

一种新的植物花螺原体 (*Spiroplasma*) 的研究*

郭永红 叶旭东 陈永萱 陈泽安

(南京农业大学植保系) (美国 Rutgers 大学植保系)

摘 要

本文首次在国内从植物花表面分离到的一种螺原体 (CCH), 菌体为螺旋状丝状体, 无细胞壁和细胞核, 能通过 $0.22\mu\text{m}$ 孔径的滤膜; 生长需要甾醇. 能利用葡萄糖、果糖、麦芽糖、海藻糖和精氨酸, 不能水解尿素. 细胞蛋白电泳图与其它螺原体明显不同. DNA 中 G+C 含量为 29.15mol%. ELISA 和菌体变形试验中, CCH 与已知的螺原体均无反应. 根据这些结果, 作者初步认为, 螺原体 (CCH) 应为一个新螺原体种或一个新螺原体组的代表.

关键词: 花螺原体, 形态和特性

螺原体是 70 年代才发现的一类原核生物, 其中一些可引起重要的植物和动物病害. 最近, 国内陈永萱等也从蜜蜂上分离到螺原体^[1]. 在迄今发现的螺原体中, 很多是来自植物花表面^[2-4]. 1985 年春季, 我们在江苏田间收集了 23 种植物的花, 分离得到多个螺原体菌株^[5], 其中一个来自小旋花 (*Calystegia hederacea*), 花表面的菌株 (CCH) 在基本特征及血清学等方面与目前世界上已知的所有螺原体均有明显差别, 可能代表一种新的螺原体. 本文就此螺原体与其它螺原体进行了比较研究.

一、材料和方法

1. 菌株来源和培养基 螺原体 (CCH) 是 1985 年春季从江苏田间小旋花 (*Calystegia hederacea*) 的花表面分离到的^[5]. 用于比较研究的其它螺原体列于表 1, 由美国农业部 Whittcomb 提供, 保存于美国 Rutgers 大学植保系.

所有菌株均培养于由 C-3G 培养基^[6]改良的 R-2 培养基, 含有 1.5% (w/v) PPLO broth, 10% (w/v) 蔗糖和 15% (v/v) 马血清.

2. 形态观察 常规检查利用暗视野显微镜^[1], 电子显微镜检查方法参见文献[7].

3. 过滤性 处于对数生长期的 CCH 培养菌液, 分别通过孔径为 0.45, 0.30 和 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤膜, 取 $10\mu\text{l}$ 滤出液, 接种到 2ml R-2 培养基中, 30°C 下培养 2—3 天, 观察培养基颜色变化, 并用暗视野显微镜观察有无螺原体生长.

本文 1989 年 3 月 8 日收到, 1989 年 4 月 22 日收到修改稿.

* 国家青年自然科学基金资助; 本研究部分工作在美国 Rutgers 大学植保系进行.

表 1 试验所用的螺原体组和株系

学名或普通名称	组或亚组	株 系	ATCC 编号
<i>Spiroplasma citri</i>	I-1	Maroc (R _s A ₂)	27556
<i>S. melliferum</i>	I-2	AS576	29416
<i>S. kunkelii</i>	I-3	I-747	29051
277F 螺原体	I-4	277F	29761
蟪象螺原体	I-5	LB-12	33649
Maryland 螺原体	I-6	M55	33502
Cocos 螺原体	I-7	N525	33287
<i>S. phoeniceum</i>	I-8	P40	43115
<i>S. floricola</i>	III	23-b	29989
<i>S. apis</i>	IV	B31	33834
		SKJ	33095
<i>S. mirum</i>	V	SMCA	29335
<i>Ixodes</i> 螺原体	VI	Y32	35835
<i>Monobia</i> 螺原体	VII	MQ-1	33825
<i>Syphid</i> 螺原体	VIII	EA-1	33826
<i>Cofinus</i> 螺原体	IX	CN-5	33827
<i>S. culicicola</i>	X	AES-1	35112
<i>Monobia</i> 螺原体	XI	MQ-4	35262
黄瓜蚜虫螺原体	XII	DU-1	43210
<i>Ellychnia</i> 螺原体	XIV	EC-1	43212
叶蝉螺原体	XV	I-25	43262
<i>Cantharis</i> 螺原体	XVI	CC-1	43207
鹿蝇螺原体	XVII	DF-1	43209
<i>Tabanid</i> 螺原体	XVIII	TN-1	43211
萤火虫螺原体	XIX	PUP-1	43206

4. 生长温度和生化试验 方法参见文献[8].

