

国家重点基础研究发展计划（973）项目资助

国家高技术研究发展计划（863）项目资助

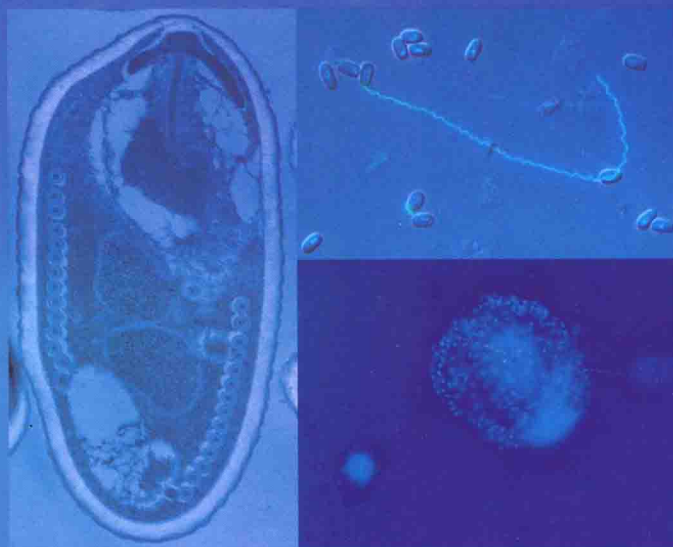
重庆市自然科学基金重大项目资助

家蚕微孢子虫 基因组生物学

GENOME BIOLOGY OF NOSEMA BOMBYCIS

主 编 周泽扬

副主编 潘国庆 李 田 许金山



科学出版社

国家重点基础研究发展计划(973)项目资助
国家高技术研究发展计划(863)项目资助
重庆市自然科学基金重大项目资助

Genome Biology of Nosema bombycis

家蚕微孢子虫 基因组生物学

主编 周泽扬
副主编 潘国庆 李 田 许金山



科学出版社

北 京

内 容 简 介

迄今,微孢子虫已逾1400种被分离发现,其中家蚕微孢子虫最早被分离发现。家蚕微孢子虫引起的家蚕微粒子病是对养蚕业最具威胁性的毁灭性病害之一,由于该病原能够经卵垂直传播,因此被列为蚕业生产的法定检疫对象。本书以作者团队近20年所完成的研究成果为基础,系统阐述了家蚕微孢子虫基因组结构与基因组进化;家蚕微孢子虫转座子及水平基因转移;家蚕微孢子虫代谢与增殖;家蚕微孢子虫分泌型蛋白、极丝蛋白与孢壁蛋白;家蚕微孢子虫纺锤刺体;家蚕微孢子虫基因组数据库等研究进展。

本书既可作为微孢子虫研究的参考书,也可作为蚕学、昆虫学、微生物学的研究生和高年级本科生的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

家蚕微孢子虫基因组生物学 / 周泽扬主编. —北京:科学出版社, 2014.12
ISBN 978-7-03-042451-8

I. ①家… II. ①周… III. ①蚕病—孢子虫—原虫感染—研究
IV. ①S884.2②Q959.115

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第262070号

责任编辑:夏 梁 赵小林 / 责任校对:郑金红

责任印制:肖 兴 / 封面设计:北京铭轩堂广告设计有限公司

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年12月第 一 版 开本:889×1194 1/16

2014年12月第一次印刷 印张:17 1/2

字数:426 000

定价:180.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



周泽扬，教授，博士生导师。首批“新世纪百千万人才工程”国家级人选，国务院特殊津贴专家，农业部有特殊贡献的中青年专家。1982年获西南农业大学学士学位，1987年留学日本并于1990年获日本信州大学硕士学位，1993年获日本大阪大学博士学位。现任重庆师范大学校长，西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室副主任，重庆市微生物学会副理事长。主要从事家蚕病原微生物功能基因组学和家蚕分子生物学研究，组织完成了家蚕病原性微孢子虫基因组的测序分析，主持开展了家蚕微孢子虫功能基因组学研究，以及微孢子虫与家蚕宿主相互作用关系等研究。近年来先后主持863项目、973项目子课题、国家转基因植物专项、国家自然科学基金重点项目等多项重大课题，在*Science*、*Proteomics*、*BMC Genomics* 等国内外学术期刊发表研究论文120余篇。先后获重庆市自然科学一等奖、第四届中国科协西部开发突出贡献奖、重庆市海外留学人员先进个人等奖励。





