

海带叶卷病类支原体的分离培养

王祈楷 史春霖 马俊才

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从海带叶卷病的病组织中分离培养出类支原体, 在主要由葡萄糖、猪肺、猪脑浸提液、鲜酵母浸液和马血清等组成的液体培养基中, 转管培养已持续了半年余。

前文报道从具有明显症状的海带叶卷病病海带中提取到类支原体(MLO), 病海带的超薄切片中也观察到这种MLO^[1]。此外, 还证明四环素族抗生素有明显抑制发病作用^[2], 因而认为海带叶卷病是由这种MLO引起的。为了按照Koch's原则确证叶卷病MLO的病原性, 并对这种微生物作进一步的研究, 都需要对它进行分离培养。用无细胞合成培养基来分离培养MLO目前还是一个不易解决的难题, 迄今从病植物中分离培养的都是些螺原体^[3]。我们试用了几种无细胞合成培养基对海带叶卷病MLO进行了分离培养, 用我们配制的01号液体培养基从病海带中分离培养出这种MLO, 并能转管培养, 其形态结构特点与先前从病海带中提取的和超薄切片中观察到的MLO是一致的。

(一) 培养基中某些组分的制备

1. 胰浸液: 将新鲜猪胰脏剔除脂肪后绞碎, 按每100g猪胰脏加300ml新制备的无离子水, 0.4 ml HCl 和 100ml 酒精, 室温下放置3天, 每天搅拌3—4次, 滤纸过滤, 滤液备用。

2. 25% 酵母浸出液: 250g 新鲜面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)用蒸馏水悬浮、离心洗涤, 倾去上清, 沉淀加1000ml 无离子水, 充分悬浮, 加热搅拌至沸腾30分钟, 冷却后4500rpm离心30分钟, 弃去沉淀, 上清分装于500ml三角瓶

中, 蒸汽消毒, 8磅30分钟, 备用。

3. 猪肺汤: 新鲜猪肺剔除脂肪后绞碎, 每1000g肺组织加1655ml 无离子水, 加热至80℃加入Na₂CO₃到pH9左右(约8.5g), 冷却后冰箱过夜。加HCl调到pH8, 加上上述胰浸液50至60ml, CHCl₃ 33ml, 搅匀, 微火加热到45℃60分钟, 细尼龙纱布滤去渣滓, 滤液加热至沸15分钟, 冷却后4200rpm离心20—30分钟, 取上清, 蒸汽灭菌8磅30分钟, 备用。

4. 脑浸液: 取新鲜猪脑100克绞碎后加200ml 无离子水, 加热至48—50℃, 搅拌30分钟, 4200rpm离心25分钟, 上清蒸汽灭菌, 8磅30分钟, 备用; 沉淀加100ml 酒精搅匀, 冰箱过夜。78℃回流2小时, 5500rpm离心25分钟, 上清置烧杯中在80℃水浴中使酒精蒸发浓缩到原来体积的60%左右, 置冰箱备用。

(二) 01号培养基的配制

猪肺汤245ml, 25% 酵母浸液50ml, 脑水浸液50ml, 脑乙醇浸液50ml, 葡萄糖5克, 甘露醇36.4g, 酚红10mg, 混匀后, 分装三角瓶内, 蒸汽灭菌8磅30分钟; 无菌操作加入健康马血清100ml(经G5细菌过滤器过滤, 56℃40分钟); 青霉素(10万单位/

本文于1981年4月3日收到。

农业部兽医药品监察所李阳龙同志热心协助, 河北省农林科学院吕黎果树研究所张金歧同志协助部分工作, 辽宁省海洋水产研究所薛真福同志提供病海带, 特志谢忱。

ml) 5ml。

(三) MLO 的分离培养

将病海带洗净,切成约 6 mm 长、2—3 mm 宽的小块,在 15% 的安替福民溶液中表面消毒 0.5 至 1 分钟,无菌水冲洗后置于经过 15 磅 30 分钟灭菌的、 1×10 cm 的试管中,加入 01 号培养基 5ml,用灭过菌的白色橡皮塞封紧。以不加病海带的培养液为空白对照。全部过程在接种室内按无菌操作进行。在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 静止培养,5 月 13 日开始,至第 7 天试管底部培养液由红变黄(酚红遇酸变黄),第 8 天由试管底部到中部都已变黄,上半部培养液仍为红色,培养液保持澄清而不混浊。电镜检查有大量 MLO,见图版 I-1, 2。将培养的 MLO 进行转管培养时,不慎污染了细菌,未能成功。随后,又从大连采回病海带进行第二次分离培养,于 5 月 30 日开始,培养到第 5 天,试管底部培养液开始变黄,吸取 0.1ml,接种到装有同样培养液的小试管中进行转管培养,3 天后培养液又变黄,但仍保持澄

清。电镜检查表明组织分离管和转管培养管内都有 MLO。转管培养管内 MLO 的数量比组织分离管内显著增多。7 月 17 日进行了第 3 次分离培养,时值盛夏,室温较高,培养温度 $26-28^\circ\text{C}$ 。病组织块在培养基中培养 4 天后开始转管培养,培养液变黄后电镜检查,与第二次分离培养的情况一样,经过转管培养后 MLO 数量增多。第三次的分离培养物已持续培养了 6 个月。图版 I-3, 4 示经过转管培养出来的 MLO。上述结果表明用 01 号培养基可以分离培养出海带叶卷病 MLO,并能转管培养。这一初步结果,无疑将为深入研究海带叶卷病的 MLO 提供有利基础。

参 考 文 献

- [1] 王新楷等: 中国科学, **6**: 587—591, 1980。
- [2] 汪克贤等: 微生物学报, **20** (2): 216—218, 1980。
- [3] Nienhaus, F. and A. Sikora: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **17**: 37—58. 1979.

ISOLATION AND CULTIVATION OF MLO ASSOCIATED WITH COILING-STUNT DISEASE OF SEA TANGLE

Wang Qikai Shi Chunlin Ma Juncai

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The mycoplasma-like organism (MLO) associated with the coiling-stunt disease of sea tangle (*Laminaria japonica*) was isolated and cultivated in vitro. With the liquid medium consisting mainly of glucose, extracts

from lung and brain of pig, extract of fresh yeast, and horse serum, the MLO in question has been subcultured for more than 6 months.