

## 微孢子虫系统进化研究的变迁与展望

向恒<sup>1,2</sup> 潘国庆<sup>1</sup> 周泽扬<sup>1\*</sup>

(1. 西南大学 蚕学与系统生物学研究所 重庆 400715)

(2. 西南大学 动物科技学院 重庆 400715)

**摘要:** 微孢子虫(Microsporidia)是一类专性细胞内寄生的单细胞真核生物, 在科研、医疗、农业、商业等领域具有重要影响。由于其不具有某些典型的真核生物细胞结构, 如线粒体、过氧化物酶体、高尔基体、鞭毛, 曾将其归属于古真核生物谱系, 认为其进化历程先于这些细胞器的起源, 该假说也得到了一些生物化学和分子生物学研究证据的支持。然而, 在最近十年里, 通过更深入的研究, 尤其是基于分子序列的系统进化分析, 表明微孢子虫和真菌具有一定亲缘关系, 并认为其结构的简约性恰好体现了微孢子虫营寄生生活的高度退化现象。目前对微孢子虫的系统进化仍存在各种不同意见, 对其进化研究历史进行探讨有着重要意义。本文将按照时间顺序回顾微孢子虫进化分类研究过程中的各种研究成果, 并讨论为什么微孢子虫独特的细胞和基因组特性会导致众多的学者在其进化分类问题上争执这么久。

**关键词:** 微孢子虫, 系统进化, 遗传分类

## Advances in the taxonomic study of Microsporidia

XIANG Heng<sup>1,2</sup> PAN Guo-Qing<sup>1</sup> ZHOU Ze-Yang<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Microsporidia are obligate intracellular eukaryotic parasites that infect a wide variety of species, including humans. Members of this phylum have some unusual characteristics compared with other eukaryotes, including the lack of mitochondria, Golgi apparatus, peroxisomes and flagella, which therefore led to the Archezoa hypothesis, namely the origin of the Microsporidia might have preceded the endosymbiotic origin of those cellular components. However, some recent studies have indicated that Microsporidia related to the fungi and that Microsporidia retain a mitosome which is thought to be the remnant of the mitochondria. The long-branch attraction also explains the primitive placement of Microsporidia within the eukaryotic phylogenetic tree. Here we review the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31302036, 31272504, 31072089);教育部博士点基金项目(No. 20110182120008);教育部中央高校基本科研项目(No. XDJK2009C149, XDJK2011C027)

\*通讯作者: Tel: 86-23-68251088; 信箱: zyzhou@swu.edu.cn

收稿日期: 2013-04-28; 接受日期: 2013-07-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

microsporidian taxonomic revisions and discuss the causes and results for these study.

**Keywords:** Microsporidia, Phylogeny, Taxonomy

微孢子虫 (Microsporidia) 是一类直径仅 2–40  $\mu\text{m}$  的单细胞真核生物, 在其它真核生物(主要是动物)细胞内营专性寄生生活。微孢子虫的孢子时期是其唯一生活在寄主外的阶段, 与其他孢子不同, 它的壁很厚, 且具有复杂的感染装置: 极体 (Polaroplast)、极丝 (Polar filament) 和后极泡 (Posterior vacuole), 见图 1。在出芽阶段, 孢子先通过水通道蛋白吸收水分, 形成一个充满压力的肿胀寄生泡; 然后在孢壁顶点处破裂以释放压力, 并弹出极丝; 随后极丝形成管状, 同时孢原质会经此管道注射到另一宿主细胞内, 完成其感染过程(图 2)。

关于微孢子虫细胞结构、生活史及其宿主特异性的研究已有报道。截至目前, 共鉴定微孢子虫属超过 150 个、种超过 1 400 个<sup>[1]</sup>。虽然微孢子虫单个种通常只感染一些特定的寄主, 但整体来说微孢子虫有着广泛的宿主范围: 部分原生生物 (Protists)、大多数节肢动物 (Arthropods) 和脊椎动物 (Vertebrates), 甚至人类<sup>[2]</sup>。微孢子虫具有复杂的感染机制, 但其他细胞结构一般比较简单, 缺少过氧

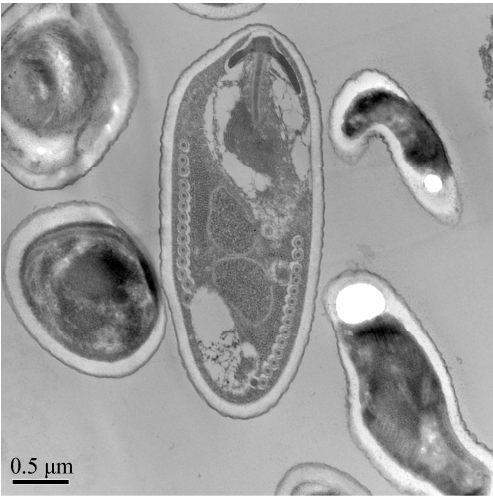


图 1 家蚕微孢子虫成熟孢子的超微结构<sup>[3]</sup>  
Figure 1 Ultrastructure of mature spore of *Nosema bombycis* observed by transmission electron microscopy (TEM)<sup>[3]</sup>

