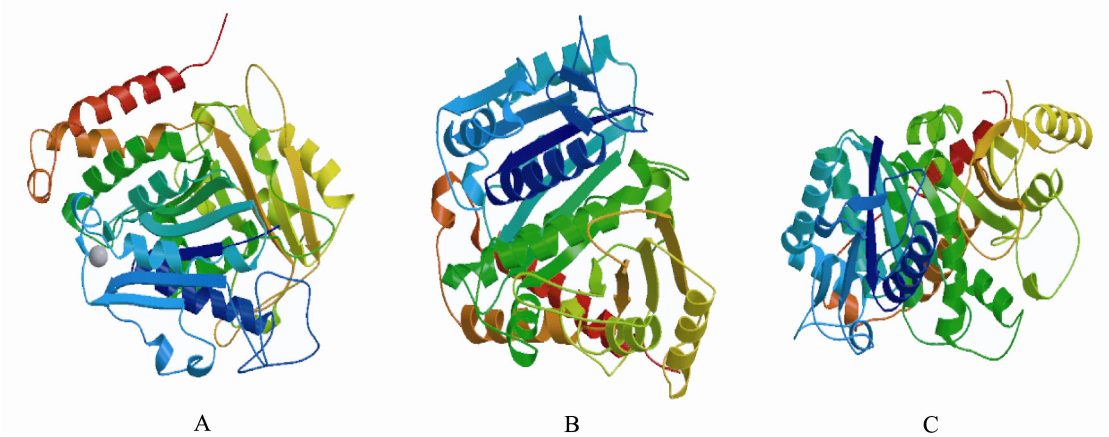

图 2 柞蚕微孢子虫α、β和γ-微管蛋白三维结构带状图
Fig. 2 The ribbon models of *Nosema pernyi* α, β and γ-tubulin

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*、鲛鳚微孢子虫 *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*、

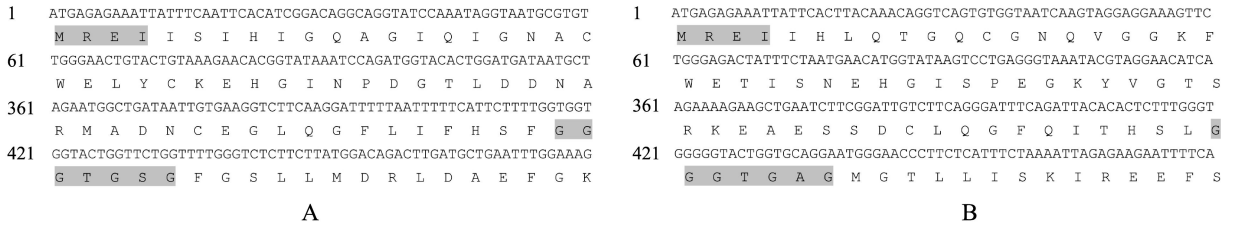

图 3　柞蚕微孢子虫α、β-微管蛋白 MREI、GTP 核苷酸结合位点保守区

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 backgroud.

