

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(10):1366–1372; 4 October 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 分离自蜜蜂 (*Apis mellifera*) 的三株螺原体的基本特性

回丽静, 钟志平, 胡冰, 杨冰, 纪燕玲, 于汉寿\*

(南京农业大学, 农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】调查我国蜜蜂螺原体的种类, 研究它们的基本生物学特性, 初步确定其分类地位, 为研究螺原体在自然界中的传播途径提供依据。【方法】螺原体的分离、培养方法, 应用暗视野显微镜和透射电子显微镜观察螺原体形态, 运用分子生物学方法(选 16S rDNA、ITS、*rpoB* 基因进行系统发育分析)和血清学方法(生长抑制试验、代谢抑制试验、菌体变形试验)研究螺原体分离菌株可能的分类地位。【结果】从健康的意蜂(*Apis mellifera*)体内分离到 3 株螺原体 MF0903、MF0904、MF0905。3 株螺原体都呈典型的螺旋状, 但菌株 MF0905 的菌体短小, 螺旋数较少; MF0903 和 MF0904 菌落呈规则的圆形, MF0905 菌落近圆形、较大; 它们都能利用葡萄糖、D-果糖作为碳源, 不能利用尿素; 菌株 MF0903、MF0904 能强烈代谢精氨酸、不能利用蔗糖作为碳源, 而 MF0905 不能代谢精氨酸、能利用蔗糖作为碳源; 根据 16S rDNA、ITS、*rpoB* 基因序列构建系统发育树显示, 分离菌株 MF0903、MF0904 与 *Spiroplasma melliferum* 聚类较近, 而 MF0905 与 *Spiroplasma clarkii* 聚类较近。生长抑制试验、代谢抑制试验、菌体变形试验结果均表明标准菌株 *Spiroplasma melliferum* CH-1 的抗血清对菌株 MF0905 没有抑制作用, 而能抑制菌株 MF0903 和 MF0904 生长。【结论】分离菌株 MF0903、MF0904 属于 *Spiroplasma melliferum*, 而 MF0905 可能是 *Spiroplasma clarkii*, 这表明我国蜜蜂中存在的螺原体不仅仅是 *Spiroplasma melliferum*。

**关键词:** 螺原体; 蜜蜂; 生物学特性; 系统发育分析; 血清学

**中图分类号:** Q938      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1366-07

微生物广泛存在生物体内包括动物、植物等, 并和它们产生密切联系。微生物与宿主之间的作用是多种多样的, 包括互生、寄生等, 尤其是昆虫, 它们与细菌形成多种内共生关系<sup>[1]</sup>。蜜蜂是自然界中最主要的授粉昆虫, 它不仅给人类提供了丰富的蜂产品, 而且对维持生物多样性有重要作用。广泛的调查发现蜜蜂体内存在一种可遗传的内共生细菌——螺原体<sup>[2–4]</sup>。

螺原体是一种个体极小(直径约为 100–250 nm)、螺旋状、无细胞壁的细菌。它能独立生活和自我复制, 它的基因组非常小(780–2220 kb)<sup>[5]</sup>。螺原体没有细胞壁和鞭毛, 仅靠单层膜包裹整个细

胞, 常作为研究运动的模式生物<sup>[6–7]</sup>。在农业上, 螺原体是重要的植物致病菌, 它能引起玉米矮化病(*Spiroplasma kunkelii*)、柑桔僵化病(*Spiroplasma citri*)<sup>[8]</sup>; 螺原体也广泛存在节肢动物体内, 它对节肢动物的作用表现为多样化: 有的和宿主互利共生; 有的能导致宿主性比紊乱, 例如导致果蝇性比失调的 *S. poulsonii*<sup>[9]</sup>; 还有的能导致宿主致病, 例如导致虾蟹颤抖病(*S. eriocheiris*)<sup>[10]</sup>、蜜蜂爬蜂病(*S. melliferum*)和“五月病”(*S. apis*)<sup>[2–3]</sup>等。导致蜜蜂致病是由于螺原体能穿过蜜蜂的中肠屏障到达淋巴组织, 并在淋巴组织内大量繁殖从而使蜜蜂死亡<sup>[3, 11]</sup>。然而, 在近两年, 本实验室从大量健康蜜蜂

基金项目: 国家自然科学基金(30870002)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84395531; E-mail: yuhans@njau.edu.cn

作者简介: 回丽静(1984–), 女, 河北人, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源与分子生态。E-mail: huilijing@126.com

收稿日期: 2010-04-02; 修回日期: 2010-05-20

体内分离到螺原体,有些螺原体菌株对蜜蜂并无致病性,那么这些螺原体对宿主产生什么作用?除 *Spiroplasma melliferum* 外,我国的蜜蜂中是否还存在其它种类的螺原体?蜜蜂螺原体在自然界中又是怎样传播?