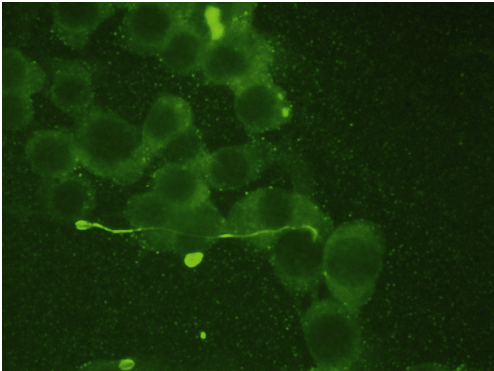


图 2 家蚕微孢子虫极丝弹出的出芽过程<sup>[4]</sup>  
Figure 2 Germination of *Nosema bombycis* observed by immunofluorescence assay (IFA)<sup>[4]</sup>

化物酶体、微管结构以及一些常见真核细胞器, 如线粒体和高尔基体。在关于微孢子虫进化起源的长期争论中, 我们认为微孢子虫的结构简单性和感染机制复杂性共存的特殊情况发挥着重要作用: 一方面, 微孢子虫失去了许多用于与其他真核生物进行比较的形态特征; 而另一方面, 它们高度适应了细胞内的寄生生活, 演变出该类生物所特有的许多功能。正因如此, 微孢子虫很难与其近缘物种进行类比, 微孢子虫的进化地位在过去 150 多年里始终没有得到很好解决。近年来, 随着分子生物技术应用用于微生物系统分类学, 微孢子虫的进化起源研究取得了重大进展, 但在一些问题上仍存在争议。因此, 关于微孢子虫进化起源的诸多问题仍然没有得到最终确定。本文将探讨微孢子虫分类研究的各种理由及其推导出的结果, 并分析其中的生物学问题。

1 微孢子虫的发现及其早期进化观点

19 世纪 50 年代中期, 对家蚕具有毁灭性的微孢子病 (Pébrine) 流行成疫, 使得整个欧洲的蚕丝产业处于崩溃边缘。该产业在当时经济中的重要性使得人们不得不去寻找该病的病因, 微孢子虫的孢子正是在研究病蚕的显微镜中被发现。瑞士微生物学家 Karl Wilhelm von Nägeli 将这些球状体命名为家

蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*), 于是第一种微孢子虫被记载于文献中<sup>[5]</sup>。随后, Louis Pasteur 及其同事<sup>[6]</sup>细致地研究了微孢子虫的寄生特性, 并最终挽救了欧洲的丝绢业。

当 Nägeli 首次发现家蚕微孢子虫时, 将其描述为似酵母的真菌, 并归类于裂殖菌(*Schizomycetes*)。这一结果与我们目前的研究成果惊人地吻合, 但不幸的是, 他的归类结果并非基于细致研究, 而是由于当时知识的缺乏造成的。因此, 这种分类很快被更改为一种更为复杂、充分考虑到原生生物的新分类结果。事实上, 作为一个群体概念, 裂殖菌已被取消, 因为它是一些互不相关的孢子形成的真核生物与细菌的集合。

1882 年, Edouard-Gerard Balbiani<sup>[7]</sup>用“微孢子虫(*Microsporidies*)”这个词来归类这类物种, 并将其归属于原生动物(*Protozoan*)的孢子虫类(*Sporozoa*)。尽管孢子虫类是一种长期存在的概念, 但它并非一种单一的分类单元, 而是由一些远源的能形成孢子的多种寄生虫组合而成, 包括了目前的顶复门(*Apicomplexa*)和单孢子虫门(*Haplosporidia*)的某些物种、以及丝孢子虫目(*Cnidosporidia*)。而微孢子虫就包含于丝孢子虫目中。

1992 年, Sprague 等<sup>[8]</sup>基于孢子超微结构、形态大小、生活史二型性、血清学关系、宿主物种和寄生组织特异性等生物学分类标准, 将微孢子虫从原生动物中独立出来, 设置微孢子虫门(*Microspora*), 下设单倍期纲(*Haplophasea*)和双单倍期纲(*Dihaplophasea*)以及 1 个未确定纲等 3 个纲, 前两纲下共设 4 个目, 6 个总科和 1 个未确定位置的分类群, 再下设 116 个属, 形成了微孢子虫传统的分类系统(图 3)。

尽管这些早期结论存在错误, 但对于我们研究微孢子虫的进化起源具有积极作用, 因为他们已认识到微孢子虫是一个单独的类群, 是一类具有特异宿主感染机制的专性细胞内的寄生虫。更为重要的是, 将微孢子虫归入丝孢子虫目对后来研究该类生

物的起源有重大意义。随着显微镜的改进, 丝孢子虫目各种群之间的关系越来越难以让人信服, 微孢子虫的进化地位也不得不重新修正。最终, 一个有影响力的假说填补了这一空白, 为微孢子虫的进化起源提供了一个全新的、貌似坚实的结论。

## 2 古真核生物(*Archezoa*)假说和微孢子虫早期分子数据

电子显微技术的应用对微孢子虫种属的分析不仅发现了有关孢子的特征, 还揭露出它缺少大量普通真核细胞所拥有的结构, 诸如线粒体、高尔基体、过氧化物酶体、鞭毛以及其他 9+2 微管结构<sup>[10]</sup>。同时, 细胞生化分析结果显示: 3 种远源的微孢子虫都具有核糖体, 但这些核糖体不同于其他真核生物核糖体 80S 的沉降系数, 而是近似于原核生物的 70S<sup>[11]</sup>。基于此, Stewart 和 Mattox 认为这些生物可能代表着古老的古真核生物谱系<sup>[12]</sup>。到 1983 年, Cavalier-Smith 正式提出古真核生物(*Archezoa*)假说(图 4)<sup>[13]</sup>, 并对其进行阐述, 认为该类生物细胞的出现有可能先于共生线粒体的起源。紧接着, 共有四种归属于古真核生物的谱系被鉴定: 始变形虫下门(*Archamoebae*)、滴虫门(*Metamonada*)、副基体门(*Parabasalida*)、微孢子虫门(*Microsporidia*)<sup>[14]</sup>。尽管古真核生物群体之间的关系尚未明确, 但是人们普遍认为它们是一个并系组群。

