

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(6): 786–791; 4 June 2009
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

黄道蚜蝇螺原体的分离及其基本生物学特性

刘淑园, 于汉寿*, 苏萌, 陈永萱, 贺子义, 王志伟

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:【目的】调查我国部分昆虫螺原体的存在情况, 收集我国的昆虫螺原体资源, 并研究它们的基本生物学特性, 初步确定其分类地位。【方法】螺原体分离、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, 根据 16S rDNA 构建系统发育树研究螺原体分离菌株可能的分类地位。【结果】从黄道蚜蝇昆虫体内分离到螺原体 YY0801, 并对其进行了形态学、基本生物学及分子生物学特性研究。分离菌株在 R2 液体培养基中生长良好, 能通过孔径为 0.22 μm 、0.45 μm 的微孔滤膜; 在 R2 固体培养基上呈颗粒状菌落; 在对数期呈典型的螺旋状; 能利用葡萄糖、D-果糖作为碳源; 能强烈代谢精氨酸; 不能利用尿素; 在含苄芞青霉素钠(2000 U/mL)的 R2 液体培养基中生长良好。根据 16S rDNA 构建的系统发育树显示, 分离菌株 YY0801 与血清组 I 的 *Spiroplasma melliferum* 聚类较近。【结论】首次在国内从食蚜蝇科的黄道蚜蝇中(*Phytomyia zonata*)分离到螺原体, 分离菌株 YY0801 可能是 *Spiroplasma melliferum*, 但其确切的分类地位需要进行血清学进一步分析。

关键词: 螺原体; 黄道蚜蝇; 生物学特性; 系统发育分析

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0786-06

螺原体(Spiroplasma)是一种螺旋状、无细胞壁的原核生物, 其个体极小, 直径约为 100 ~ 250 nm。它的基因组非常小(780 ~ 2220 kb), 是原核生物中能独立生活和自我复制的最简单的生命形式, 是一类非常重要的微生物资源^[1]。螺原体属于细菌域(Bacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、柔膜菌纲(Mollicutes)、虫原体目(Entomoplasmatales)、螺原体科(Spiroplasmataceae)、螺原体属(*Spiroplasma*)^[2,4]。

目前发现螺原体有 34 个血清组, 15 个血清亚组, 其中有 37 个种被命名和详细描述。这些螺原体绝大多数分离自昆虫, 其中包括鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目、同翅目、蜻蜓目及蜉蝣类^[3], 在植物和高等的无脊椎动物中也可以分离到, 但分离率较低。昆虫螺原体主要是从具有咀嚼式口器、舐吸式口器及刺吸式口器的昆虫上分离得到, 它们和宿主之间的关系有共生(mutualism)、致病

(pathogenicity)和互利(commensalism)3种, 其中大多数为共生关系^[4]。致病昆虫螺原体如 *S. apis* 和 *S. melliferum* 分别导致蜜蜂(*Apis* spp.)“五月病”和“爬蜂病”^[5-6], *S. poulsonii* 导致果蝇(*Drosophila*)的性别失调^[7]。

在我国, 有关螺原体的研究较少, 除意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)螺原体外其他昆虫螺原体的研究还是空白^[8-10]。本研究首次从黄道蚜蝇(*Phytomyia zonata*)昆虫体内分离到螺原体 YY0801, 并对其进行了形态学、运动性、基本生物学特性和系统发育分析等方面的研究, 初步推断分离菌株的分类地位。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 供试螺原体菌株 YY0801 分离自双翅目(Diptera)、环裂亚目(Cyclorrhapha)、食蚜蝇科

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: 刘淑园(1986-), 女, 山西人, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源与分子生态。E-mail: lsy0071984@163.com

收稿日期: 2009-01-12; 修回日期: 2009-02-23

(Syrphidae)、黄道蚜蝇(*Phytomyia zonata*)。用于分离螺原体的昆虫是4~9月间在南京采集的。

1.1.2 主要试剂和仪器: Chelex-100 和牛心浸出液冻干粉(PPLO)购自 Sigma 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 培养基。将昆虫用 1% 次氯酸钠表面消毒约 3 min, 无菌水洗涤 4 次, 无菌镊子取其腹部, 在含有 5 mL 的 R2 液体培养基的研钵内碾碎, 浸泡 5 min 后用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 滤液收集于含 1 mL 新鲜培养基的离心管中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 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。梯度稀释法纯化分离菌株。

1.3 螺原体的生长曲线的测定

取 0.9 mL 新鲜培养基于离心管中, 接种 100 μL 生长 48 h 的菌液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下静置培养; 利用 CCU 法检查活动菌体数, 3 次重复^[11]。蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 作为对照。