为了进一步弄清以上问题,本研究对分离自意大利蜜蜂的3株螺原体进行了形态、基本生理生化特性、生长曲线、血清学、分子生物特性等方面的研究,初步确定其分类地位,为进一步研究我国蜜蜂螺原体病的侵染循环提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**供试3株螺原体菌株 MF0903、MF0904、MF0905 都分离自健康的意大利蜜蜂(*Apis mellifera*),其中菌株 MF0903、MF0905 的宿主采自南京,菌株 MF0904 的宿主采自江苏句容。所有菌株的宿主都是在2009年4、5月间采集。*Spiroplasma melliferum* CH-1 作为对照。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**牛心浸出液冻干粉(PPLO)购自Sigma公司;TIANamp Bacteria DNA Kit 购自南京丁贝生物科技有限公司;PCR 扩增所用酶和试剂购自Takara公司。所用暗视野显微镜为Olympus BH-2,倒置显微镜为Olympus Tokyo,透射电子显微镜为Hitachi H7650。

### 1.2 螺原体的分离及纯化

分离所用培养基为R2液体培养基,分离前将蜜蜂表面消毒后取出中肠,分离方法同文献[12]。30℃静置培养;逐日观察培养基颜色变化,并用暗视野显微镜(Olympus BH-2)观察验证,持续观察一个月。梯度稀释法纯化分离菌株。

### 1.3 螺原体的形态及运动性观察

采用负染法用电子显微镜Hitachi H7650观察3株螺原体在生长对数期的形态;用倒置显微镜Olympus Tokyo观察螺原体的菌落形态,并测量其大小,方法同文献[13]。用暗视野显微镜观察分离菌株的运动性。

### 1.4 螺原体的基本生物学特性

**1.4.1 螺原体生长规律的测定:**螺原体生长曲线的测定采用颜色改变单位(CCU)计数方法,同时用暗视野显微镜每6h镜检菌体数及菌体形态变化情况。重复3次。具体方法同文献[13-14]。

**1.4.2 螺原体的生理学特性:**分离菌株的滤过性、对青霉素的抗性、生长是否需要血清、对几种物质的

代谢能力等基本生物学特性的测定方法同文献[13,15]。

### 1.5 螺原体的血清学分析

**1.5.1 抗原及抗血清制备:**将标准 *Spiroplasma melliferum* CH-1 菌株对数生长期菌液离心、洗涤、超声波破碎后,加入等量的 Freund 完全佐剂,制成抗原。采用背部多点注射法免疫新西兰大白兔,每隔一周注射一次,共两次;一个月后耳静脉注射抗原2 mL,一周后心脏采血,制备抗血清, -20℃ 保存备用。

**1.5.2 生长抑制试验:**参照文献[16]的方法,将滴加有抗血清的干燥圆形滤纸片紧贴于已涂布供试菌株的R2固体培养基上,30℃下静置培养,待培养基变黄,测量滤纸片边缘到菌落生长边缘的距离,即生长抑制距离,并用倒置显微镜观察验证。正常兔血清作对照。3次重复。

**1.5.3 代谢抑制试验:**参照文献[17]的方法,将抗血清作2倍连续稀释后,滴入供试菌株培养液,并以不加血清的抗原孔和不加供试菌株的培养基孔作为对照,30℃下静置培养,以对照组培养液颜色为标准,观察含各稀释倍数抗血清的培养孔内培养液颜色变化情况,未发生颜色变化的最高稀释度为代谢抑制试验的抗血清效价。3次重复。

**1.5.4 菌体变形试验:**参照文献[18]的方法,用96孔板进行抗血清二倍梯度稀释后,滴入供试菌株培养液,充分混合后室温下(25℃左右)放置30 min;以不加抗血清孔作为对照。以对照孔菌体形态和数量为标准,在暗视野显微镜下观察,以50%菌体变形的稀释度作为该抗血清的效价,并以效价的差别表示相关螺原体的血清学特性差别。3次重复。