在古真核生物假说被提出后不久, 人们对微孢子虫的分子数据进行了首次描述, 特别是 Vossbrinck 等对讷卡变态微孢子虫(*Vairimorphaneatrix*)核糖体 RNA 大、小亚基(SSU 和 LUS rRNA)的研究<sup>[15]</sup>, 以另一种方式为古真核生物假说提供了证据。在构建的 SSU rRNA 系统发育树中, 讷卡变态微孢子虫被认定为真核生物最早的一支, 与古真核生物假说中“微孢子虫是一个古老谱系”一致。此外 Vossbrinck 还发现微孢子虫的 5.8S rRNA 和 LSU rRNA 融合成一个单分子, 而该现象只存在于原核生物中, 进一步支持了微孢子虫“原始”的特点。

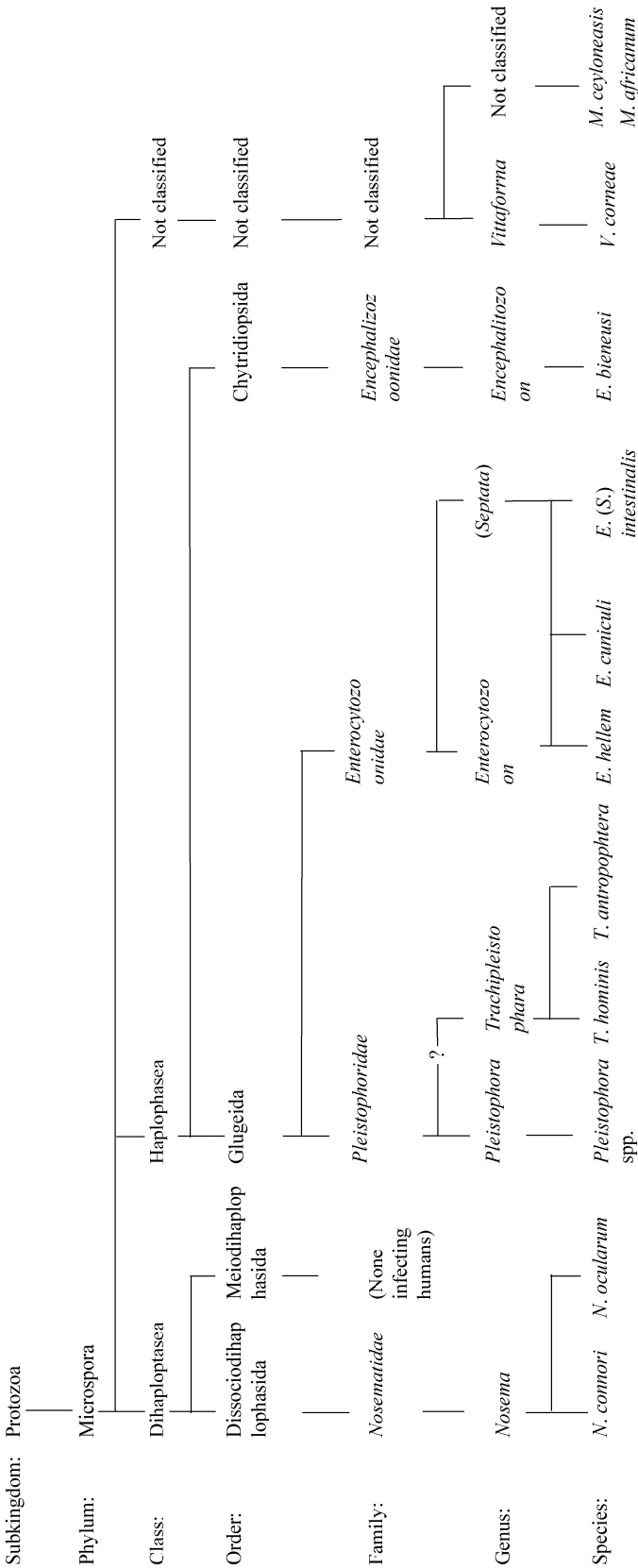


图 3 微孢子虫传统系统分类树<sup>[9]</sup>  
Figure 3 Traditional taxonomy of microsporidia<sup>[9]</sup>



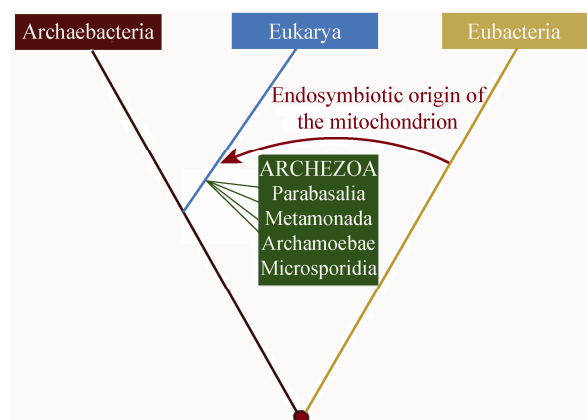


图 4 早于线粒体内共生事件的古真核生物(Archezoa)起源假说<sup>[17]</sup>

Figure 4 Archezoa hypothesis: the origin of the Archezoa (Archamoebae, Metamonada, Parabasalia and Microsporidia) might have preceded the endosymbiotic origin of mitochondrion<sup>[17]</sup>

