

从梨花迁粉蝶中所得微孢子虫的系统进化分析*

郑丽金¹, 陈世良², 马振刚¹, 许金山¹, 周泽扬^{1,3}

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 云南农业科学研究所蚕蜂研究所, 云南 蒙自 661101;

3. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715)

摘要:从中国云南省野外采集的梨花迁粉蝶(*Catopsilia pyranthe*)中分离得到一株疑似微孢子虫,对该分离株的核糖体 SSUrRNA(Small subunit ribosomal RNA)和 α -tubulin 基因进行克隆测序。通过序列分析及系统进化树构建,结果发现该分离株属于 *Nosema* 属的一种微孢子虫,命名为 *Nosema* sp. CP。通过对 SSUrRNA 系统进化分析发现,*Nosema* sp. CP 与家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)、斜纹夜蛾微孢子虫(*Nosema spodopterae*)的亲缘关系相对于菜粉蝶微孢子虫 *Nosema* sp. MPr 更加接近。通过对 α -tubulin 基因的系统进化分析,结果表明 *Nosema* sp. CP 与 *N. bombycis* 聚在一支上,进一步证实了它们的紧密关系。因此,本研究首次在粉蝶科(Pieridae)的梨花迁粉蝶中分离得到的 *Nosema* 属微孢子虫是与家蚕微孢子虫非常近源的一类微孢子虫,并暗示了粉蝶科昆虫感染的微孢子虫具有潜在多样性。

关键词:微孢子虫;梨花迁粉蝶;系统进化分析;SSUrRNA; α -tubulin 基因

中图分类号:Q785;Q959.115⁺.92

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2014)05-0042-06

微孢子虫(Microsporidia)是一类专性细胞内寄生的原生动物^[1],它具有极其广泛的寄主,能寄生于昆虫、鱼类、兔类、啮齿类、灵长类等动物^[2]。在自然界已发现报道的微孢子虫有160个属,约1300种^[3],近些年来,人们在艾滋病患者和免疫缺陷型患者中相继发现了分属5科9属共10多个种的微孢子虫,因此微孢子虫更加引起了国内外学者的普遍关注。

鳞翅目(Lepidoptera)昆虫是微孢子虫寄生的最大类群,広瀬安春等人^[4]曾在调查的102种野外昆虫中的69种昆虫体内检测出了微孢子虫;后续研究者也陆续从桑尺蠖(*Phthonandria atrilineata* Butler)、菜粉蝶(*Pieris rapae*)、蜀柏毒蛾(*Parocneria orientalis* Chao)、蓝萤叶甲(*Mimastra unicitarsis* Laboissiere)、斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)等昆虫中分离到微孢子虫^[5-10]。目前,在蚕种检疫中异型微孢子虫的频繁出现,使得野外昆虫微孢子虫对家蚕的交叉感染备受关注。由于野外昆虫微孢子虫病在不同宿主之间存在交叉感染,给蚕业生产带来了严重的危害^[5,8-11]。研究者还在菜粉蝶(*Pieris rapae*)中检出多种微孢子虫,发现这些它们可以感染家蚕,且不同形态具有不同的感染力及胚种传染性,然而都缺少强有力的分子数据证明这些观点^[8-9]。

梨花迁粉蝶(*Catopsilia pyranthe*)属粉蝶科(Pieridae),黄粉蝶亚科(Coliadinae Swainson);幼虫多取食苏木科(Caesalpinaceae)的黄槐(*Senna surattensis*)、腊肠树(*Cassia fistula*)等;成虫喜欢访花,飞行极迅速,活动于林缘开阔地。由于梨花迁粉蝶成虫活动范围广,自然感染微孢子虫概率高,病原孢子对环境污染面广,因而对梨花迁粉蝶微孢子虫的研究不容忽视,但是至今国内外未有微孢子虫在梨花迁粉蝶中寄生的证据。本研究首次从梨花迁粉蝶中分离得到一株疑似微孢子虫,并基于目前被广泛地用于微孢子虫物种分类的核糖体 SSUrRNA 序列和 α -tubulin 序列分析方法^[12-15]对该株微孢子虫 SSUrRNA 和 α -tubulin 基因序列进行克隆、测序及系统进化分析,以此明确了它的分类地位。