### 1.6 螺原体的系统发育分析

用TIANamp Bacteria DNA Kit提取螺原体的总DNA。以16S-L/16S-R引物PCR扩增16S rDNA序列;以ITS-L/ITS-R引物PCR扩增ITS序列;以 *rpoB*-F/*rpoB*-R引物PCR扩增 *rpoB* 序列<sup>[19]</sup>。扩增产物经电泳检测达到测序要求的直接送交 Beijing Genomics Institute (Beijing) 测序。在 GenBank 中 BLAST 比对。根据比对结果,下载与菌株16S rDNA、ITS、*rpoB* 基因同源并经过菌种鉴定的序列,用 ClustalX 1.8 多重比对,用 MEGA 4.0 采用邻接法构建系统发育树<sup>[20]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 菌株的获得、形态观察及运动性

2009年4、5月份,对采集自3个不同时间、2个

不同地点的 100 多只健康的意大利蜜蜂进行螺原体的分离,结果从蜜蜂的中肠组织中分离到 3 株螺原体 MF0903、MF0904、MF0905。分离菌株采用梯度稀释法纯化 3 次后得到纯菌株。采用负染法观察生长对数期螺原体的形态,在透射电镜下三者均可见丝状螺旋形菌体,其中菌株 MF0905 的菌体短小,螺旋数较少,多数为 4-5 个螺旋。在倒置显微镜下,3

株螺原体菌落形态呈圆形或颗粒状但有明显差别:菌株 MF0903、MF0904 菌落成规则的圆形,有时周围可见卫星菌落,菌落直径约 30 μm-110 μm;菌株 MF0905 由于生长速度较快其菌落较大且不规则,直径约 70 μm-130 μm。3 株螺原体在暗视野显微镜下呈典型的螺旋状且做快速翻滚式运动(图 1)。

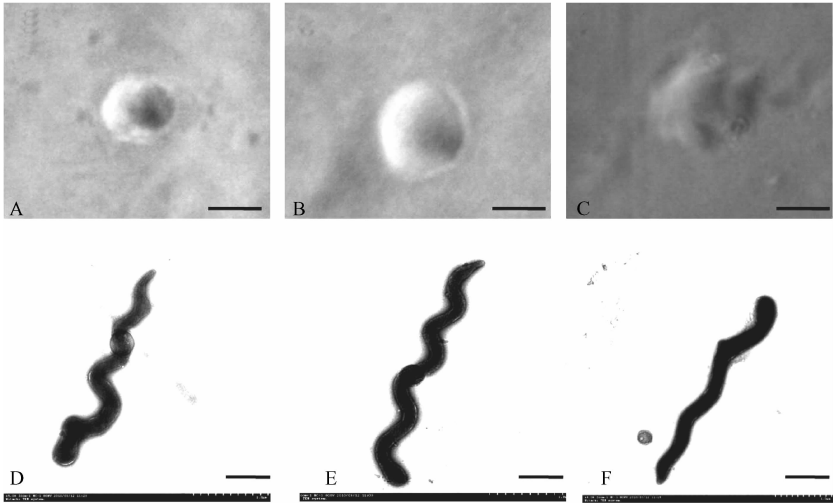


图 1 3 株螺原体的菌落(上)和生长对数期菌体显微形态(下)

Fig.1 Colonies and electron micrograph of spiroplasma isolates MF0903(A, D),MF0904(B, E) and MF0905 (C, F) in the exponential phase. Scale bars: A, B, C: 100 μm; D, E, F: 200 nm.

2.2 分离菌株生长规律

3 株螺原体的生长曲线都分为延滞期、对数期、稳定期、衰亡期 4 个典型的时期(图 2),但在生长过程中达到 4 个生长期的时间不同。延滞期,菌株 MF0905 和 MF0904 需要持续 12 h,而菌株 MF0903 则需持续 36 h,在此阶段菌体量无明显增加;在 12