此后,更多的如异亮氨酰-tRNA 合成酶(Isoleucyl aminoacyl-tRNA synthetase)、延伸因子 1 $\alpha$  (Elongation factor-1 $\alpha$ )、延伸因子 2 (Elongation factor-2)基因的测序数据及其系统发育分析都为微孢子虫“原始”起源的证据增加了更强的说服力<sup>[16]</sup>。事实上,当时支持古真核生物假说的证据似乎是不可辩驳的,而且看起来微孢子虫进化起源的问题也得到了解决。

### 3 微孢子虫和真菌的联系

尽管如此,部分学者对微孢子虫古老起源的古真核生物假说提出了质疑。他们认为微孢子虫专性细胞内寄生的生活方式,也可能导致一些细胞器和细胞结构的减少甚至缺失,诸如线粒体、过氧化物酶体、中心粒、核糖体。而 rRNA 序列中也存在许多缺失,并由此导致了 5.8S rRNA 与 LSU rRNA 发生融合这一类似原核生物特征的结果<sup>[18]</sup>。与此同时,序列差异造成的系统进化分析中算法错误的“长枝吸引”假象也是众所周知的,该假象导致微孢子虫在系统进化树中常常位于它们本来位置的更底端。最终,这些质疑都被证明是有其依据的,但是却花费了大约十年的时间,才收集到足够的证据推翻微孢子虫的古真核生物假说。

在对微孢子虫减数分裂的再分析过程中,鉴于微孢子虫和真菌的某些物种具有很多相似之处,Flegel 和 Pasharawipas 率先提出了微孢子虫类似于真菌的观点<sup>[19]</sup>。紧接着,对微孢子虫  $\alpha$  微管蛋白和  $\beta$  微管蛋白( $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins)构建系统进化树的结果也进一步支持了上述观点<sup>[20]</sup>。随后,在很短一段时间内,其他各种各样的证据相继被报道。微孢子虫中类似真菌几丁质酶(Chitinase)的确定<sup>[21]</sup>、TATA 盒结合蛋白(TATA-box binding protein)<sup>[22]</sup>、RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II)<sup>[23]</sup>、热激蛋白 70 (HSP70)<sup>[24-26]</sup>、谷氨酰合成酶(Glutamyl synthetase)<sup>[16]</sup>、丙酮酸脱氢酶 E1 $\alpha$  和丙酮酸脱氢酶 E1 $\beta$  ( $\alpha$ - and  $\beta$ - subunits of pyruvate dehydrogenase E1)<sup>[27]</sup>的系统进化分析都支持了微孢子虫和真菌有关联这一观点。除系统进化树证据外,以前被认为在微孢子虫中不存在的转座元件,在家蚕微孢子虫基因组中被发现,并与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 Ty3 型 LTR 反转座元件具有亲缘关系<sup>[28]</sup>,进一步拉近了微孢子虫与真菌的距离。随后,采用基于基因同源性的 Darkhorse 全基因组统计方法,鉴定了家蚕微孢子虫基因组中 2 705 个基因的来源谱系,发现 43.20%的基因与真菌具有亲缘关系;并通过鉴定全基因组谱系可能性指数(Lineage probability index, LPI),发现家蚕微孢子虫与其他微孢子虫间的 LPI 为 0.8–0.9,具有最近的亲缘关系,与真菌界的 LPI 为 0.6,与原生生物界的 LPI 为 0.4,由此证明微孢子虫与真菌存在着更近的亲缘关系<sup>[29]</sup>。最近, Capella-Gutierrez 等<sup>[30]</sup>利用已报道 6 个微孢子虫的基因组数据进行系统进化分析,通过统计学方法证明了微孢子虫与真菌间的亲缘关系,以及利用 53 个保守基因构建的统一进化树再次支持了上述结果。

### 4 对微孢子虫古老起源的质疑

关于微孢子虫起源的两种主流学说,虽然看似相互抵触,但在短时间内,似乎都能找到充足的论据。当越来越多的资料支持真菌和微孢子虫存在联系时,古真核生物假说开始受到冲击。在一些结果

中,通过去除基因中快速进化的序列位点,重新构建系统进化树,将导致树的拓扑结构发生根本改变,使得以前支持古真核生物假说的证据发生变化,原本位于系统进化树原始位置的微孢子虫变得更为高等,与真菌存在亲缘关系的进化地位得以体现<sup>[23]</sup>。此外,对兔脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon cuniculi*)基因组的分析也揭示出基因分歧率与微孢子虫处于真核生物“原始”位置的结果有关,而一些保守基因的系统发育分析结果则表明微孢子虫类似于真菌<sup>[31]</sup>。这一发现有力地说明“长枝吸引”假象导致了人们在早期关于微孢子虫系统发育研究上的错误。