潘国庆，副教授，硕士生导师。家蚕基因组生物学国家重点实验室研究骨干，中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会委员。1995年获西南农业大学农学学士学位，2009年获西南大学农学博士学位。组织完成了家蚕微孢子虫全基因组测序，同时全程参与了家蚕基因组框架图的绘制工作。目前主要从事家蚕微孢子虫研究，包括病原垂直传播机制及病原的检测新技术等，主持国家自然科学基金项目4项，参加973、863、国家自然科学基金重点项目等多项课题，先后在*BMC Genomics*、*Journal of Invertebrate Pathology*等国内外期刊发表研究论文40余篇（SCI论文20余篇）。

李田，副研究员，博士。家蚕基因组生物学国家重点实验室研究骨干。2003年获西南农业大学学士学位，2009年获西南大学理学博士学位。参与了家蚕基因组框架图的绘制工作，作为主要成员完成了家蚕微孢子虫基因组测序框架图谱的绘制，目前主要从事蚕桑病原生物学、基因组学与生物信息学研究，包括病原侵染及进化机制、基因组与生物信息数据库等。先后主持国家自然科学基金、重庆市自然科学基金等多项课题，参加863、国家自然科学基金重点项目等多项课题，先后在*BMC Genomics*、*Database*等国内外期刊发表研究论文20余篇。

许金山，教授，硕士生导师。2002年获西南农业大学学士学位，2007年获西南大学理学博士学位。现任职于重庆师范大学，2011年赴加拿大英属哥伦比亚大学留学。长期从事蚕类及病原微生物的结构基因组与功能元件研究，先后在*BMC Genomics*、*Eukaryotic Cell*等国内外学术期刊发表研究论文20余篇，其中以第一作者身份发表SCI论文9篇。主持863计划子课题、国家自然科学基金项目，以及包括教育部科学技术重点项目在内的省部级以上项目6项；合作主持国家自然科学基金重点项目1项；主研973计划子课题，以及包括重庆市科委重大科技攻关项目在内的省部级以上项目10余项。



作者简介

家蚕微孢子虫
基因组生物学

(以姓氏笔画为序)

马振刚，1985年生，理学博士，讲师，现工作单位为重庆师范大学生命科学学院，主要从事病原微孢子虫与宿主相互作用的分子机制研究。

王林玲，1969年生，工学博士，教授，现工作单位为重庆师范大学生命科学学院，主要从事家蚕病原微生物的研究。

龙梦娴，1984年生，理学博士，讲师，现工作单位为西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室，主要从事家蚕病原微生物及家蚕肠道微生物研究。

向恒，1982年生，农学博士，高级实验师，现工作单位为西南大学动物科技学院，主要从事基因组及生物信息学研究。

刘含登，1977年生，理学博士，讲师，现工作单位为重庆医科大学实验教学管理中心，主要从事感染性疾病的遗传与分子生物学研究。

李治，1977年生，理学博士，现工作单位为重庆师范大学生命科学学院，主要从事病原微生物与宿主相互作用的分子机制研究。

李春峰，1971年生，农学博士，副教授，现工作单位为西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室，主要从事家蚕免疫的研究。

陈洁，1986年生，理学博士，现为西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室博士后，主要从事病原微生物寄生增殖机制研究。



(以姓氏笔画为序)

吴正理，1978年生，农学博士，教授，现工作单位为西南大学动物科技学院，主要从事水产养殖动物病害与免疫的研究。

林立鹏，1984年生，理学博士，主任科员，现工作单位为福建省漳州市海洋与渔业局，主要从事海洋资源与环境保护工作。

党晓群，1983年生，理学博士，讲师，现工作单位为重庆师范大学生命科学学院，主要从事病原微孢子虫的检测研究。



家蚕微孢子病是养蚕业最为严重的灾害性蚕病。我国是蚕丝业的发源地，早在《农桑辑要》中就有类似家蚕微孢子病症状的记载。其后，日本马场重久（1712）在《养蚕手鉴》中亦记载了类似家蚕微孢子病的病征。1845年，欧洲微孢子病大暴发，由于欧洲种对家蚕微孢子病的抵抗力弱，故成灾面大，损失惨重。1857年，瑞士植物学家Carl Wilhelm von Nägeli从病蚕体内首次分离获得了家蚕微孢子虫，命名为*Nosema bombycis*，后经Louis Pasteur证实为家蚕微孢子病的病原体，并建立了袋制种母蛾镜检法，其后虽然逐步控制了微孢子病的蔓延，但欧洲蚕业从此一蹶不振，持续衰落，以致业不复成。2009年，我曾造访位于法国里昂的国际蚕业协会秘书处，那坐落在郊外孤寂的小楼和道旁零星的桑树，以及小楼内塞满书卷的一排排书架，令人感慨万千。欧洲蚕业也曾有辉煌的历史，据我所知的不完全记载，意大利1847年的年产茧量达60 000t，仅次于中国，居世界第二位，法国1853年的年产茧量达26 000t，长期以来形成了中、日、欧世界三大著名蚕丝产地，而欧洲更是引领了17、18世纪的蚕丝科技。欧洲蚕业的衰落虽然不能完全归咎于家蚕微孢子病的暴发，但也不失为一种警示。