1.4 螺原体的形态及运动性观察

1.4.1 透射电子显微镜观察菌株形态: 取 0.5 mL 处于不同生长期的螺原体培养液, 用等体积 4% 戊二醛(内含 0.03 mol/L 磷酸缓冲液, pH7.5)固定, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1~3 d, 吸一滴固定液后置于铜网上, 静置 2 min, 用滤纸吸干溶液, 用 1.5% 的磷钨酸钠溶液(pH7.0)染色 20 s, 再用滤纸吸干, 自然干燥后用透射电子显微镜(Hitachi H7650 型)观察其形态。用暗视野显微镜观察分离菌株的运动性。

1.4.2 固体菌落形态观察: 取对数生长期菌液 200 μL 涂布于 R2 固体培养基表面, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养。逐日观察培养基颜色变化, 当培养基由红色变成黄色时, 用倒置显微镜(Olympus Tokyo)观察螺原体菌落形态, 并测量其大小。

1.5 螺原体的滤过性、对血清的需求及对青霉素的抗性

取 1 mL 培养液分别用孔径 0.45 μm 、0.22 μm 的滤膜加压过滤, 用暗视野显微镜检查是否有菌体存在。取 50 μL 对数生长期的菌体接种于不含胎牛血清的 R2 液体培养基中。30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 观察其生长是否需要血清。在 R2 培养基中加入不同单位的氨苄青霉素钠(500、1000、1500、2000 U/mL)以检查螺原

体对青霉素的抗性。蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 作为对照。

1.6 螺原体的生理学特性

1.6.1 对糖类、精氨酸和尿素的代谢能力: 分别将所有单糖、尿素配成 10% 的母液, 双糖、精氨酸配成 20% 的母液。将上述母液 50 μL 分别加入 950 μL 不含蔗糖的 R2 液体培养基中, 使它们的单糖、尿素含量为 0.5%; 双糖、精氨酸为 1%。然后接种 50 μL 对数生长期的菌体, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下静置培养, 连续转管培养 3 次以上; 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。以接种 R2 培养基作对照, 重复 3 次。

1.6.2 毛地黄皂苷(digitonin)抑菌试验: 取对数生长期菌体 50 μL 接种到 R2 固体培养基上, 用涂布棒涂布均匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 正放于培养箱中 1 h。将滴加有 1.5% digitonin 酒精溶液、直径为 7 mm 的无菌圆形滤纸片风干后, 置入已接种的固体培养基中。30 $^{\circ}\text{C}$ 下静置培养, 待周围的培养基明显变黄时, 测量抑菌圈的大小。用 95% 酒精滴加在滤纸片上风干作对照^[12]。

螺原体的生理学特性研究中均以蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 作为对照。

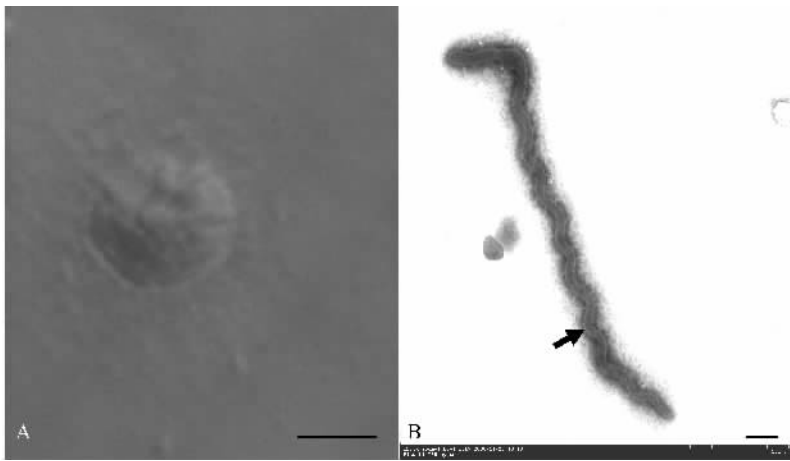
1.7 螺原体的系统发育学分析

用 Chelex-100 树脂法提取螺原体的总 DNA^[13]。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。扩增产物经电泳检测达到测序要求的直接送交 Beijing Genomics Institute (Beijing) 进行测序。将所得序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对。根据比对结果, 下载与菌株 16S rDNA、ITS 同源并经过菌种鉴定的序列, 用 ClustalX 1.8 进行多重比对, 用 MEGA 4.0 采用邻接法构建系统发育树^[14]。

2 结果和分析

2.1 昆虫螺原体分离物的获得及形态观察

螺原体分离物 YY0801 采用梯度稀释法纯化 3 次后得到纯菌株。YY0801 在相差显微镜下呈快速的翻滚运动。在倒置显微镜下分离菌株菌落形态呈颗粒状, 菌落核心隆起部分直径约 90~110 μm , 边缘扩散至 120~160 μm (图 1-A); 在透射电镜下分离菌株呈现典型螺旋状, 菌体为细丝状, 长约 4~7 μm , 直径在 200 nm 左右。一般有 4~9 个螺旋, 可见单层膜(图 1-B)。



1 分离菌株 YY0801 菌落形态(A) 和菌体形态 (B)

Fig.1 Colony (A) and electron micrograph (B) of the isolate YY0801. The arrow indicates the single membrane. Scale bars: A: bar = 100 μm ; B: bar = 600 nm.