* 收稿日期:2014-04-30 网络出版时间:2014-9-17 22:37

资助项目:国家高技术研究发展计划(863计划)子课题(No. 2013AA102507);重庆市自然科学基金计划项目(No. cstc2011jjA80003);重庆市教委科学技术项目(No. KJ110611)

作者简介:郑丽金,女,研究方向为资源动物分子生物学,E-mail:zhenglijin8497@126.com;通讯作者:许金山,E-mail:xujinshan2008@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140917.2237.014.html>

1 材料与方法

1.1 材料

从中国云南省红河自治州野外采集梨花迁粉蝶,将之研磨匀浆后进行显微镜观察。收集疑似有微孢子虫感染的匀浆液,800 r/min 离心 5 min,收集上层液后 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清得到沉淀。将沉淀在不连续 Percoll 密度梯度(Percoll 密度梯度依次为 100%、75%、50%、25%)下进行 12 000 r/min 离心 30 min,回收纯化微孢子虫。4 °C 保存待用。

1.2 方法

1.2.1 全基因组 DNA 提取 采用传统的 CTAB 法提取微孢子虫基因组,具体过程为:取 100 μ L 微孢子悬浮液 12 000 r/min 离心 5 min 使孢子沉淀,弃上清后沉淀中加入 500 μ L 预热温度为 55 °C 的 2% CTAB、20 μ L β -巯基乙醇和 20 μ L 的 20 mg/mL 蛋白酶 K,于 55 °C 水浴过夜。其次用 400 μ L 氯仿 12 000 r/min 抽提 10 min,取上清加入两倍体积无水乙醇,于 -20 °C 中沉淀 1 h,12 000 r/min 离心 10 min 之后沉淀用 70% 乙醇洗两遍。最后用 10 μ L 灭菌水溶解 DNA。

1.2.2 序列 PCR 扩增及测序 参考过去的相关报道^[16-17],设计合成以下引物序列:SSUrRNA-F,5'-CACCAGGTT-GATTCTGCC-3',SSUrRNA-R,5'-TTATGATCCTGCTAATGGTTC-3'; α tubulin-F,5'-AAGTTGGAATGCGTGTT-GG-3', α tubulin-R,5'-AAGGGTCGTATGGGTTGTT-3'。PCR 反应体系为:10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μ L, 微孢子虫基因组 DNA 模板 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L, ddH₂O 补足到总体积 25 μ L。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。最后将片段克隆到 pMD19-T 载体后送到华大基因公司进行测序。获得测序结果的 5 条 SSUrRNA 序列和 2 条 α tubulin 基因序列已经提交到 Genbank 数据库中,登陆号分别为 KM001605~KM001609 和 KM001621~KM001622。

1.2.3 系统进化树构建 已公布的部分微孢虫 SSUrRNA 序列以及 α tubulin 基因序列从 GenBank 数据库中下载获得(表 1),多重序列比对采用 ClustalX1.8 软件进行^[18],采用 phyML 软件 GTR 模型的最大似然法构建系统进化树^[19],采用 100 次重复进行 bootstrap 值可靠性检测。

表 1 研究中涉及到的微孢子虫、寄主及其 SSUrRNA 和 α tubulin 基因登录号

Tab. 1 The GenBank accession number of SSUrRNA and α tubulin in Microsporidia strains and their hosts used in this study