欧洲家蚕微孢子病大流行，可以说是蚕业史上最大的灾难。据日本文献记载，当时法国蚕种的带毒率高达2/3，导致其大量从日本进口蚕种。时逢日本明治维新，急需财政支持政策，日本蚕丝业在蚕种业的带领下开始大量吸收欧洲蚕丝技术，从而步入日本蚕丝发展的新阶段。日本对微孢子病的研究应始于1880年以后，其贡献良多，如改袋制种为框制种，以及对微孢子虫生活史和侵染生物学的研究，然最大之者应为建立了完善的母蛾检查技术体系，自20世纪初叶开始，已沿袭百年，至今难逾。

我国家蚕微孢子病的研究始于20世纪初，1900年前后大批留学生到日本、欧美留学，引进先进科学技术。学习蚕丝科学的先辈把意、法、日等国检查家蚕微孢子病的技术体系引入我国并不断完善，建立了我国的检疫体系，微孢子病基本得到控制。到20世纪70年代，我国蚕丝产量跃居世界首位，随着产业规模的扩大，以及野外昆虫的交叉感染，微孢子病的威胁复显。1988年前后，全国因微孢子病而烧毁的蚕种近10%。此种严峻现实推动了我国微孢子病的研究。从微孢子病的病原生物学到各种检查方法和防治技术，均有不少研究成果，与此同时，强化了防控检疫体系，这些措施虽然有效控制了微孢子病的蔓延，但高额的防治成本和潜在的持续威胁，如影随形，仍是蚕业发展上难以逾越的障碍。

2000年人类基因组计划的完成和2001年法国科学家率先公布的兔脑炎微孢子虫的全基因组序列，启发和推动了我们开展家蚕微孢子虫全基因组的研究。周泽扬教授及其研究小组果敢地挑起了这副重担，于2002年在未获资助的困难情况下启动了这一研究项目，持续10年，历尽艰辛。所幸启动之后，相继获得国家自然科学基金、973计划、863计划，以及重庆市重点项目的支持，完成了家蚕微孢子虫全基因组测序，并在此基础上对微孢子虫功能基因组、蛋白质组 and

代谢、侵染等生物学问题开展了系统研究，获得了一系列创新性成果。该书乃是该研究小组10年研究的总结，著者均是亲力亲为的一线研究人员，所以也是他们10年辛劳的结晶。该书可谓家蚕微孢子虫研究最为系统深入，具有承前启后意义的标志性专著。我十分高兴，谨以此序衷心祝贺编者为蚕业科学作出的重要贡献，并祝愿他们由这些前沿性创新成果引领，不懈努力，把家蚕微孢子病的防控推向一个新的历史阶段。

向仲怀 谨识
2014年10月10日于蚕学宫



第 1 章 绪论 / 001

- 1.1 微孢子虫的分类和多样性
- 1.2 微孢子虫的侵染
- 1.3 微孢子虫病
- 1.4 微孢子虫的基因组
- 1.5 21世纪微孢子虫研究展望

第 2 章 家蚕微孢子虫与家蚕微粒子病 / 025

- 2.1 家蚕微孢子虫与家蚕微粒子病的研究历史与现状
- 2.2 家蚕微孢子虫的结构
- 2.3 家蚕微孢子虫的研究趋势

第 3 章 家蚕微孢子虫基因组框架图 / 053

- 3.1 微孢子虫核型
- 3.2 家蚕微孢子虫全基因组测序
- 3.3 家蚕微孢子虫转录组测序
- 3.4 家蚕微孢子虫基因组注释
- 3.5 家蚕微孢子虫基因组框架图谱