## 5 “微孢子虫缺少线粒体”的说法遭质疑

系统发育研究的进展清晰表明了微孢子虫在进化树“原始”位置上的错误,但提出古真核生物假说的根本原因不在于分子进化树,而在于微孢子虫缺少线粒体。如果说微孢子虫与真菌相关,则意味着微孢子虫的祖先一定也在线粒体。直到 1995 年,Clark 和 Roger 在一种古真核生物——溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)中鉴定到编码线粒体蛋白的相关基因<sup>[32]</sup>,该问题才得以解答。随后,在蝗虫微孢子虫(*Antonospora locustae*)、讷卡变态微孢子虫(*Vairimorpha necatrix*)和兔脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon cuniculi*)中也鉴定到线粒体相关的热激蛋白 70 基因<sup>[24-26]</sup>。此外,蝗虫微孢子虫中鉴定到线粒体相关基因:丙酮酸脱氢酶 E1 $\alpha$ 、丙酮酸脱氢酶 E1 $\beta$ 、ADP/ATP 载体蛋白(ADP/ATP carrier protein)、丙酮酸转运蛋白(Pyruvate transporter)和线粒体运输相关肽酶(Mitochondrial processing peptidases)<sup>[27,33]</sup>;兔脑炎微孢子虫基因组中发现 6 个线粒体相关基因:铁硫簇组装系统中的类 NIFU 蛋白(NIFU-like protein)、固氮 1 同源蛋白(Nitrogen fixation 1 homolog)、铁氧还蛋白(Ferredoxin),以及 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)、热激蛋白 70、丙酮酸脱氢酶 E1 $\beta$ <sup>[34]</sup>,都表明古真核生物不具有祖先线粒体的说法是错误的。

虽然微孢子虫具有线粒体相关基因的观点得到证实,但由于预测线粒体导肽这一技术对微孢子虫不适用,目前研究人员也只能推测微孢子虫可能具有类似线粒体的细胞器。要明确一个细胞器是否真的存在,物理定位是必要的。通过线粒体热激蛋白 70 的免疫定位技术,在人气管普孢虫(*Trachipleistophora hominis*)中发现了线粒体的残体,被称之为纺锤剩体(Mitosome)<sup>[35]</sup>。随后,在兔脑炎微孢子虫中也发现了纺锤剩体<sup>[33]</sup>。

与常规线粒体相比,纺锤剩体丧失了许多功能,它们不再负责氧化分解或其他常规线粒体的诸多功能,它们主要进行铁硫簇组装<sup>[34]</sup>。而以前被认为是线粒体起源的基因被发现定位于细胞质中<sup>[36]</sup>,这表明微孢子虫线粒体不仅存在功能丧失,而且部分功能已经整合进了细胞质。

综上所述,微孢子虫具有线粒体相关基因以及纺锤剩体的发现,终结了微孢子虫属于古真核生物的观点。随之,新观点得以提出:微孢子虫是一类高度适应寄生生活的真核生物,起源于线粒体内共生事件之后,存在着诸多与真菌相近的细胞和分子特征,证实了其真菌的遗传进化关系。而当前讨论的焦点则转变为:微孢子虫是真菌的姊妹支?还是一类早期的真菌?

## 6 微孢子虫属于真菌的哪一类?

目前,支持微孢子虫与真菌间关系的系统进化分析大多都是基于单基因的结果,不能明确微孢子虫和真菌间物种差异到底有多大。因此,这些分析都不能真正地阐明“微孢子虫与真菌具有亲缘关系”或者“微孢子虫就是真菌”。

为了解决这一问题,Keeling 等分析了微管蛋白(Tubulins)<sup>[37]</sup>。他们构建了  $\alpha$  微管蛋白和  $\beta$  微管蛋白以及二者结合的进化树,结果都强烈的支持了微孢子虫与真菌的亲缘关系,并将微孢子虫进化支归入真菌界,而非作为真菌的姊妹支,进而确认了微孢子虫与接合菌门(Zygomycota)尤其是虫霉目(Entomophthorales)间的亲缘关系(图 5A)<sup>[37-38]</sup>。然而,由于壶菌门(Chytridiomycota)微管蛋白基因已

被证实比其他真菌更保守,因此该进化树的结论必须小心对待。既然“长枝吸引”假象可以将微孢子虫归属于“原始”的真核生物,它也可以将微孢子虫错误地划入真菌。

理想情况下,大量、广泛、多基因的系统进化研究将能解决该问题,但关键在于是否存在众多的数据可供分析?不幸的是,微孢子虫基因数目是偏少的,目前的基因组测序结果显示其总数仅在2 000–4 500之间,而且绝大多数基因由于在序列水平上分化太大而不能用于构建系统发育树<sup>[31]</sup>。尽管如此,一些利用多基因的分析也已经开展。基于8个保守的蛋白编码基因: $\alpha$ 微管蛋白、 $\beta$ 微管蛋白、RNA聚合酶II大亚基(RPB1)、DNA修复解旋酶RAD25、TATA盒结合蛋白、E2泛素结合酶亚基(UBC2)、丙酮酸脱氢酶E1的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基,结合起

来构建的一个进化树支持了微孢子虫归属于真菌,并将其作为子囊菌(Ascomycetes)和担子菌(Basidiomycetes)的姊妹支(图5B)<sup>[39]</sup>。另一组数据:rRNA、28S rRNA、5.8S rRNA、延伸因子1(EF-1)、RNA聚合酶II的两个亚基RPB1和RPB2,所构建的系统进化树却支持微孢子虫与壶菌 *Rozella* 的亲缘关系(图5C)<sup>[40]</sup>。此外,对延伸因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )缺失序列的分析却发现微孢子虫位于所有真菌之外,作为其姊妹支而存在(图5D)<sup>[41]</sup>。这些结论差异巨大,不能统一起来回答微孢子虫是否就是真菌。

