

海带种株及叶卷病海带孢子中提取到的类支原体

史春霖 马俊才 王祈楷

(中国科学院微生物研究所, 北京)

薛真福

(辽宁海洋水产研究所, 大连)

用 0.01 M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.6) 抽提海带种株和叶卷病海带孢子, 匀浆先经差速离心, 然后经蔗糖密度梯度离心进一步纯化, 收集等体积 (1.5ml) 分部, 在波长 260nm 测各分部的紫外吸收, 收集呈峰的各分部, 合并, $50,000 \times g$ 离心 1 小时再浓缩 MLO。电镜观察表明, 两种抽提物中均存在一定量的 MLO。讨论了在侵染循环和防治实践上的意义。

已有报道证明^[1,2], 在我国旅大沿海地区发生的海带 (*Laminaria japonica* Aresch) 叶卷病是由类支原体 (Mycoplasma-Like organism) 引起的。

为了探索海带叶卷病病原体的传播途径, 为叶卷病的防治提供依据, 我们从外观正常的海带种株及病海带孢子中进行了 MLO 的提取。

材料和方法

(一) 从外观正常的海带种株提取 MLO

基本上按王祈楷^[1]等方法进行, 但略有改进。取海带种株, 洗去表面污物, 沥去水分, 称取 1000g (鲜重), 用绞肉机绞碎, 加 1500ml 0.01M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.6), 在国产 DS-200 高速组织捣碎机中捣碎, 用双层尼龙纱布榨取汁液, 汁液中加入从鲍鱼 (*Haliotis discus* Hannai) 肝脏提取的鲍鱼酶冷冻干粉 (2mg 酶粉/1ml 榨取汁液), 加入 KCl 使最终浓度为 0.02M, 置 37℃ 水浴中保温 14 小时, 以降解海带组织液中的褐藻胶和糖胶。在整个保温酶解期间, 样品瓶上接一回流冷凝管, 避免水分蒸发和浓缩。保温结束后, 以冷水冷却。用 MSE18 型离心机, $9,000 \times g$ 离心 30 分钟, 取上清用 Vac601 超速离心机, $50,000 \times g$ 离心 1 小时, 弃去上清, 加少量缓冲液置玻璃匀浆器中研碎沉淀块使成悬液, 用 3K 离心机,

$7,000 \times g$ 离心 15 分钟, 弃沉淀, 上清含部分提纯的 MLO。

用蔗糖密度梯度离心法进一步纯化 MLO 制备物。用上述缓冲液配制 40%, 30%, 20%, 10% 浓度的蔗糖液, 依次铺层在 35ml 离心管中, 40%, 30%, 20% 蔗糖液均为 8ml, 10% 蔗糖液为 6ml, 置冰箱过夜后, 取 1ml 部分提纯的 MLO 制备物铺于梯度顶部, $50,000 \times g$ 离心 1 小时。按每一分部 1.5ml 取样, 在波长 260nm 测各分部的紫外吸收值, 然后合并呈现吸收峰的各分部, 再经 $50,000 \times g$, 离心 1 小时, 弃上清, 沉淀悬浮于缓冲液中, 用 3K 离心机, $7,000 \times g$ 离心 15 分钟, 弃去不溶物, 上清即提纯的 MLO。

(二) 从病海带孢子中提取 MLO

将从大连采得的叶卷病海带游动孢子 (连同海水) 放入盛有玻璃片的烧杯中, 使孢子附着在杯壁和玻片上, 置于有光照的低温室中 (8℃ 左右), 使孢子萌发成无胞壁的胚孢子, 以利于从中提取 MLO。将胚孢子的海水悬液, 经 MSE18 型离心机, $7,000 \times g$ 离心 20 分钟, 弃去上清, 得湿重胚孢子 5.5g, 在玻璃匀浆器中匀浆后, 提取 MLO。提取方法与上同, 但省去鲍鱼酶酶解步骤。

(三) 电子显微镜观察

按常规方法制备覆有 Formvar 膜的样品载网, 取上述两种 MLO 提取物, 在载网支持膜上点

本文于 1981 年 4 月 3 日收到。

样, 用滤纸吸去多余的样品, 2% 磷钨酸染色, 俟干燥后, 置日立 H-500 电镜下观察。

结果和讨论

1979 年, 曾从外观正常的海带种株中提取 MLO, 但在电镜下没有观察到 MLO, 可能是因为所用试验材料较少之故 (每批 100—200g)。今年, 我们所用试验材料较多 (1000g 种株), 部分提纯后, 再经蔗糖密度梯度离心进一步纯化。对 260nm 测紫外吸收, 第 4, 5, 8—12, 和 24 管分布通常呈现紫外吸收峰, 用电镜检查在波长 260nm 呈现紫外吸收峰的各分部 50,000 ×g 离心收集物, 结果表明, 呈现峰的各分部中存在 MLO, 不呈现峰的各分部中没有 MLO 或极少。说明利用对 260nm 波长测紫外吸收来检测各分部中是否存在 MLO 的方法是可行的。

呈现紫外吸收峰的各分部合并后, 50,000 ×g 离心 1 小时收集所得制品, 电镜观察表明, 不论是外观正常的海带种株, 还是病海带孢子中均存在一定量的 MLO (图版 I)。MLO 呈多形性, 有的为圆形, 有的为带缢痕的丝状体, 与柑桔僵化病病原体相似^[3,4], 加之我们已能初步分离培养 (结

果见另文), 所以海带叶卷病病原 MLO, 很可能是一种螺旋原体 (*Spiroplasma*) 至于形态的大小不一, 这和个体 MLO 各自所处的发育阶段有关。

我们的结果指出, 我国沿海地区人工养殖海带发生的叶卷病, 其病原体有可能通过某些外观正常的海带种株产生的孢子, 传到下一代海带藻体中。调查中曾发现凡由大连(病区)引进种株养殖海带的地区都发生过这种病害, 而无病区海带种株繁殖的海带则很少发病。看来海带种株的带病是一个值得重视的问题。

为了预防海带叶卷病的发生和传播, 应当重视病区海带种株的检疫工作。在病害严重发生的海域或年份, 从无病海区调进种株或幼苗作繁殖材料是可取的。1981 年从无病区调进种株繁殖海带, 病害已大为减轻。

参 考 文 献

- [1] 王祈楷等: 中国科学, 6: 589—591, 1980.
- [2] 汪克贤等: 微生物学报, 20 (2): 216—218, 1980.
- [3] Fudl-Allah, A. E. A. et al.: *Phytopathology*, 64: 1309—1313, 1974.
- [4] Garnier, M., et al., *J. Bacteriol.*, 147: 642—652, 1981

MLO PURIFIED FROM THE MATURED FRONDS OF SEA TANGLE WITH NORMAL APPEARANCE AND THE SPORES OF DISEASED ALGA WITH DISTINCT SYMPTOMS OF COILING-STUNT

Shi Chunlin Ma Juncai Wang Qikai

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Xue Zhenfu

(Liaoning Institute of Marine and Aquatic Products, Dalian)

MLO was purified from the matured fronds of sea tangle with normal appearance and from the spores of diseased alga with distinct symptoms of coiling-stunt. It was accomplished by extraction, differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation, after density gradient centrifugation, aliquots of 1.5 ml were collected

and their ultraviolet absorbance at 260 nm (A_{260}) were measured. The fractions with the peak value of A_{260} were pooled and the MLO was reconcentrated by centrifugation at $50,000 \times g$ for 1 hour. Electron microscopic observation indicated that MLO were present in both samples.