第 4 章 微孢子虫基因家族与基因组进化 / 075

- 4.1 微孢子虫基因家族
- 4.2 微孢子虫直系同源基因
- 4.3 微孢子虫基因组进化特征
- 4.4 微孢子虫基因组进化模式

第 5 章 家蚕微孢子虫转座子 / 093

- 5.1 家蚕微孢子虫转座子的种类
- 5.2 转座子在家蚕微孢子虫基因组进化中的作用
- 5.3 其他微孢子虫基因组转座子的研究现状

第 6 章 家蚕微孢子虫水平转移基因 / 113

- 6.1 家蚕微孢子虫水平转移基因的鉴定
- 6.2 家蚕微孢子虫水平转移基因的来源物种及转移时间
- 6.3 家蚕微孢子虫水平转移基因的功能作用

第 7 章 家蚕微孢子虫代谢与增殖 / 133

- 7.1 家蚕微孢子虫的物质代谢
- 7.2 家蚕微孢子虫分裂增殖

第 8 章 家蚕微孢子虫分泌型蛋白 / 167

- 8.1 微孢子虫分泌型蛋白概况
- 8.2 微孢子虫水通道蛋白
- 8.3 微孢子虫转运体蛋白
- 8.4 家蚕微孢子虫丝氨酸蛋白酶抑制物
- 8.5 家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶
- 8.6 家蚕微孢子虫类蓖麻毒素B链凝集素

第 9 章 家蚕微孢子虫极管与孢壁 / 191

- 9.1 微孢子虫的极管
- 9.2 微孢子虫的孢壁

第 10 章 家蚕微孢子虫纺锤剩体 / 225

- 10.1 纺锤剩体
- 10.2 家蚕微孢子虫纺锤剩体相关基因
- 10.3 家蚕微孢子虫纺锤剩体的铁硫簇组装
- 10.4 家蚕微孢子虫纺锤剩体蛋白质的转运

第 11 章 家蚕微孢子虫基因组数据库 / 255

- 11.1 微孢子虫基因组数据
- 11.2 服务器构建
- 11.3 数据库的使用
- 11.4 数据库维护与发展

第 1 章

绪论

1.1 微孢子虫的分类和多样性 \ 001

1.1.1 微孢子虫的分类 \ 001

1.1.2 微孢子虫的多样性 \ 002

1.2 微孢子虫的侵染 \ 005

1.2.1 微孢子虫侵染的过程 \ 005

1.2.2 微孢子虫孢壁的结构和组成 \ 006

1.3 微孢子虫病 \ 007

1.3.1 无脊椎动物微孢子虫病 \ 007

1.3.2 脊椎动物微孢子虫病 \ 008

1.4 微孢子虫的基因组 \ 009

1.4.1 感染脊椎动物的微孢子虫基因组 \ 009

1.4.2 感染无脊椎动物的微孢子虫基因组 \ 012

1.4.3 微孢子虫的基因组进化 \ 014

1.5 21世纪微孢子虫研究展望 \ 017



第1章 绪论

潘国庆 周泽扬

微孢子虫(microsporidia)是一类专性细胞内寄生的单细胞真核生物。第一个被人类认识的微孢子虫是家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*),也称家蚕微粒子虫,是由瑞士植物学家 Carl Nägeli (1817~1891)于1857年在家蚕中分离并命名(Nägeli, 1857),由此开启了人类对微孢子虫研究的大门。作为真核生物,微孢子虫具有非常独特的生物学特征,其核糖体类型为70S,与原核生物相似(Ishihara and Hayashi, 1968; Cury et al., 1980);并缺少完整功能的线粒体,只存在线粒体退化后的残存细胞器,称为纺锤剩体(mitosome)(Katinka et al., 2001; Williams et al., 2002),该细胞器目前的已知功能是完成铁硫簇(Fe-S clusters)的组装(Goldberg et al., 2008)。微孢子虫侵入宿主的机制在自然界中也十分独特,因其孢子内存在一条盘绕的极管(polar tube)。在宿主消化道内,并在适宜的环境因子刺激下,孢子萌发,极管在瞬间弹出,刺入宿主细胞,孢原质(原生质体)通过极管注入宿主细胞,完成感染过程(Vavra and Larsson, 1999)。微孢子虫的寄主范围非常广泛,可感染从无脊椎动物(特别是昆虫)到脊椎动物的几乎所有动物类群(Mathis, 2000)。

1.1 微孢子虫的分类和多样性

1.1.1 微孢子虫的分类

在传统五界分类系统中,微孢子虫在很长一段时间被定位于原生动动物界(protista)。1992年,微孢子虫独立成1个门,即微孢子虫门(Microsporidia),下设2个纲(class),即单倍期纲(Haplophasea)和双单倍期纲(Dihaplophasea),纲下设目(order)、总科(superfamily)、科(family)和属(genus)(Sprague et al., 1992)。传统的微孢子虫分类主要是基于光镜、电镜等方法对微孢子虫的各个生活史阶段的孢子形态、内部结构的观察,并佐以生理、病理学方面的指征,如生活史特征、寄主特异性及寄生组织特异性等而划分的。由于微孢子虫形态微小,结构简单,许多种类在形态上差异很小,因此在分类学研究过程中常常伴随着研究者一定的主观性。同时有证据表明即便在微孢子虫种内,孢子大小、形状、孢核数、极囊等结构也存在差异,因此微孢子虫许多现有种的分类仍有待商榷。