-36 h 间,菌株 MF0905 和 MF0904 的菌体量呈直线上升,为对数期,而菌株 MF0903 则需 48 h 才能达到对数期;在稳定期,菌株 MF0905 持续时间比较短,很快进入衰亡期,而另两株菌持续时间长;在衰亡期,3 株菌株菌体量明显减少。在用 CCU 计数的同时也伴随着暗视野显微镜镜检验证,与图 2 不同的是菌株 MF0905 24 h 就可以达到生长对数期,且 48 h 后迅速达到衰亡期,菌体变为球状;而菌株 MF0903 和 MF0904 与图 2 基本相同,达到生长对数期需要的时间、稳定期和衰亡期持续的时间都比较长,在衰亡期菌体变得极其细长。

2.3 螺原体分离菌株的生理学特征

3 株菌株在 R2 液体培养基中生长良好,30℃ 下静置培养,菌株 MF0905 仅需 24 h 就可使培养基变黄,而 MF0904 和 MF0903 分别需要 36 h、48 h;都能通过孔径为 0.45 μm、0.22 μm 的微孔滤膜;在含不同单位氨苄青霉素的 R2 液体培养基中都生长良好,说明 3 株菌株对青霉素钠都有抗性;在不含胎牛血清的 R2 培养基中,都不能生长;3 株菌株都能利用葡萄糖、D-果糖作为碳源,不能利用甘露醇、D-半乳糖、L-山梨糖、乳糖,其中菌株 MF0905 能代

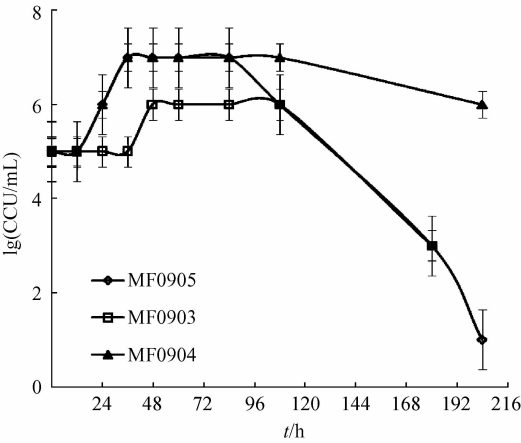


图 2 螺原体分离菌株 MF0903、MF0904、MF0905 在 R2 培养基中的生长曲线(30℃)

Fig. 2 Growth curves of spiroplasma isolates MF0903, MF0904, MF0905 in R2 medium(30℃).

谢蔗糖,另外两株菌则不能;菌株 MF0905 不能代谢精氨酸,而其它两株菌则可以;它们都不能利用尿素。菌株 MF0904 和 MF0903 的这些特性与标准菌株 *S. melliferum* CH-1 完全相同,菌株 MF0905 的特性与实验室已有的菌株 CRW-1 的特性基本相同<sup>[12]</sup>。

2.4 分离菌株的血清学分析

生长抑制试验的测定结果表明:*S. melliferum* CH-1 抗血清对菌株 MF0903、MF0904 有抑制作用形成了明显的抑菌圈,分别为 8.63 mm 和 8.33 mm,而其对菌株 MF0905 没有抑制作用,没有产生抑菌圈。代谢抑制试验和菌体变形试验的测定与生长抑制试验表现一致的结果。在代谢抑制试验中,

*S. melliferum* CH-1 抗血清对菌株 MF0903、MF0904 的代谢有明显抑制作用,而对菌株 MF0905 的代谢没有抑制作用,菌株 MF0905 能在高浓度的抗血清中正常生长;在菌体变形实验中,*S. melliferum* CH-1 抗血清对菌株 MF0903、MF0904 的形态有明显抑制作用,使它们在一定抗体浓度下发生变形,而菌株 MF0905 能在各种抗体浓度下良好生长,菌体很少发生变形。3 个试验的结果都一致表明:菌株 MF0903、MF0904 与标准菌株 *S. melliferum* CH-1 间有血清学关系,它们的亲缘关系较近;而菌株 MF0905 与 *S. melliferum* 间没有血清学关系,它们的亲缘关系较远,菌株 MF0905 是属于独立于 *S. melliferum* CH-1 菌系之外的组群中(表 1)。

表 1 *Spiroplasma melliferum* 抗血清对供试菌株的 3 种血清学方法检测结果

Table 1 Detection results of three serological methods about antibody of *Spiroplasma melliferum* against spiroplasma isolates

Serological test	Spiroplasma isolates			
	<i>S. melliferum</i>	MF0903	MF0904	MF0905
Growth inhibition test ( zones of inhibition ) ( mm )	9.17 ± 1.70	8.63 ± 2.56	8.33 ± 0.98	0
Metabolic inhibition test( titer )	128	128	64	0
Deformation test( titer )	512	256	512	0