序列类型	微孢子虫	宿主	Genbank 登录号
SSUrRNA	<i>Endoreticulatus</i> sp. CHW-2008 Austria	<i>Thaumetopoea processionea</i>	EU260046
	<i>Endoreticulatus</i> sp. CHW-2004 Taiwan	<i>Ocinara lida</i>	AY502944
	<i>Endoreticulatus bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	AY009115
	<i>Endoreticulatus schubergi</i>	<i>Lymantria dispar</i>	L39109
	<i>Microsporidium</i> sp. 57864	未知	U90885
	<i>Nosema carpocapsae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	AF426104
	<i>Nosema thomsoni</i>	<i>Choristoneura conflictana</i>	EU219086
	<i>Nosema ceranae</i>	<i>Apis mellifera</i>	DQ486027
	<i>Nosema apis</i>	<i>Apis mellifera</i>	U97150
	<i>Nosema</i> sp. PR	<i>P. rapae</i>	EU864531
	<i>Nosema antheraeae</i>	<i>Antheraea pernyi</i>	DQ073396
	<i>Nosema</i> sp. SC	<i>Samia cynthia ricini</i>	FJ767862
	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	AY259631
	<i>Nosema plutellae</i>	<i>Plutella xylostella</i>	AY960987
	<i>Nosema</i> sp. MPr	<i>P. rapae</i>	HQ399665
	<i>Nosema</i> sp. C01	<i>P. rapae</i>	AY383655
	<i>Nosema spodopterae</i>	<i>Spodoptera litura</i>	AY747307
	未知 <i>Nosema</i>	<i>Eurema blanda arsakia</i>	EU338534
	<i>Vairimorpha</i> sp. CHW-2008a	<i>Ocinara lida</i>	EU487251
	<i>Vairimorpha</i> sp. C21	未知	AY311592

续表 1

序列类型	微孢子虫	宿主	Genbank 登录号
<i>α-tubulin</i>	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	DQ091252
	<i>Nosema spodopterae</i>	<i>Spodoptera litura</i>	DQ091251
	<i>Nosema</i> sp. PX1	<i>Plutella xylostella</i>	DQ083401
	<i>Nosema plutellae</i> PX2	<i>Plutella xylostella</i>	DQ083402
	<i>Nosema ceranae</i>	<i>Apis mellifera</i>	XM_002995342
	<i>Nosema philosamiaae</i>	<i>Ricinus communis</i>	GU947652
	<i>Nosema antheraeae</i>	<i>Antheraea pernyi</i>	HQ215548
	<i>Glugea plecoglossi</i>	<i>Plecoglossus altivelis</i>	AY138804
	<i>Spraguea lophii</i>	未知	U66906

2 结果

2.1 梨花迁粉蝶

从中国云南省红河自治州野外采集的梨花迁粉蝶,研磨成匀浆后进行显微镜观察(图 1)。发现梨花迁粉蝶中存在疑似微孢子虫(图 1 中箭头所指),个体形态相近,为长卵圆形。

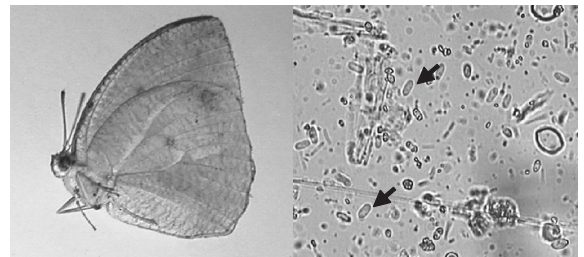


图 1 梨花迁粉蝶和匀浆液镜检(×63)

Fig. 1 The visualization of Microsporidia spores under microscope and its host *Catopsilia pyranthe*(×63)

2.2 SSUrRNA 序列分析结果

在测序的 5 个克隆中,梨花迁粉蝶微孢子虫的 SSUrRNA 扩增长度均为 1 232 bp。G+C 所占比例为 34.17%,与已知 *Nosema* 属微孢子虫小亚基基因的 G+C 所占比例(33.9%~38.6%)相符合^[20]。多重序列比对结果显示这 5 个克隆之间的两两序列相似性达到 99% 以上,仅有 4~9 个碱基的单核苷酸突变(表 2)。这些 SSUrRNA 基因突变为单核苷酸的转换和颠换,而不存在插入或缺失,共有 16 个变异位点(表 3)。