5. 甾醇对生长的影响 方法参见文献[9]并加以改进。所用基本培养基是无马血清的 R-2 培养基,加入 0.5% 白蛋白 (albumin), 0.001% 软脂酸和 0.01% Tween 80; 胆固醇溶于 95% 乙醇中。所有试剂均经孔径 0.30 μm 滤膜过滤灭菌。取 10 μl 处于对数生长期的 CCH 菌液分别接种于 2ml 含有 1, 5, 10 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4 种胆固醇浓度的基本培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养。待培养基颜色变黄后, 取出 10 μl 转移到 2ml 含同样浓度胆固醇的基本培养基中, 如此重复 3 次以上, 以确定螺原体能否生长, 并用暗视野显微镜观察证实。R-2 培养基和无胆固醇的基本培养基分别作为正、负生长对照。毛地黄皂苷 (Digitonin) 对 CCH 生长抑制试验方法参见文献[8].

6. 酶标免疫吸附试验 (ELISA) 本试验采用 Lin 和 Chen 的方法^[10]。小白鼠腹水抗体制备参见文献[11]; 免疫抗血清制备参见文献[12]。包被抗原浓度均为每毫升 10 μg 抗原蛋白; 抗体效价及对同源抗原最适工作浓度均通过 ELISA 试验确定。

7. 菌体变形试验 (Deformation test) 方法参见文献[13]。抗体采用 ELISA 试验使用的鼠抗腹水或兔抗血清。

8. 细胞蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE): 蛋白样品制备及电泳方法参见文献[7].

9. DNA 中 G + C 含量测定 DNA 抽提及 T_m 值测定参见文献[7], 用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DNA 作对照.

二、试验结果

1. 形态和培养特征

在 R-2 培养基中 CCH 生长很快, 接种 26h 后, 生长量可达 10^9 细胞/ml; CCH 在 25—37℃ 范围内均可生长, 30℃ 下生长最好. CCH 是运动的、螺旋状丝状体; 菌体直径 160nm; 菌体周围仅有一层单位膜所包围, 无细胞壁和细胞核(图 1 和 2); 在含 0.8% 琼脂的 R-2 培养基上, CCH 形成扩散状菌落, 有时周围还有小的卫星菌落; 当琼脂浓度增至 2.5% 时, 菌落呈颗粒状.

2. 过滤性

CCH 能通过孔径 0.45, 0.30 和 0.22 μ m 的微孔滤膜.

表 2 胆固醇对 CCH 生长的影响

	CCH 生长量(细胞数/ml)			
	1 天	2 天	3 天	4 天
无血清 R-2 培养基	N*	N	N	N
B**	N	N	N	N
B + 1 μ g/ml 胆固醇	N	10^7	4×10^7	10^8
B + 5 μ g/ml 胆固醇	N	4×10^7	10^8	10^8
B + 10 μ g/ml 胆固醇	10^7	2×10^7	8×10^7	10^8
B + 20 μ g/ml 胆固醇	N	4×10^7	10^7	10^7
R-2 培养基	10^8	10^8	10^9	10^9

* N 表示无生长.