2.5 分离菌株的系统发育分析

利用引物分别扩增得到 16S rDNA、ITS、*rpoB* 基因序列,其中 16S rDNA、ITS 序列长度约为 1400 bp, *rpoB* 基因约为 1700 bp。序列提交 GenBank,并进行 Blast 比对,结果显示菌株 MF0905 16S rDNA、*rpoB* 基因都与 *S. chinense* 相似度最高,但其 ITS 序列与 *S. clarkii* 相似度最高;其它 2 株菌 16S rDNA、*rpoB* 基因都与 *S. melliferum* 相似度最高,而其 ITS 序列与 *S. citri* 相似度最高。根据 16S rDNA 序列构建邻接树,发现菌株 MF0905 与 *S. clarkii* 聚为一枝,自展支持率为 97% (图 3)。根据 ITS 序列、*rpoB* 基因构建的系统发育树的拓扑结构和 16S rDNA 的相似。

3 讨论

1976 年在美国 Maryland 州首次发现导致蜜蜂病害的螺原体 *Spiroplasma melliferum*,此后,在法国发现另一种螺原体 *S. apis* 引起蜜蜂“五月病”(May disease)<sup>[2,3]</sup>。我国陈永萱等 1988 年也从患“爬蜂病”的蜜蜂体内分离到 *Spiroplasma melliferum*。除上述致病性螺原体外,我国蜜蜂体内是否还存在除 *Spiroplasma melliferum* 以外的螺原体? 在本研究中,我们从采自 3 个不同时间、2 个不同地点的 100 多只健康的意蜂中分离螺原体,分离前将蜜蜂表面严格消毒后取其腹部中肠,在无菌条件下进行螺原体分离,结果分离到 3 株螺原体 MF0903、MF0904、

MF0905。其中菌株 MF0905 与 *Spiroplasma melliferum* CH-1 相比差异显著,这是首次在我国蜜蜂体内分离到 *Spiroplasma melliferum* 以外的菌株,它们与宿主蜜蜂的关系(包括致病性)正在研究中。

根据螺原体分类标准,本研究从形态学、生物学特性、血清学、分子生物学特性几个方面进行验证,并对 3 株螺原体进行了比较,初步确定它们的分类地位。在形态学方面,3 株螺原体菌体在对数生长期都呈典型的螺旋状,但菌株 MF0905 的菌体较短,螺旋数较少。在固体培养基上,菌株 MF0903、MF0904 菌落成规则的圆形,有时周围可见卫星菌落,而菌株 MF0905 的菌落较大且呈不规则圆形,这可能由于 MF0905 的生长速度较快,菌体量大,在固体培养基中呈蔓延式游动造成的。3 株菌株的基本生物学特性如滤过性、对青霉素的抗性、生长是否需要血清都完全一致,但是在物质的代谢能力方面呈现不同:菌株 MF0905 能代谢蔗糖和不能利用精氨酸,而菌株 MF0903、MF0904 则相反。3 者的生长曲线都呈 S 型,但它们达到 4 个生长期的时间不同,菌株 MF0905 仅需 36 h 就能达到生长对数期,而菌株 MF0903 和 MF0904 则分别需要 36 h、48 h;对整个生长周期来说,菌株 MF0905 的比较短,从这可以看出菌株 MF0905 为生长快速菌,而 MF0903 为生长慢速菌。通过上述 3 株菌基本生物特性的研究,说明所分离的 3 株菌均属于螺原体属;并且可以看出菌