表 2 SSUrRNA 两两克隆间的序列差异

Tab. 2 The pairwise nucleotide differences among five SSUrRNA cloning sequences

SSUrRNA 克隆	C1	C2	C3	C4	C5	<i>N. bombycis</i>
C2	99.67%(4)					
C3	99.51%(6)	99.51%(6)				
C4	99.43%(7)	99.43%(7)	99.27%(9)			
C5	99.51%(6)	99.51%(6)	99.43%(7)	99.27%(9)		
<i>N. bombycis</i>	99.76%(3)	99.76%(3)	99.59%(5)	99.51%(6)	99.59%(5)	
<i>N. spodopterae</i>	99.84%(2)	99.76%(3)	99.67%(4)	99.59%(5)	99.67%(4)	99.92%(1)

注:表中百分数表示两两克隆的相似度,括弧中的数字表示两两克隆差异的碱基数目。

表 3 SSUrRNA 单核苷酸多态性位点及突变特征

Tab. 3 The characteristic of single nucleotide polymorphism in the region of SSUrRNA sequences

SSUrRNA 克隆	核苷酸变异位点																
	76	103	137	148	192	311	337	434	564	690	821	912	913	924	971	992	1034
C1	T	G	T	A	T	A	T	A	G	G	A	T	T	A	A	C	A
C2	A	G	T	A	G	A	T	A	A	A	A	T	T	A	A	C	A
C3	A	G	T	A	T	A	C	A	A	G	A	T	A	A	A	T	G
C4	A	A	C	G	T	T	T	G	A	G	A	T	T	A	A	C	A
C5	A	G	T	A	T	A	T	A	A	G	A	A	C	T	G	C	A
<i>N. bombycis</i>	A	G	T	A	T	A	T	A	A	G	G	T	T	A	A	C	A
<i>N. spodopterae</i>	A	G	T	A	T	A	T	A	A	G	A	T	T	A	A	C	A

注:表中加粗字母表示在该位点的突变核苷酸。

将测序获得的 SSUrRNA 序列与已报道的微孢子虫 SSUrRNA 序列一起构建了系统进化树(图 2),结果显示以 *Encephalitozoon* 为外群,*Nosema* 属的微孢子虫可以分为两大进化类群 *Nosema* Group I 和 *Nosema* Group II,与过去的报道相一致^[21]。同时本研究所调查的疑似微孢子虫被归类于 *Nosema* Group I,且与同属于 Group I 的 *N. bombycis*、*N. spodopterae* 亲缘关系紧密。blast 序列对比发现梨花迁粉蝶微孢子虫与 *N. bombycis*、*N. spodopterae* 的 SSUrRNA 序列仅有 2~6 个碱基的差异,相似性则达到 99.51%~99.84%(表 2、表 3)。表明梨花迁粉蝶中分离得到的微孢子虫属于 *Nosema* 属,本研究将之命名为 *Nosema* sp. CP。值得一提的是,同样寄生于粉蝶科的菜粉蝶微孢子虫 *Nosema* sp. MPr 却归类于 Group II,暗示着宿主之间的亲缘关系与微孢子虫之间没有正相关性。

2.3 α -tubulin 基因序列分析结果

进一步将 *Nosema* sp. CP 的 α -tubulin 基因进行 PCR 扩增、测序,获得的 2 条 α -tubulin 序列长度均为 532 bp。核酸序列相似性比较发现,*Nosema* sp. CP 与 *N. bombycis* 的 α -tubulin 基因序列相似性达到 98%,共有 11~12 个碱基的差异;与 *N. spodopterae* 的 α -tubulin 基因序列相似性达到 97%,有 13~16 个碱基的差异。 α -tubulin 基因系统进化分析显示(图 3),*Nosema* sp. CP、*N. bombycis*、*N. spodopterae* 和 *Nosema* sp. PX1 聚类于同一进化枝,均为 *Nosema* 属微孢子虫成员,这一结果与 SSUrRNA 的系统进化分析结果相一致。更进一步比较发现,*Nosema* sp. CP 与 *N. bombycis* 的亲缘关系比 *Nosema* sp. CP 与 *N. spodopterae* 或 *Nosema* sp. PX1 更为接近,暗示了 *Nosema* sp. CP 可能为 *N. bombycis* 的不同亚种。