微孢子虫在地球上出现的历史非常久远。根据核糖体RNA的分析,有学者认为微孢子虫的存在可追溯到距今 $(2.7 \sim 2.9) \times 10^9$ 年前(Vossbrinck et al., 1987),并认为其是一种原始的真核生物,不过这一结论目前受到挑战。近年来利用分子生物学方法对微孢子虫的系统分类研究表明,微孢子虫与真菌有较近的亲缘关系(Keeling et al., 2000; Keeling, 2003; Lee et al., 2008),这一观点已被广泛接受。美国国家生物技术信息中心(NCBI)分类系统将微孢子虫归于:细胞型生物体(cellular organisms)/真核生物(eukaryote)/真菌(fungi)/微孢子虫(microsporidia)。2012年,微孢子虫归类于真菌已得到国际原生动物进化和分类委员会认

定 (Adl et al., 2012)。微孢子虫和人类的健康和经济活动密切相关, 它不仅是经济昆虫 (家蚕、蜜蜂)、鱼类、兔等的常见病原, 而且可感染人类, 特别是有免疫缺陷的患者。

1.1.2 微孢子虫的多样性

1.1.2.1 微孢子虫的物种多样性

经过长期的演化, 微孢子虫展现出了丰富的物种多样性。微孢子虫种的数量可能与动物种的数量相当 (Canning and Lom, 1986; Weber et al., 1994)。至今, 已发现的微孢子虫超过150个属, 1400多种 (Franzen, 2008)。

微孢子虫可侵染以双翅目和鳞翅目昆虫为主的400种以上的昆虫 (Wittner and Weiss, 1999)。由于家蚕具有重要经济价值, 对寄生于家蚕的微孢子虫研究取得了诸多重要成果。日本学者藤原公在1970~1985年从家蚕中分离得到微孢子虫属 (*Nosema*)、具褶孢虫属 (*Pleistophora*)、泰罗汉孢虫属 (*Thelohania*) 等多种微孢子虫 (藤原公, 1980, 1984a, 1984b, 1985)。广濑安春从1967~1979年采集调查了在东京、日野市、长崎县南佐久郡桑园的约25 000只野外昆虫, 昆虫种类合计有102种, 检出微孢子虫的昆虫有65种, 其中, 从12种昆虫体内获得的微孢子虫对家蚕有感染力 (广濑安春, 1979a, 1979b)。中国在蚕种生产的检疫过程中, 亦发现多种不同类型的微孢子虫, 如广东省蚕业与农产品加工研究所在家蚕中相继发现并分离出MG1、MG2等8种新型微孢子虫。郑祥明等在1995~1998年, 在桑园、菜地及蚕房附近捕获389种共20 000多只昆虫, 检查了微孢子虫感染情况, 在51种昆虫里发现了54种不同的微孢子虫, 其中18种可以经口感染家蚕 (郑祥明等, 2003)。目前已知微孢子虫属、具褶孢虫属、泰罗汉孢虫属、变形孢虫属、内网虫属等5个属的数十种微孢子虫可以感染家蚕 (表1.1) (刘吉平和曾玲, 2006)。鱼类也是微孢子虫感染的主要宿主。至2003年统计, 已报道的鱼类微孢子虫有156种, 分属于14个属 (Lom and Nilsen, 2003)。自1959年发现了微孢子虫感染免疫缺陷型患者后 (Matsubayashi et al., 1959), 相继发现肠孢子虫属 (*Enterocytozoon*)、兔脑炎微孢子虫属 (*Encephalitozoon*)、微孢子虫属 (*Nosema*)、条纹微孢子虫属 (*Vittaforma*)、具褶孢虫属 (*Pleistophora*)、气管普孢虫属 (*Trachipleistophora*)、*Anncaliia* (formerly *Brachiola*) 7个属和一些未明确分类的微孢子虫可以感染人, 尤其是艾滋病 (AIDS) 患者 (Weiss, 2003; Franzen, 2008)。目前, 在自然界中仍存在大量待鉴定的微孢子虫种, 它们寄生于大多数的无脊椎动物和脊椎动物中, 甚至还有超寄生 (指寄生于另一寄生虫体内) 的种类 (Caullery and Mesnil, 1914; Canning, 1975; Freeman et al., 2003)。

表1.1 与桑蚕有关的微孢子虫形态及病原性比较 (刘吉平和曾玲, 2006)