2.2 分离菌株的生长曲线

分离菌株 YY0801 与标准菌株 *Spiroplasma melliferum* 的生长曲线基本一致。二者在 R2 培养基中的生长都分为 4 个生长期: 接种 12 h 内, 菌体数量均无明显增加, 为延滞期; 12 h 后, 菌量呈直线上升, 为对数期; 48 h 后达到生长高峰, 并可维持 48 h, 为稳定期; 96 h 后, 死亡菌体数迅速增加, 到达衰亡期。

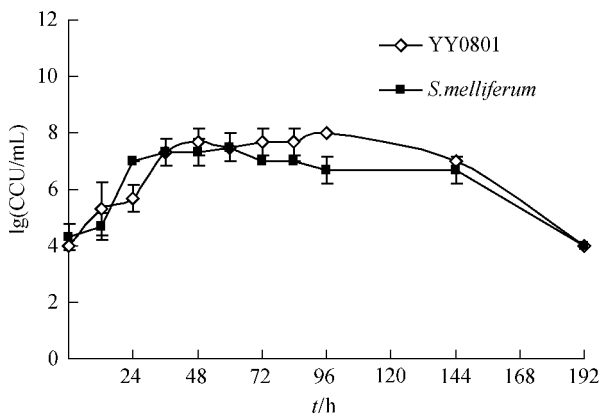


图 2 YY0801 和 *Spiroplasma melliferum* 在 R2 培养基中的生长曲线 (30°C)

Fig.2 Growth curves of YY0801 and *Spiroplasma melliferum* in R2 medium (30°C).

2.3 分离菌株的基本生物学特性

菌株 YY0801 在 R2 液体培养基中生长良好, 30°C 静置培养 2 d 培养基就可变为黄色; 可以通过孔径为 0.45 μm 、0.22 μm 的微孔滤膜; 在不含胎牛血清的 R2 培养基中, 不能生长; 在含不同单位(500、1000、1500、2000 U/mL)氨苄青霉素钠的 R2 液体培

养基中生长良好; 能利用葡萄糖、D-果糖作为碳源, 不能利用甘露糖、D-半乳糖、L-山梨糖、乳糖和蔗糖; 能强烈代谢精氨酸; 不能利用尿素, 这些基本特性与标准菌株 *Spiroplasma melliferum* 完全一样。在毛地黄皂抑菌试验中, YY0801 的抑菌距离为 0.75 cm, *S. melliferum* 的抑菌距离为 0.70 cm。

2.4 分离菌株的系统发育学分析

利用引物分别扩增得到 16S rDNA、ITS 序列长度都约为 1400 bp 的片段; 序列提交 GenBank (16S rDNA 序列号为 FJ598337)。在 GenBank 中进行 BLAST 比对, 结果显示两个序列都与 *Spiroplasma melliferum* BC-3 (= ATCC33219) 相似度最高, 达到 99%。根据 16S rDNA 构建邻接树, 发现与 *S. melliferum* 聚为一枝, 自展值为 72 (图 3)。根据 ITS 构建的系统发育树的拓扑结构和 16S rDNA 的相似。

3 讨论

昆虫螺原体目前主要是从具有咀嚼式口器、舐吸式口器及刺吸式口器的昆虫上分离到, 其中包括鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目等。除部分昆虫螺原体致病外, 大多数螺原体与宿主的关系为互生或共生。在昆虫宿主体内, 螺原体通常接触中肠上皮细胞, 对宿主并没有明显的不利作用。本研究中的螺原体宿主黄道蚜蝇 (*Phytomyia zonata*) 属于双翅目、食蚜蝇科。其形似黄蜂, 体型肥胖, 体色黑色, 复眼发达黑色上有条状斑纹, 腹背前段橙黄色, 翅膀透明; 性喜阳光, 常飞舞花间草丛或芳香植物上, 取食花粉、花蜜, 并传播花粉。黄道蚜蝇是 4~9 月在南京采集的, 在其体内(腹部)分离到螺原体菌株