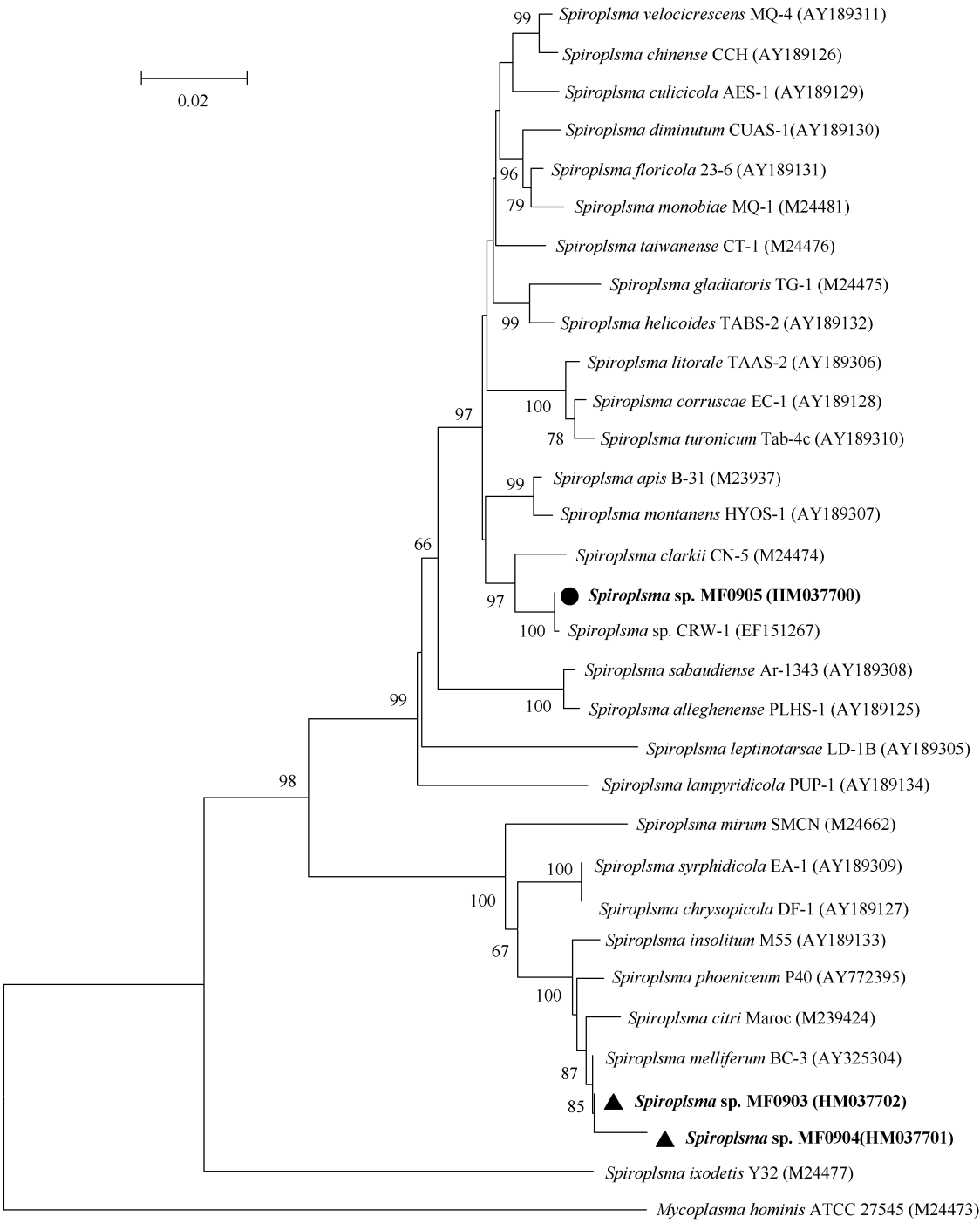


图 3 根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树 (NJ 法,1500 次)

Fig.3 The 16S rDNA phylogram based on neighbor-joining(NJ) with 1500 replicates. *Mycoplasma hominis* ATCC 27545 was used as an outgroup strain. The numbers at the nodes indicate the bootstrap value. Bootstrap value >70% . Strain names are shown next to the organism names and GenBank accession numbers are given in parentheses. Bar,2% indicates the genetic distance in the NJ tree.

株 MF0905 的一些特性明显不同于其余两株,它与之前 在植物花上分离到的一株菌 CRW-1 的特性相似<sup>[15]</sup>,菌株 MF0903 和 MF0904 的基本特性与标准菌株 *S. melliferum* 的特性相似。而分离菌株分类地位的确定还需依赖于系统发育学和血清学分析。

基于 16S rDNA、ITS、*rpoB* 基因构建系统发育树

显示,菌株 MF0903 和 MF0904 与 *S. melliferum* 聚为一枝,自展值为 85;菌株 MF0905 则与国外 1 株分离自 6 月甲虫的螺原体菌株 *Spiroplasma clarkii* 聚类,自展值为 97,其还与之前分离自植物花上的螺原体 CRW-1 聚为一枝(图 3),自展值达到 100。16S rDNA 序列较为保守,对于区分种间螺原体具有较