微孢子虫性状	微孢子虫属 <i>Nosema</i>	具褶孢虫属 <i>Pleistophora</i>	泰罗汉孢虫属 <i>Thelohania</i>	变形孢虫属 <i>Vairimorpha</i>	内网虫属 <i>Endoreticulatus</i>
寄生桑蚕的典型种	<i>N. bombycis</i>	<i>Pleistophora</i> sp. PI-NU	<i>Thelohania</i> sp. M32	<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M12	<i>E. bombycis</i>
孢子存在形式	孢子卵圆形无突出物	孢子卵形无突出物	孢子梨形无突出物	2种或3种类型的孢子同时存在	孢子小, 卵圆筒形无突出物
泛孢子母细胞	有	有	有	有	母孢子
形成孢子数/个	2	16, 32, 64 (8)	8	2 (8)	6, 7~50
胚胎传染	有	无	无	有	无
病原性	强	较强	极弱	强	较强

续表

微孢子虫性状	微粒子属 <i>Nosema</i>	具褶孢虫属 <i>Pleistophora</i>	泰罗汉孢虫属 <i>Thelohania</i>	变形孢虫属 <i>Vairimorpha</i>	内网虫属 <i>Endoreticulatus</i>
已知种数/种	>150, 多数待重新审定	>50, 多数待重新审定	>60	多数待重新审定	>5
典型寄主及寄主范围	至少12个目的昆虫被寄生, 尤其以鳞翅目的昆虫最为严重	鱼类和两栖类为主, 而50多种孢子最早是在鳞翅目及鞘翅目、双翅目、直翅目等昆虫中发现	海生虾类为主, 在鳞翅目等昆虫中亦发现了60多种该属的孢子	夜蛾科的鳞翅目昆虫为主, 双翅目、膜翅目亦有寄生	鞘翅目马铃薯甲为主, 而鳞翅目的天幕毛虫、云杉卷叶蛾、柞蚕等都有寄生

1.1.2.2 微孢子虫的遗传多样性

在长期与寄主的协同进化（co-evolution）过程中，不同生境下的微孢子虫为适应特定寄主及生活环境，进化出不同的增殖方式和多样的形态结构，在基因水平也表现出遗传变异的多样性。微孢子虫的遗传多样性是指微孢子虫种间或种内不同群体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和。遗传多样性是为群体适应变化环境的一种策略和表现。由于不同微孢子虫寄生的宿主不一，微孢子虫展示出极为丰富的遗传多样性。有关微孢子虫的遗传多样性研究，主要是围绕微孢子虫基因组大小、保守的rRNA序列、蛋白质编码基因等研究而展开。

基因组是物种所有遗传信息的总和，不同微孢子虫基因组大小差异很大。对于细胞而言，基因组大小是指一个物种基因组单拷贝所包含DNA的量。1984年，Schwartz和Centor发明了脉冲场凝胶电泳（pulsed-field gel electrophoresis, PFGE）技术，被广泛应用到微孢子虫的分子核型研究中。2006年统计表明已有8个属16种微孢子虫进行了染色体DNA的研究。刘吉平和曾玲（2006）根据前人的文献报道，统计了各种微孢子虫染色体DNA数目和大小（图1.1），