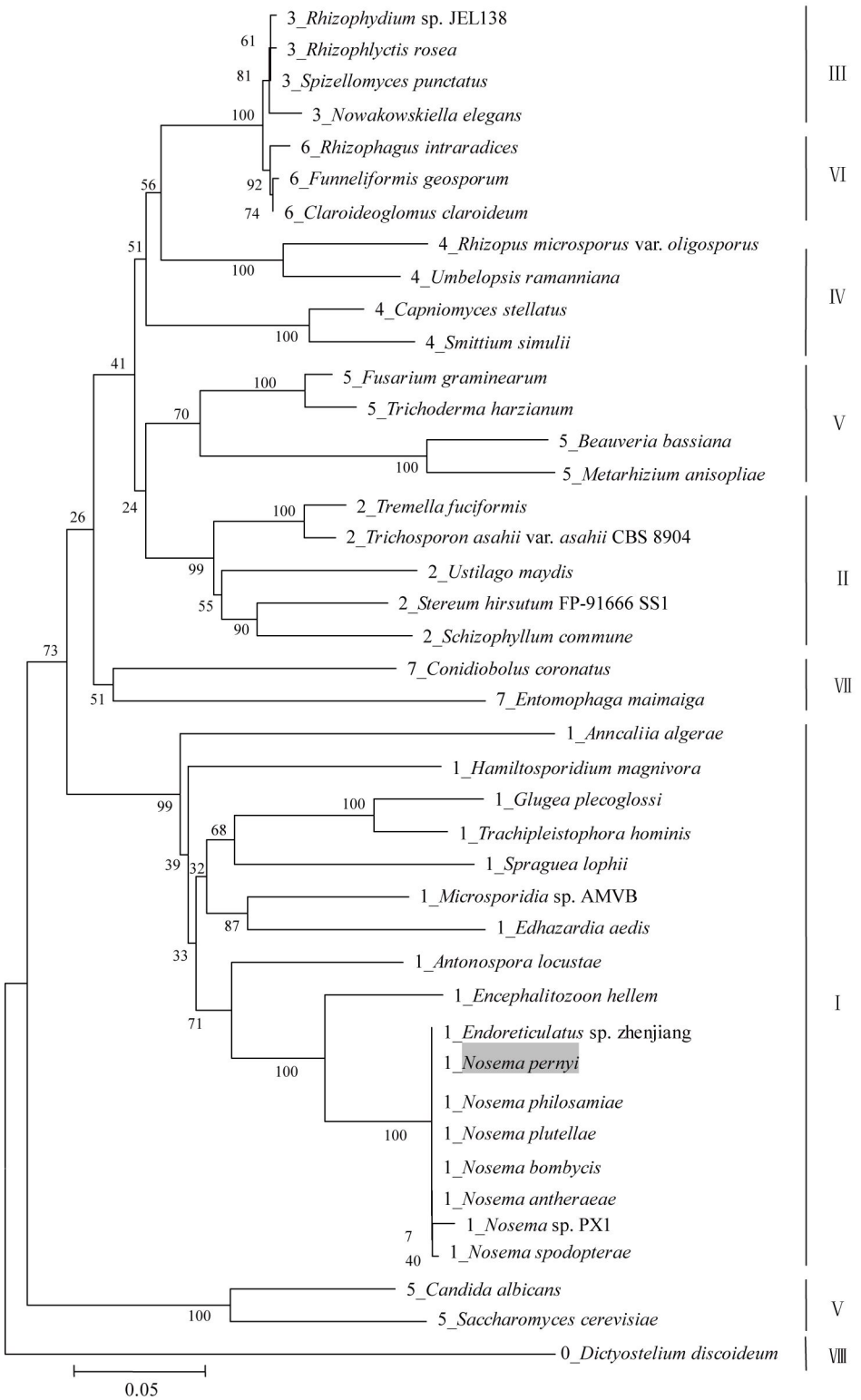

图 4　基于α、β-微管蛋白序列构建的系统发育树

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.

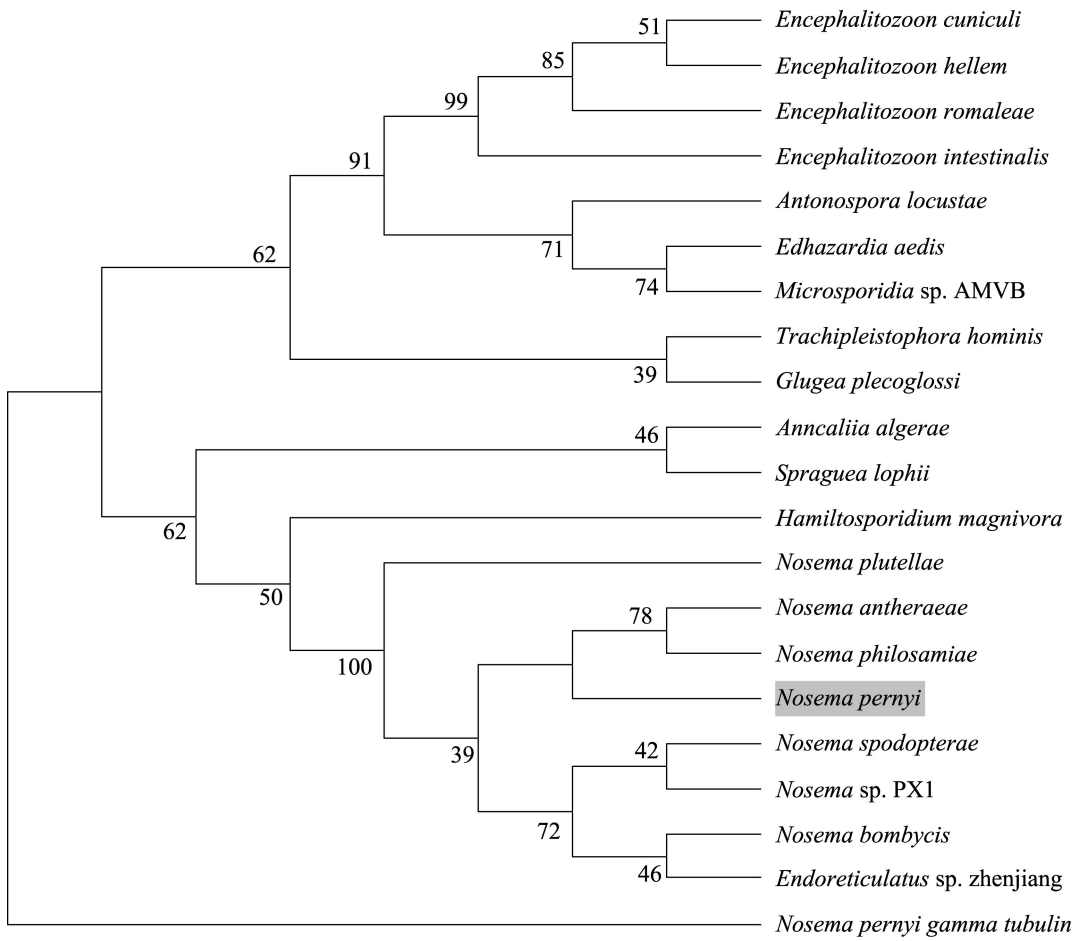

图 5　基于*α*、*β*-微管蛋白核苷酸序列构建的部分微孢子虫系统发育树

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。大型溼微孢子虫 *H. magnivora* 鲅鳙微孢子虫 *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 *Antonospora 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, Schoch 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 dimmer 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, Muthulakshmi 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 *Antonospora 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. 中国柞蚕微粒子病病原的研究. 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.]