** B 表示无血清 R-2 培养基 + 0.5% 白蛋白 + 0.001% 软脂酸 + 0.01% Tween80.

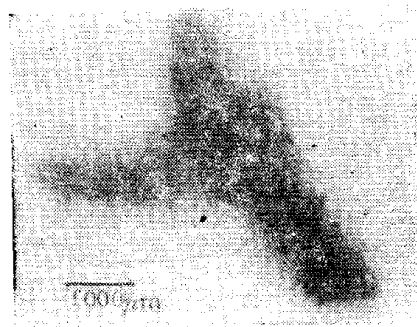


图 1 CCH 螺旋状菌体
(2% 磷钨酸负染)



图 2 CCH 菌体超薄切片电子显微镜照片
(2.5% 醋酸铀和 2% 柠檬酸铅染色; 箭头所示细胞单位膜)

表 3 酶标免疫吸附试验 (ELISA)

株 系	O.D. ₄₉₂		
	同源反应	CCH 抗原与异源抗体	CCH 抗体与异源抗原
Maro(R ₈ A ₂)	0.295	0.018	0.001
AS 576	0.235	0.008	0.004
I-747	0.189	0.025	0.006
LB-12	0.237	0.013	0.002
23-6	0.198	0.008	0.020
SR3	0.216	0.006	0.009
AES-1	0.240	0.021	0.012
EC-1	0.269	0.028	0.010
CCH	0.293	—	—
227F	—	—	0.005
M55	—	—	0.004
N525	—	—	0.005
P40	—	—	0.008
DF-1	—	—	0.009
B31	—	—	0.011
SMCA	—	—	0.008
Y32	—	—	0.008
MQ-1	—	—	0.008
EA-1	—	—	0.011
CN-5	—	—	0.012
MQ-4	—	—	0.010
DU-1	—	—	0.015
I-25	—	—	0.014
CC-1	—	—	0.006
TN-1	—	—	0.012
PUP-1	—	—	0.009

3. 生化试验

CCH 能利用葡萄糖、果糖、麦芽糖、海藻糖,不能利用甘露糖、木糖、鼠李糖、墨角藻糖、松三糖、山梨醇和甘露醇;对精氨酸的利用能力较弱;不能分解尿素。

4. 甾醇对生长的影响

试验结果见表 2。在无马血清 R-2 培养基和无胆固醇的基本培养基中, CCH 均不能生长;当培养基中胆固醇浓度为 1—20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, CCH 均能生长,并以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 生长最好。Digitonin 对 CCH 生长有明显的抑制作用,生长抑制圈距离为 11.0mm。

5. 酶标免疫吸附试验 (ELISA)

当包被抗原浓度相同时,利用 ELISA 可明显检测出 CCH 与其它螺原体之间的差别(表 3)。在 ELISA 试验中, CCH 与柑桔僵化病螺原体 (R₈A₂)、蜜蜂螺原体(AS576)、玉米矮化病螺原体 (I-747)、花螺原体 (23-6 和 SR-3)、蚊虫螺原体 (AES-1)、蜡象螺原体 (LB-12) 和 Ellychnia 螺原体 (EC-1) 无任何血清学反应;在单向 ELISA 中, CCH 的抗体也与所有其它 25 个螺原体无任何反应。

表 4 菌体变形试验

抗体 抗原	R ₆ A ₂ (AS)*	AS576 (AS)	I-747 (AS)	LB-12 (AA)**	23-6 (AS)	SR-3 (AS)	AES-1 (AA)	EC-1 (AA)	CCH (AA)
R ₆ A ₂	4096	nd***	1024	nd	0	0	nd	8	0
AS576	nd	4096	2048	nd	0	0	nd	0	0
I-747	nd	nd	8192	nd	0	0	nd	0	0
LB-12	nd	nd	0	8192	0	0	nd	0	0
23-6	nd	nd	0	nd	2048	0	nd	0	0
SR-3	nd	nd	0	nd	0	4096	nd	0	0
AES-1	nd	nd	0	nd	0	0	1024	8	0
EC-1	nd	nd	nd	nd	0	0	nd	8192	0
CCH	0	0	0	0	0	0	0	8	8192

* AS 为兔抗血清, ** AA 为鼠抗腹水, *** nd 为未做.

6. 菌体变形试验

结果见表 4, 表明 CCH 与所有其它螺原体均无血清学关系.