好的作用,但是区分亲缘关系较近以及个别进化速度较快的种时效果不明显。所以我们又选择了 ITS 序列、*rpoB* 基因进行分析,其结果与 16S rDNA 得到相同的结果。因此推测菌株 MF0903 和 MF0904 是 *S. melliferum*,MF0905 可能是 *Spiroplasma clarkii*。

目前在螺原体的分类、鉴定中,螺原体的血清学特性仍然是不可缺少的重要分类特征,本研究利用 *S. melliferum* 免疫新西兰大白兔取得抗血清,分别进行了生长抑制试验、代谢抑制试验、菌体变形试验。3 种血清学试验的结果一致表明,*Spiroplasma melliferum* 的抗血清对菌株 MF0905 没有抑制作用,而能抑制菌株 MF0903 和 MF0904 生长,表现为有较大的抑菌圈和较高的效价。由此推测菌株 MF0903 和 MF0904 与 *S. melliferum* 的亲缘关系较近,而 MF0905 与 *S. melliferum* 有较远或没有亲缘关系,这也与系统发育分析结果相互印证。但是血清学特性在螺原体种水平的分类鉴定中应用有些缺陷,如需要多种已知螺原体的标准菌株或抗血清相互交叉验证等。本研究应用血清学试验重点证明 MF0903 和 MF0904 与 *S. melliferum* 亲缘关系较近,而 MF0905 菌株不属于 *S. melliferum*。

以上分别从形态、基本生物学、分子生物学、血清学等几个方面对分离自健康蜜蜂体内的 3 株螺原体进行了详细的分析,因此可以初步确定菌株 MF0903 和 MF0904 属于 *Spiroplasma melliferum*,而菌株 MF0905 可能是 *S. clarkii*。这是首次从我国蜜蜂体内分离到非 *S. melliferum* 螺原体,由此也可推断我国蜜蜂体内可能存在多种螺原体类型,这还需对大量样品进行分离证明。那么螺原体是怎样在自然界传播的呢?通过多种生物学特性、血清学特性和系统发育学特性综合分析发现本研究中分离自蜜蜂的 3 株螺原体与实验室之前分离自花上的 3 株螺原体非常相似<sup>[15]</sup>,其中菌株 MF0905 与分离自植物花上的 CRW-1 相似,与甲虫螺原体 *Spiroplasma clarkii* 聚类,而菌株 MF0903 和 MF0904 与植物花上的 2 株螺原体 CNR1 和 CNR2 相似,都属于 *S. melliferum*。一般认为除植物致病性螺原体外,花表并不是螺原体长期稳定的栖居场所。由此推测,蜜蜂等昆虫在取食花蜜或在花表面活动时将体内的螺原体留在了花表面,结果又致使其它昆虫在花表面活动或取食花蜜时带有螺原体,并可能在体内长期存在或繁殖。这种螺原体在自然界的传播方式的推论还有待于更直接的试验证明。

**致谢** 本研究在昆虫鉴定方面得到中国科学院动物研究所朱朝东老师的热心帮助,在此表示真诚的感谢!感谢新西兰草业研究所 Micheal Christensen 教授在英文摘要修改方面的帮助;南京农业大学学生科研训练(SRT)小组成员杜金芝、仇小妹、张雯雯在样品采集、分离,以及生物学科基地 61 班庞敏在血清学研究方面给予帮助,特此致谢!