3 讨论

本研究首次从梨花迁粉蝶微孢子虫分离到一株微孢子虫,并将之命名为 *Nosema* sp. CP,该发现扩大了微孢子虫寄生的宿主范围。通过 SSUrRNA 和 α -tubulin 多克隆序列的进化分析显示,该微孢子虫为 *Nosema* 属,并与 *Nosema* 典型种家蚕微孢子虫(*N. bombycis*)的亲源关系最为接近。值得一提的是,尽管 *Nosema* sp. CP 的宿主与 *Nosema* sp. MPr 的宿主均为粉蝶科,但这两种孢子虫并未展现出在进化上相对其他 *Nosema* 属成员更加紧密地亲源性,这可也同时暗示了微孢子虫与宿主之间没有共进化趋势^[17]。

野外昆虫微孢子虫相互交叉感染及胚种传染的不确定性,使得 *Nosema* 属微孢子虫在进行种群分类鉴定时

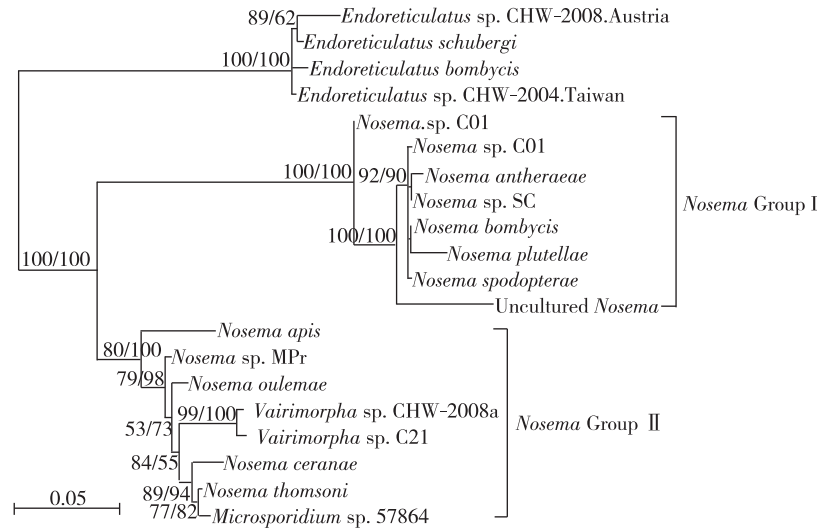


图 2 梨花迁粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 与其他微孢子虫的系统进化分析

Fig. 2 The phylogenetic analysis of SSUrRNA among *Nosema* sp. CP and other species of Microsporidia

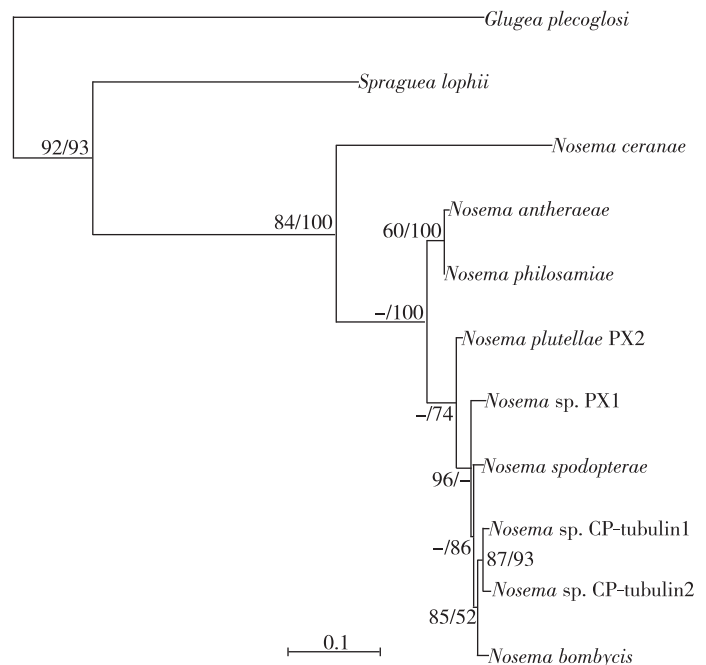


图 3 梨花迁粉蝶微孢子虫 α -tubulin 与其他微孢子虫的系统进化分析

Fig. 3 The phylogenetic analysis of α -tubulin among *Nosema* sp. CP and another species of Microsporidia