7. 细胞蛋白 PAGE

CCH 及其它 7 种螺原体的 PAGE 见图 3. 可以看出, CCH 与所有其它的螺原体明显不同, 这与血清学试验结果是一致的.

8. DNA 中 G + C 含量

溶解温度 (T_m) 法测定 CCH 的 DNA 中 G + C 含量为 29.15 mol%; 对照大肠杆菌为 52.17mol%.



图 3 CCH 和其它 8 个螺原体株系细胞蛋白 PAGE 比较
(1—R₆A₂, 2—As576, 3—CCH, 4—I-747, 5—LB-12, 6—23-6,
7—SR3, 8—CCH, 9—EC-1, 10—AES-1)

三、讨 论

由于 CCH 是无壁的原核生物、抗青霉素,并能通过 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜,它应属于柔膜菌纲 (Mollicutes)^[14]; CCH 具有螺旋状的菌体形态,生长需要提供甾醇及 DNA 中 G+C 含量较低,因此可将它归于螺原体科 (Spiroplasmataceae) 和螺原体属 (Spiroplasma)^[15-17]。本文结果表明, CCH 与迄今所知的 23 个组(种)的螺原体均无血清学关系,同时在细胞蛋白 PAGE 等特性方面也有明显差别。因此,作者认为, CCH 是一个螺原新种或者是一个新螺原体组的代表。CCH 也是在国内分离到的第一个螺原体新种。

迄今,全世界已从各种场所分离到多种螺原体^[12,18,19]。最近,陈永萱等从蜜蜂中分离到引起春季蜜蜂大量死亡的螺原体^[1],从而在国内首先发现了螺原体的存在。但是经过鉴定,它是第 I 血清组 I-2 亚组的一个成员。本文报道的螺原体 CCH,则是国内首次从植物花表面分离到的第一个螺原体新种(组);在分离 CCH 的同时,我们还从其它植物花表面分离到多个螺原体菌株,而且均属 I-2 亚组^[9]。因此,与世界其它地区一样,国内田间植物的花在螺原体与昆虫之间的传播可能起着媒介作用。但是这些来源于植物花表面的螺原体,包括 CCH,是否与植物或昆虫病害有关,仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Chen, Y. X. (陈永萱) et al., *Scientia sinica Series B.*, 31(1988), 1073—1079.
- [2] Davis, R. E., *Can. J. Microbiol.*, 24(1978), 954—959.
- [3] Davis, R. E., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31(1981), 456—464.
- [4] Raju, B. C. et al., *Can. J. Microbiol.*, 27(1980), 249—254.
- [5] Ye X. D. (叶旭东), *Study on Biology of Flower Spiroplasmas in China*, Master Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing, China, 1987.
- [6] Liao, C. H. & Chen, T. A., *Phytopathol.*, 67(1977), 802—807.
- [7] Hung, S. H. Y. et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37(1987), 365—370.
- [8] Aluotto, B. B. et al., *ibid.*, 20(1970), 35—38.
- [9] Raxin, S. & Tully, J. G., *J. Bacteriol.*, 102(1970), 306—310.
- [10] Lin, C. P. & Chen, T. A., *Phytopathol.*, 75(1985), 848—851.
- [11] Chen, C. S. & Chen, T. A., *ibid.*, 70(1980), 279—282.
- [12] Whitcomb, R. F., *Ann. Rev. Microbiol.*, 34(1980), 677—709.
- [13] International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 29(1979), 172—180.
- [14] Edward, D. G., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 17(1967), 267—268.
- [15] Saglio, P. et al., *ibid.*, 23(1973), 191—204.
- [16] Skripal, I. G., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33(1983), 408.
- [17] Williamson, D. L. et al., *Curr. Microbiol.*, 1(1978), 203—207.
- [18] Whitcomb, R. F., *Ann. Rev. Entomol.*, 26(1981), 397—425.
- [19] Bove, J. M., *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22(1984), 361—396.