## 参考文献

- [1] Buchner P. Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. New York: Interscience Publishers, 1965, 909.
- [2] Clark TB. *Spiroplasma* sp., a new pathogen in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1977, 29: 112-113.
- [3] Mouches C, Bov JM, Tully JG, Rose DJ, McCoy RE, Carle-Junca P, Garnier M, Sailard C. *Spiroplasma apis*, a new species from the honeybee (*Apis mellifera*). *Annales Institut Microbiology (Paris)*, 1983, 134A: 383-397.
- [4] 董桂林,郭景荣,陈永萱. 蜜蜂螺原体单克隆抗体的制备及其基本性状研究. 南京农业大学报(*Journa of Nanjing Agricultural University*), 1990, 13(1): 43-47.
- [5] Carle P, Laigret F, Tully JG, Bove JM. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. *Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45:178-181.
- [6] Trachtenberg S. Shaping and Moving a *Spiroplasma*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2004, 7: 78-87.
- [7] Shaevitz JM, Lee JY, Fletcher DA. *Spiroplasma* swim by processive change inbody helicity. *Cell*, 2005, 122: 941-945.
- [8] Bove JM. Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1997, 109: 604-612.
- [9] Williamson DL, Sakaguchi B, Hackett KJ, Whitcomb RF, Tully JG, Carle P, Bove JM, Adams JR, Konai M, Henegar RB. *Spiroplasma poulsonii* sp. nov., a new species associated with male-lethality in *Drosophila willistoni*, a neotropical species of fruit fly. *Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49: 611-618.
- [10] Wang W, Gu W, Ding ZF, Ren YL, Chen JX, Hou YY. A novel spiroplasma pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkia* (Crustacea: Decapod) in China. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 249(1):131-137.
- [11] Clark TB. Honeybee spiroplasmosis, a new problem for beekeepers. *American Bee Journal*, 1978, 118: 18-23.

- [12] 阮康勤, 周秀文, 张晶, 于汉寿, 纪燕玲, 王志伟, 陈永萱. 蜜蜂螺原体的分离鉴定及致病性研究. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2007, 34(4):695-699.
- [13] 刘淑园, 于汉寿, 苏萌, 陈永萱, 贺子义, 王志伟. 黄道蚜螺原体的分离及其基本生物学特性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(6):786-790.
- [14] Rebekah WM, Frank EF. Simplified media for spiroplasma associated with tabanid flies. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48: 1-6.
- [15] 于汉寿, 阮康勤, 纪燕玲, 陈永萱, 王志伟. 3种植物花螺原体的分离及其基本特性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(9):1141-1146.
- [16] Whitcomb RF, Tully JG, McCawley P, Rose DL. Application of the growth inhibition test to spiroplasma taxonomy. *International Journal of Systematic Bacteriol*, 1982, 32:387-394.
- [17] Jimena ON, Laura JM, Elena MMR, Alonso NHJ, Teresa QMM. Association of *Railletia caprae* with the presence of *Mycoplasma* in the external ear canal of goats. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 92(1-2): 150-153.
- [18] Williamson DL, Tully JG, Whitcomb RF. Serological relationships of spiroplasmas as shown by combined deformation and metabolism inhibition tests. *International Journal of Systematic Bacteriol*, 1979, 29(4):345-351.
- [19] Bi KR, Gu W, Wang W. Sensitive and rapid detection of freshwater crustacean spiroplasmas by ISRs-sequence-targeted species-specific primers. *Eur Food Res Technol*, 2008, 99(1):57-65.
- [20] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 4673-4680.

## Characteristics of three spiroplasma isolates from honeybee (*Apis mellifera*)

Lijing Hui, Zhiping Zhong, Bing Hu, Bing Yang, Yanling Ji, Hanshou Yu\*

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the kinds and characteristics of spiroplasma in honeybees, as well as to study the taxonomy and transmission of honeybee spiroplasma under natural conditions. [Methods] We examined the morphology of spiroplasma isolates by dark field and transmission electron microscopy and studied the biological characteristics by using conventional culture-dependent methods and molecular biology and serological methods. [Results] Three spiroplasma isolates were obtained from healthy *Apis mellifera*. All isolates exhibited helicity during their growth phase, with one isolate (MF0905) being shorter and having less helicity. This isolate also differed from the other two (MF0903 and MF0904) in having larger colonies with an irregular margin instead of being round. In addition, isolate MF0905 could not hydrolyze arginine whereas MF0903 and MF0904 could. All three isolates could use glucose and D-fructose as a carbon source but did not hydrolyse urea. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA, ITS and the *rpoB* gene showed that MF0903 and MF0904 had a close relationship with *Spiroplasma melliferum*, and MF0905 was close to *S. clarkii*. Serological studies including the growth inhibition test, metabolic inhibition test and deformation test gave the same result as the phylogenetic analysis. [Conclusion] The spiroplasma isolate MF0905 might be *S. clarkii* and other two isolates were *S. melliferum*. This result indicated that *Spiroplasma melliferum* is not the only spiroplasma species in honeybees in China.

**Keywords:** *Spiroplasma* sp.; honeybee; biological characteristics; phylogenetic analysis; serology

(本文责编:王晋芳)