复杂性增加。本研究通过两类分子标记的进化分析显示 *Nosema* sp. CP 与家蚕微孢子虫有着最近缘的关系,因此推测之一为, *Nosema* sp. CP 仅仅是家蚕微孢子虫的一个亚种,由于昆虫微孢子虫相互交叉感染宿主而导致。然而当前缺少该微孢子虫更精细的形态和超微结构分析以及更多的分子生物学证据,故尚不能确定 *Nosema* sp. CP 是否是一个新种。总之,本研究首次发现梨花迁粉蝶能够被微孢子虫所侵染,这为野外昆虫微孢子虫的种群多样性调查拓展了新的视野。

参考文献:

- [1] Embley T M, Hirt R P. Early branching eukaryotes[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(6): 624-629.
- [2] Corradi N, Keeling P J. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions[J]. *Fungal Biol Rev*, 2009, 23(1): 1-8.
- [3] Larsson J. Identification of Microsporidia? [J]. *Aeta Protozoologica*, 1999, 38: 161-197.
- [4] 広瀬安春. 昆虫寄生の微孢子虫類について[J]. 蚕糸研究, 1979(111): 118-123.
Hirose H. The Microsporidium in insects. [J]. *Sericultural Research*, 1979(111): 118-123.
- [5] 廖森泰, 方定坚, 郑祥明, 等. 蓝叶甲微孢子虫的特性及其对家蚕病原性研究[J]. 华南农业大学学报, 1992, 13(4): 53.
Liao S T, Fang D J, Zheng X M, et al. The characteristics of a microsporidia from *Phyllobrotica Baly* and pathogenic research in silkworm. [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 1992, 13(4): 53.
- [6] 郑祥明, 邹宇晓, 黄炳辉, 等. 从甘蓝夜蛾分离的一种微孢子虫生物学特性研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(5): 540-543.
Zheng X M, Zhou Y X, Huang B H, et al. The biological characteristics of a Microsporidia from *Mamestra brassicae* [J]. *Journal of Microbiology*, 2000, 40(5): 540-543.
- [7] 万永继, 刘仁华, 沈佐锐. 寄生于龙眼裳卷蛾的微孢子虫一新种(微孢子虫门, 布雷孢虫科)[J]. 动物分类学报, 2005, 30(2): 291-294.
Wang Y J, Liu R H, Shen Z R. A new Microsporidia isolate from the *Cerace stipatana* Walker (Microsporidia, Nosematidae)[J]. *Journal of Animal Classification*, 2005, 30(2): 291-294.
- [8] 潘慧敏, 崔红娟, 万永继, 等. 菜粉蝶孢子的多样性及对家蚕感染性的初步研究[J]. 四川蚕业, 1999(3): 10-11.
Pan H M, Cui H J, Wan Y J, et al. The diversity analysis of Microsporidium in *Pieris rapae* and pathogenic research in silkworm. [J]. *Sichuan Sericulture*, 1999(3): 10-11.
- [9] 杨琼, 徐兴耀, 卢铿明, 等. 感染菜粉蝶的两种微孢子虫的研究(I)病原形态及对家蚕的病原性[J]. 广东蚕业, 2001, 35(2): 16-19.
Yang Q, Xu X Y, Lu K M, et al. The research of two *Nosema* in *Pieris rapae* and pathogenic in silkworm[J]. *Guangdong Sericulture*, 2001, 35(2): 16-19.
- [10] 孙胜, 宗浩, 杨小蓉. 家蚕微孢子(*Nosema bombycis*)对菜青虫(*Pieris rapae*)的感染与致病性研究[J]. 四川师范大学学报:自然科学版, 2001, 24(1): 69-71.
Sun S, Zong H, Yang X R. The *Nosema bombycis*'s infection and pathogenic research in *Pieris rapae* [J]. *Journal of Sichuan Normal University: Natural Science Edition*, 2001, 24(1): 69-71.
- [11] 亚明, 朱阿华. 怎样防止野外鳞翅目昆虫与家蚕微孢子虫的交叉传染[J]. 广西蚕业, 2003, 40(2): 23-26.
Ya M, Zhu A H. How to prevent the wild Lepidoptera insects and *Nosema bombycis* cross infection. [J]. *Guangxi Sericulture*, 2003, 40(2): 23-26.
- [12] Franzen C, Futerman P H, Schroeder J, et al. An ultrastructural and molecular study of *Tubulinosema kingi* Kramer (Microsporidia: Tubulinosematidae) from *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) and its parasitoid *Asobara Tabida* (Hymenoptera: Braconidae) [J]. *J Invertebr Pathol*, 2006, 91(3): 158-167.
- [13] Gill E E, Fast N M. Assessing the Microsporidia-fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes [J]. *Gene*, 2006, 375: 103-109.
- [14] Sokolova Y Y. Morphology and taxonomy of the Microsporidium *Liebermannia covasacraen* sp. from the grasshopper *Covasacris pallidinota* (Orthoptera, Acrididae) [J]. *J Invertebr Pathol*, 2009, 101(1): 34-42.
- [15] Tsai Y C, Solter L F, Wang C Y, et al. Morphological and molecular studies of a Microsporidium (*Nosema* sp.) isolated from the three spot grass yellow butterfly, *Eurema blanda arsakia* (Lepidoptera: Pieridae) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 100(2): 85-93.
- [16] Chen, D R, Shen Z G, Zhu F, et al. Phylogenetic characterization of a Microsporidium (*Nosema* sp. MPr) isolated from the *Pieris rapae* [J]. *Parasitol Res*, 2012, 111(1): 264-265.
- [17] Xu J S, Zhou Z Y. Improving phylogenetic inference of Microsporidian *Nosema antheraeae* among *Nosema* species with RPB1, α - and β -tubulin sequences[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(46): 7900-7904.
- [18] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal