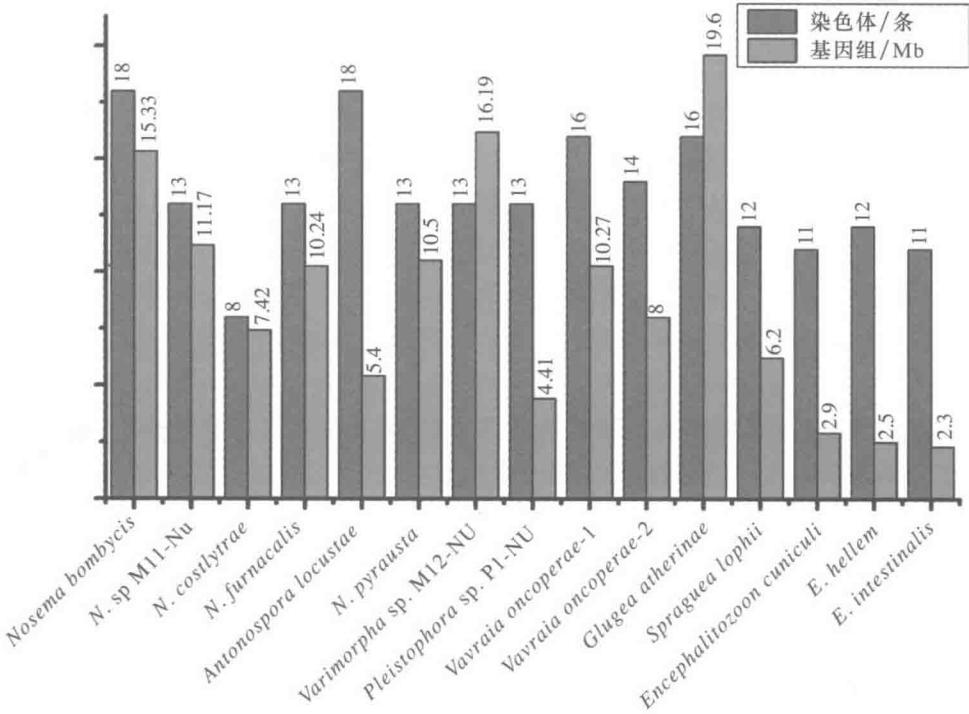


图1.1 微孢子虫染色体数及其大小比较（刘吉平和曾玲, 2006）

从图中可以看出不同种微孢子虫的染色体条数差异很大、基因组大小也相去甚远,其中最小的基因组为肠道脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis*),仅为2.3Mb,与原核生物的基因组大小近似,而感染鱼的*Glugea atherinae*基因组则有19.6Mb。家蚕微孢子虫基因组估测为15.3Mb,染色体为18条,而与之同属的*Nosema costelytrae*的基因组仅为7.42Mb,染色体条数也只有8条,可见即使是同一个属的微孢子虫基因组的大小也不相同。微孢子虫基因组大小多样性是微孢子虫遗传多样性的集中体现,容纳了海量的遗传信息,对基因组多样性的研究将有助于阐明微孢子虫基因组进化的机制。

核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)是研究物种进化的分子标尺。在微孢子虫的核酸研究中,对rRNA序列报道最早,不同种类微孢子虫在rRNA序列上存在差异。Bell等通过比较多种微孢子虫rRNA序列,发现鱼类微孢子虫与寄生于陆生昆虫、水生昆虫的微孢子虫存在显著差异(Bell et al., 2001)。2005年, Vossbrinck等通过分子进化分析比较了125种微孢子虫的SSU rRNA,将微孢子虫按其寄生物种的栖息地,分为淡水水生微孢子虫(aquasporidia)、海洋微孢子虫(marinosporidia)和陆地微孢子虫(terresporidia)(Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005)。由于微孢子虫基因组中存在较多拷贝的rDNA序列,已有研究表明微孢子虫rDNA在种内也存在着明显的遗传多态性。Haro等对7个*E. hellem*分离株基因间的差异研究显示其核糖体中的ITS、IGS存在片段的插入、缺失和点突变(Haro et al., 2003); Dider等对*E. cuniculi* 3个株系的ITS区分析表明,这3个株系的ITS区变异特征明显,并且认为变异可能与寄主的地理域有关(Didier et al., 1995)。申子刚等分析了家蚕微孢子虫CQ1株的SSU rDNA、rDNA-ITS、rDNA-IGS、*sec-61 β* 5'上游序列和*hsp70* 5'上游序列,发现它们都存在着插入、缺失、点突变等多态性,其中rDNA-ITS和rDNA-IGS遗传多样性最为明显,存在着多碱基片段的缺失(申子刚等, 2008)。

微孢子虫的遗传多样性不仅存在于rDNA水平,也表现在蛋白质水平上。1987年Langley等使用双向电泳技术研究了家蚕微孢子虫、蝗虫微孢子虫(*Antonospora locustae*)等孢子虫蛋白质,发现不同微孢子虫间的总蛋白质在种类和数量上差异很明显(Langley et al., 1987)。1999年高永珍等对家蚕微孢子虫及其他7种微孢子虫的总蛋白质及其主要蛋白质进行了研究,发现各种孢子虫总蛋白质的SDS-PAGE电泳图谱均有30多条带(高永珍和戴祝英, 1999),但具有的5条主带各不相同。2001年Cheney等对16种微孢子虫的总蛋白质进行SDS-PAGE,结果表明每一种微孢子虫都有其独特的多肽图谱(Cheney et al., 2001)。随着微孢子虫基因组数据的陆续公布,比较各基因组的蛋白编码基因,发现微孢子虫的基因序列进化速度很快,不同种属间基因编码的同源蛋白序列差异很大(Katinka et al., 2001; Pan et al., 2013)。极管蛋白(PTP)是所有微孢子虫都具有的结构蛋白,其中PTP1、PTP2、PTP3是构成极管的重要组分(Xu and Weiss, 2005)。不同微孢子虫的极管蛋白之间的氨基酸序列差异很大,特别是不同属间的微孢子虫的PTP1、PTP2,氨基酸同源性很低(Polonais et al., 2005),几乎不能用同源比对的方式进行基因注释。幸运的是, *ptp1*、*ptp2*在染色体上的座位是相邻的,且在不同物种间非常保守,这一特征为基因注释提供了参考。同时,虽然属间PTP1、PTP2氨基酸序列差别很大,但关键的氨基酸位点还是具备一定的保守性,如半胱氨酸的数量和位点(Polonais et al., 2005; Pan et al., 2013)。