考虑到微孢子虫基因组中大多数基因都丢失,而那些保留下来的基因则具有高度的变异性,这成为阻碍正确重构微孢子虫和真菌间系统进化关系的主要原因。基于基因序列的系统进化分析可能不是破解微孢子虫进化起源最好的方法,但基因组中

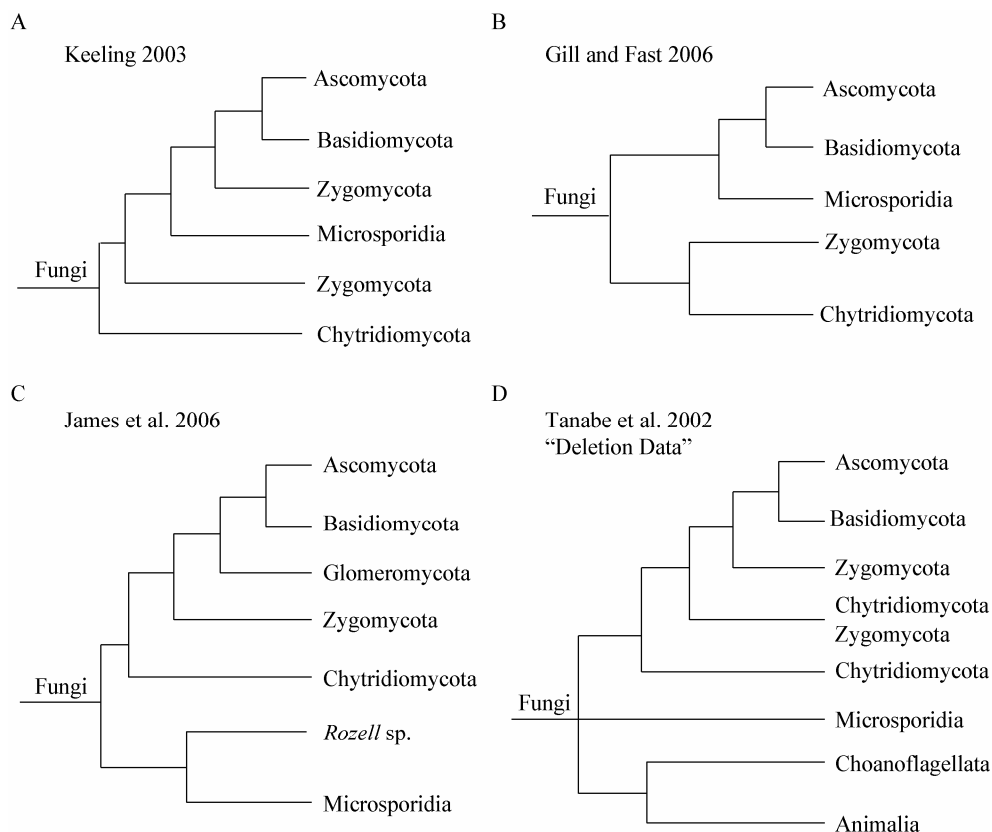


图5 微孢子虫系统进化研究示意图<sup>[17]</sup>

Figure 5 Sketch of the microsporidian phylogenetic trees according to previous reports<sup>[17]</sup>

注:详细系统进化树参见原文献, A<sup>[38]</sup>, B<sup>[39]</sup>, C<sup>[40]</sup>, D<sup>[41]</sup>。

Note: A<sup>[38]</sup>, B<sup>[39]</sup>, C<sup>[40]</sup>, D<sup>[41]</sup>。

其他类型的信息却很少被挖掘。一些基因组结构方面特征性的改变,如基因的缺失和插入,已被用于推断其亲缘关系<sup>[42]</sup>。例如,微孢子虫延伸因子 1 $\alpha$  基因中包含着一段 11 个氨基酸的插入,而该现象仅在真菌、动物以及原生生物中被发现<sup>[43]</sup>。但不幸的是,此种特征太稀少,而且十分依赖于基因序列的保守性,而微孢子虫高度分化的基因却使得插入和缺失的分析变得相当困难。

最近,另一种基于保守基因排列顺序的方法得以应用<sup>[44]</sup>,因为微孢子虫的基因序列虽然是快速变化的,但其基因组中基因的排列顺序却是高度保守的<sup>[45]</sup>。分析结果表明微孢子虫与接合菌(Zygomycetes)具有比其他真菌更高频率的基因顺序同源性<sup>[44]</sup>。有趣的是,其中一个同源区域是接合菌的交配型位点(Mating-type locus, MAT),这表明微孢子虫可能存在性别相关基因。而且,该研究<sup>[44]</sup>还确定了核糖体蛋白 L21 和 S9 的一个保守基因簇,这一特征不仅仅存在于微孢子虫和接合菌中,而在所有真菌中都存在。进一步开展全基因组调查<sup>[46]</sup>,发现谷氨酰和脯氨酰 tRNA 合成酶(Glutamyl-prolyl tRNA synthetase)以及泛素和核糖体亚基 S30 (Ubiquitin-ribosomal subunit S30)的基因

融合现象在动物、领鞭毛虫(Choanoflagellates)等物种中有发生,但在真菌和微孢子虫中却不存在。此外,还发现一个由含高速泳动族(High-mobility group, HMG)结构域基因、RNA 解旋酶(RNA helicase)和磷酸丙糖转运体(Triose phosphate transporter, TPT)构成的微孢子虫保守基因位点,与接合菌的性别位点在基因顺序和结构上相似。这些都进一步支持了微孢子虫与真菌间的亲缘关系。