- X Windows inter face; flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acid Search, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [19] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies; assessing the performance of PhyML 3.0[J]. Syst Biol, 2010, 59(3): 307-321.
- [20] Fries I, Feng F A, da Silva A, et al. *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae) [J]. Eur J Protistol, 1996, 32: 356-365.
- [21] Dong S N, She Z Y, Xu L, et al. Sequence and phylogenetic analysis of SSUrRNA gene of five Microsporidia [J]. Curr Microbiol, 2010, 60(1): 30-37.

Animal Sciences

Phylogenetic Characterization of a Microsporidia *Nosema* sp. CP from Mottled Emigrant (*Catopsilia pyranthe*)

ZHENG Lijin¹, CHEN Shiliang², MA Zhengang¹, XU Jinshan¹, ZHOU Zeyang^{1,3}

(1. College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Sericultural and Apicultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi Yunnan 661101;

3. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In this study, a new sample of Microsporidia was firstly isolated from mottled emigrant, *Catopsilia pyranthe*, in Yunan Mengzi of China. The sequences of small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) and α -tubulin gene were both sequenced to characterize the phylogeny of this new isolate, designed as *Nosema* sp. CP. Phylogenetic analysis of SSUrRNA found that the isolate belong to the *Nosema* clade mainly comprised of *Nosema bombycis*, *Nosema spodopterae*, and is more distantly related to that of *Nosema* sp. MPr. α -tubulin tree further confirm that *Nosema* sp. CP was sistered to that of *N. bombycis*. This is the first report of *Nosema* species exist in *Catopsilia pyranthe* which shows close relationship to *Nosema bombycis*, indicative of species diversity of *Nosema* in Pieridae insects.

Key words: Microsporidia; *Catopsilia pyranthe*; phylogenetic analysis; SSUrRNA; α -tubulin gene

(责任编辑 方 兴)