1.2 微孢子虫的侵染

微孢子虫被认为是自然界最成功的寄生虫，这与它独特的侵染方式有关。微孢子虫侵染宿主的首要前提是孢子的萌发（germination），即极管（polar tube）的弹出。微孢子虫孢子萌发是生物学中最引人注目的亚细胞事件之一，其中包括了巨大力量的积累和控制性释放的过程，是一个快速且紧密相连的级联事件，这一过程包括了非常独特的膜拓扑结构的重建（Keeling and Fast, 2002）。

1.2.1 微孢子虫侵染的过程

微孢子虫的萌发起始于环境中理化因子的触发。由于寄生的环境不同，不同种微孢子虫的触发孢子萌发的环境因素也各不相同（Franzen, 2004）。孢子可以在一系列的物理或化学的刺激下萌发，这些刺激包括环境pH的改变、脱水后再水化、高渗条件、阳离子（ Ca^{2+} 等）或阴离子的存在、暴露于紫外线或过氧化物中，但不仅仅限于这些条件。部分微孢子虫如家蚕微孢子虫，其孢子萌发已经可以在体外模拟。物理或化学刺激可引起孢子内渗透压发生改变，这种压力的产生机制主要有两种推测。一种看法认为，孢子壁上有特殊的跨膜水通道，水通道蛋白（aquaporin）可以快速特异性地运输水分通过孢原质膜，使孢内压力增大，引发孢子萌发（发芽）过程。上述结果的主要证据来自于对按蚊微孢子虫（*Nosema algerae*）的研究，发现其具有类似人CHIP28的水通道蛋白，它能特异地让水穿过孢原质膜（Frixione et al., 1997）。从兔脑炎微孢子虫的基因组中也预测到一个特殊的水通道功能基因，其编码的蛋白质在原生质膜上可能形成水通道，可能与产生向孢内快速流动的水流有关（Ghosh et al., 2006），这对极管的弹出和孢原质注入宿主细胞都非常重要，但尚不知水流入孢内的诱因。另一种看法认为，孢内海藻糖降解为葡萄糖和其他相关的代谢是引起孢内压力增大的重要原因。对水生微孢子虫的研究发现，对孢子发芽处理后孢内海藻糖浓度下降，葡萄糖浓度上升，由此认为海藻糖的降解使孢内糖摩尔浓度上升，促使水分进入孢内，孢子内压上升（Undeen and Vander, 1999）。也有分析表明，细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化是水流入的一个原因（Keohane and Weiss, 1998），在此过程中钙调蛋白扮演着重要的角色（Weidner et al., 1999）。在孢子活化过程中极膜的破裂会将 Ca^{2+} 从内膜系统释放到孢原质中，这些离子可以诱发水的流入，也可以诱导酶的激活（如海藻糖酶），这些酶可进一步增强孢原质内的高渗状态（Keohane and Weiss, 1998），使孢子内的渗透压增大，这种压力可能就是后来萌发事件的驱动力。尽管孢内具体发生了什么分子事件还不完全清楚，但是会造成孢内渗透压的累积，这种压力将成为接下来孢子发芽的驱动力。孢子内压力和质膜层的破坏造成了锚定盘的破裂，从而驱动了极管外翻弹出（Keeling and Fast, 2002）。党晓群等研究发现，家蚕微孢子虫枯草杆菌蛋白酶类似蛋白（NbSLP1）可以定位在极管弹出的位置，这可能与极管的弹出有关（Dang et al., 2012）。

孢子激活后，弹出极管，将孢原质通过极管注入宿主细胞质，进入体内的发育阶段（Wittner, 1999）。微孢子虫这种侵入细胞的方式，已有大量证据而被普遍接受。此外，还发现有一种通过吞噬作用的感染方式。Franzen等在研究 *E. cuniculi* 侵染细胞和孢子在细胞内的发育时，发现孢子可以在弹出极丝之前进入寄主细胞。孢子通过吞噬作用进入细胞后形成内涵体，接着转化成溶菌体。这可以通过孢子与内涵体、溶菌体的标记共定位而得到证实。孢子在成熟的溶菌体里会很快被消化，但其中一些孢子能在被消化前弹出极丝将孢原质注射到寄主细