## 7 展望

微孢子虫进化起源的研究已经长达 150 多年,现在又回到了“原点”。起初,学者们因当时知识所限将微孢子虫归入真菌,在此之后,通过研究将微孢子虫划入原生动物中各种各样的类群,一直到“古老”的古真核生物,而现在,又将其认作为“高等”的真菌(图 6)。这为我们研究物种的起源和进化造成了许多不可预见的影响。例如,作为一类真菌,微孢子虫的分类应该受到植物学命名法则的作用,但微孢子虫却几乎是根据动物学的规则来命名的。从理论上讲,由于与真菌的亲缘关系,所有微孢子虫的现行名字将被视为无效。但幸运的是,现在已经正式地将微孢子虫排除出了植物学命名规则<sup>[47]</sup>。

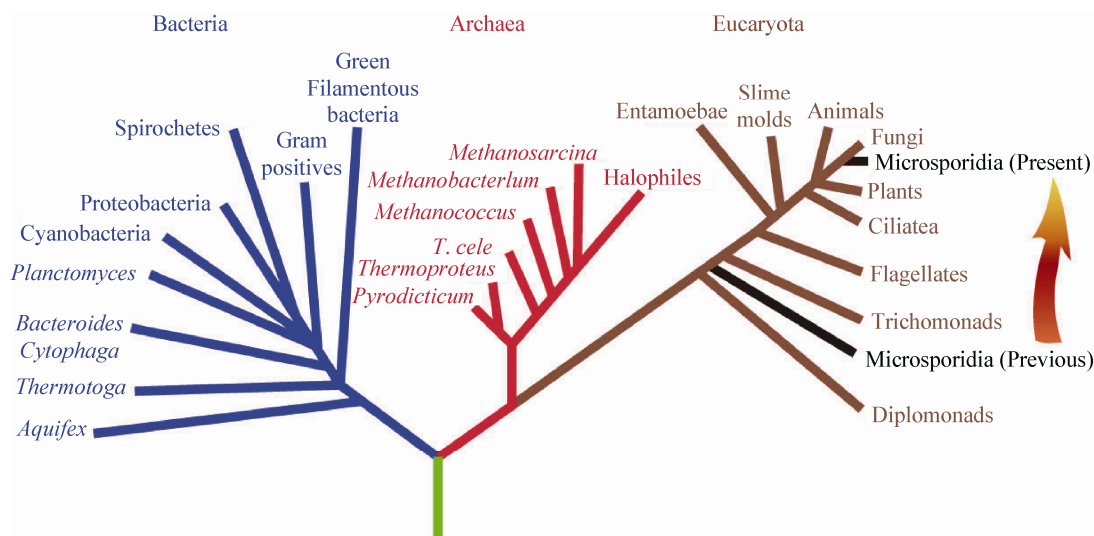


图 6 微孢子虫进化地位研究的变迁, 基于 Woese 依据 SSU rRNAs 序列构建的生命系统进化树<sup>[48]</sup>

Figure 6 Change in the taxonomic study of Microsporidia, based on a phylogenetic tree of life proposed by Carl Woese<sup>[48]</sup>

到目前为止,微孢子虫和真菌之间到底是什么关系还没有完全弄清楚。在系统进化分析和基因组中基因顺序上的研究都认为微孢子虫应归属于真菌,且与接合菌间具有特定的亲缘关系。基于此,我们得出一个最可能的微孢子虫起源假说:微孢子虫来源于一株接合菌祖先。

虽然微孢子虫基因的高度分化性阻碍了微孢子虫进化起源的研究,甚至影响了其基因组的结构分析,但是仍然有许多方法来解决这一问题。例如,继续探索真菌多样性,尤其是大规模基因组测序计划的开展,完全有可能鉴别微孢子虫的真菌祖先谱系,同时也能研究微孢子虫的物种多样性。最后要说明的是,微孢子虫与真菌存在关联的证据现在看来是无可争辩的,但同时应该记得,早期“铁定”的古真核生物起源假说后来被证明是错误的。虽然我们预测真菌起源假说是否在以后也会被推翻,但对于微孢子虫这类物种而言,未来研究将产生一个新分类结果是完全可能的。不管未来该领域将如何发展,这一富有挑战性的研究课题一定充满趣味!

## 参 考 文 献

- [1] Larsson J. Identification of microsporidia[J]. Acta Protozoologica, 1999, 38(1): 161-197.
- [2] Weiss LM, Vossbrinck CR. Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects[J]. Advances in Parasitology, 1998, 40(1): 351-395.
- [3] 吴正理. 家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)孢壁蛋白的研究——三种主要蛋白质成分的鉴定与克隆分析[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2007.
- [4] 李艳红. 家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)孢壁蛋白SWP26的研究[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2008.
- [5] Nageli KW. Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen[J]. Botanische Zeitung, 1857, 15(1): 760-761.
- [6] Pasteur L. Etudes sur la maladie des vers a soie[M]. Paris: Gauthier-Villars, 1870, 2(1): 322.
- [7] Balbiani G. Sur les microsporidies ou psorospermies des articles[J]. Comptes Rendus de Academie des Sciences, 1882, 95(1): 1168-1171.
- [8] Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI. Taxonomy of phylum Microspora[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1992, 18(5/6): 285-395.
- [9] Franzen C, Muller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12(2): 243-285.
- [10] Vavra J, Larsson JIR. Structure of the microsporidia[M]. Washington, DC: ASM Press, 1999.
- [11] Curgy JJ, Vavra J, Vivares C. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms[J]. Biology of the Cell, 1980, 38(1): 49-51.
- [12] Stewart KD, Mattox KR. Phylogeny of phytoflagellates [M]. New York: Elsevier/North-Holland, 1980.
- [13] Cavalier-Smith T. A 6-kingdom classification and a unified phylogeny[M]. Berlin: De Gruyter, 1983.
- [14] Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria[J]. Nature, 1987, 326(1): 332-333.
- [15] Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedman S, et al. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes[J]. Nature, 1987, 326(1): 411-414.
- [16] Brown JR, Doolittle WF. Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases[J]. Journal of Molecular Evolution, 1999, 49(4): 485-495.
- [17] Corradi N, Keeling PJ. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions[J]. Fungal Biology Reviews, 2009, 23(1): 1-8.
- [18] Cavalier-Smith T. Kingdom Protozoa and its 18 phyla[J]. Microbiological Reviews, 1993, 57(4): 953.
- [19] Flegel TW, Pasharawipas T. A proposal for typical eukaryotic meiosis in microsporidians[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(1): 1-11.
- [20] Edlind T, Visvesvara G, Li J, et al. Cryptosporidium and microsporidial beta-tubulin sequences: predictions of benzimidazole sensitivity and phylogeny[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1994, 41(5): 38S.
- [21] Hinkle G, Morrison HG, Sogin ML. Genes coding for reverse transcriptase, DNA-directed RNA polymerase, and chitin synthase from the microsporidian *Spraguea lophii*[J]. Biological Bulletin, 1997, 193(2): 250-251.
- [22] Fast NM, Logsdon JM Jr, Doolittle WF. Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: evidence for a microsporidia-fungi relationship and spliceosomal intron loss[J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16(10): 1415-1419.
- [23] Hirt RP, Logsdon JM, Healy B, et al. Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(2): 580-585.
- [24] Germot A, Philippe H, Le Guyader H. Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1997, 87(2): 159-168.
- [25] Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, et al. A mitochondrial *Hsp70* orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria[J]. Current Biology, 1997, 7(12): 995-998.
- [26] Peyretailade E, Broussolle V, Peyret P, et al. Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin[J]. Molecular Biology and Evolution, 1998, 15(6): 683-689.
- [27] Fast NM, Keeling PJ. Alpha and beta subunits of pyruvate

- dehydrogenase E1 from the microsporidian *Nosema locustae*: mitochondrion-derived carbon metabolism in microsporidia[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2001, 117(2): 201-209.
- [28] Xiang H, Pan G, Zhang R, et al. Natural selection maintains the transcribed LTR retrotransposons in *Nosema bombycis*[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2010, 37(5): 305-314.
- [29] 向恒, 潘国庆, 陶美林, 等. 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[J]. 蚕业科学, 2010, 36(003): 442-446.
- [30] Capella-Gutierrez S, Marcet-Houben M, Gabaldon T. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi[J]. BMC Biology, 2012, 10(47): 2.
- [31] Thomarat F, Vivares CP, Gouy M. Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes[J]. Journal of Molecular Evolution, 2004, 59(6): 780-791.
- [32] Clark CG, Roger AJ. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(14): 6518.
- [33] Williams BAP, Haferkamp I, Keeling PJ. An ADP/ATP-specific mitochondrial carrier protein in the microsporidian *Antonospora locustae*[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 375(5): 1249-1257.
- [34] Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*[J]. Nature, 2001, 414(6862): 450-453.
- [35] Williams BAP, Hirt RP, Lucocq JM, et al. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*[J]. Nature, 2002, 418(6900): 865-869.
- [36] Williams BAP, Cali ANN, Takvorian PM, et al. Distinct localization patterns of two putative mitochondrial proteins in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2008, 55(2): 131-133.
- [37] Keeling PJ, Luker MA, Palmer JD. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(1): 23-31.
- [38] Keeling PJ. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia[J]. Fungal Genetics and Biology, 2003, 38(3): 298-309.
- [39] Gill EE, Fast NM. Assessing the microsporidia-fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes[J]. Gene, 2006, 375(1): 103-109.
- [40] James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny[J]. Nature, 2006, 443(7113): 818-822.
- [41] Tanabe Y, Watanabe MM, Sugiyama J. Are Microsporidia really related to Fungi? a reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi[J]. Mycological Research, 2002, 106(12): 1380-1391.
- [42] Baldauf SL, Palmer JD. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins[J]. National Academy of Sciences, 1993, 90(24): 11558-11562.
- [43] Kamaishi T, Hashimoto T, Nakamura Y, et al. Complete nucleotide sequences of the genes encoding translation elongation factors 1alpha and 2 from a microsporidian parasite, *Glugea plecoglossi*: implications for the deepest branching of eukaryotes[J]. Journal of Biochemistry, 1996, 120(6): 1095-1103.
- [44] Lee SC, Corradi N, Byrnes Iii EJ, et al. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi[J]. Current Biology, 2008, 18(21): 1675-1679.
- [45] Slamovits CH, Fast NM, Law JS, et al. Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites[J]. Current Biology, 2004, 14(10): 891-896.
- [46] Lee SC, Corradi N, Doan S, et al. Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10539.
- [47] Redhead SA, Kirk PM, Keeling PJ, et al. Proposals to exclude the phylum Microsporidia from the Code[J]. Taxon, 2009, 58(2): 10-11.
- [48] Woese C. The universal ancestor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(12): 6854-6859.