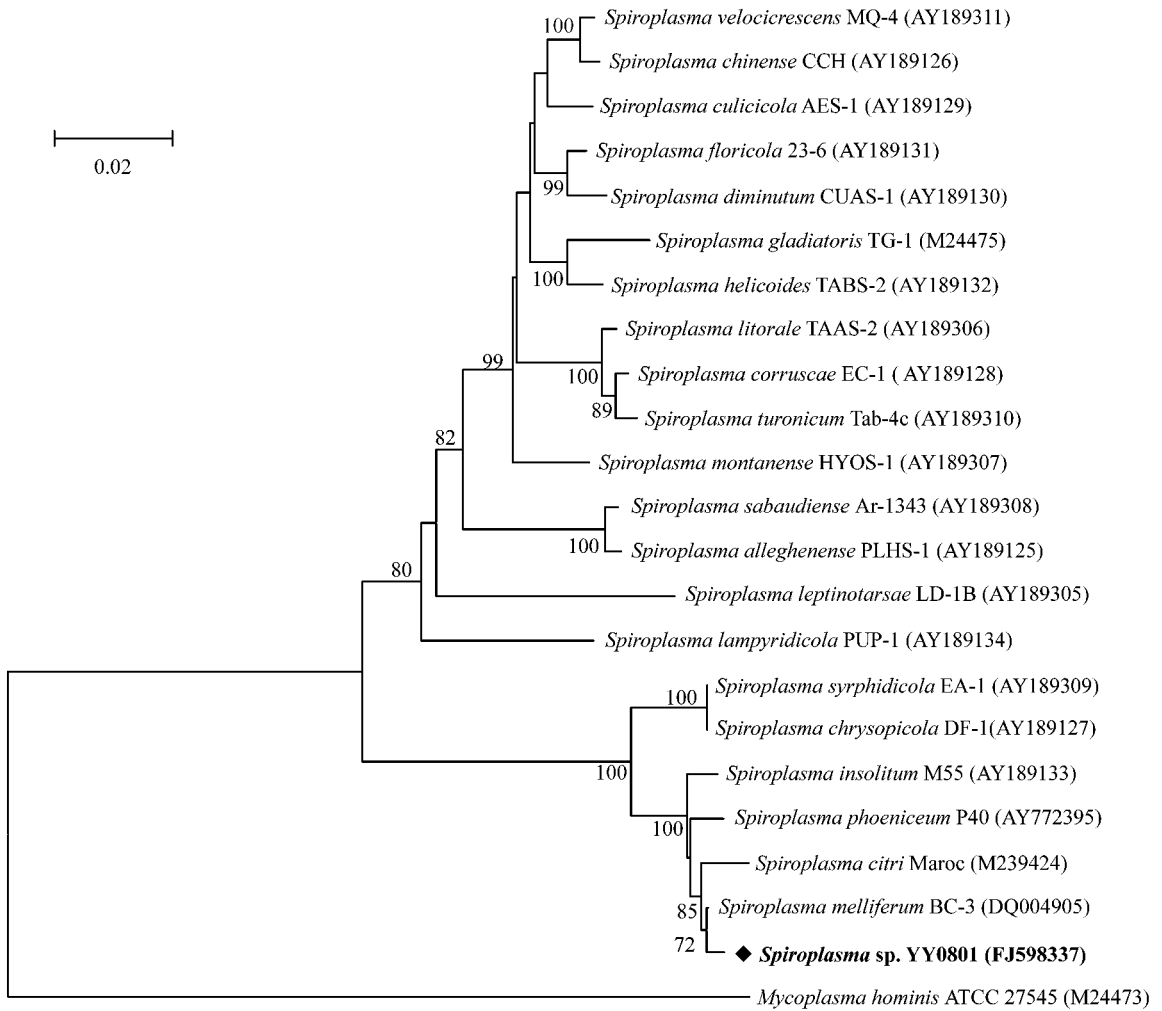


图3 根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树(NJ 法, 1500 次)

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 values. Bootstrap values > 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.

YY0801。分离到螺原体的黄道蚜蝇健康无病, 两者可能是共生关系, 但还需进行回接试验和更广泛的调查而确定。

国际柔膜菌纲分类委员会规定, 确定一个分离物是否属于螺原体需要从形态学、基本生物学特性、分子生物学几个方面进行验证。本研究在黄道蚜蝇 (*Phytomyia zonata*) 得到的分离物 YY0801 在 R2 培养基中生长良好, 说明分离物能够人工培养; 分离菌株对氨基青霉素钠有较强的抗性, 能通过孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜, 并通过梯度稀释法得到纯菌株, 证明其属于细菌域厚壁菌门的柔膜菌纲; 在 R2 固体培养基上菌落呈颗粒状, 透射电镜下在对数生长期可见典型的螺旋状(图 1), 相差显微镜下可见其作快速的翻滚运动, 说明分离菌株属于虫原体目中的螺原体科; 在不含血清的培养基中不能生长, 能利用

葡萄糖、D-果糖作为碳源, 不能利用尿素, 这些特性都完全符合螺原体属 (*Spiroplasma*) 的描述, 说明分离物确实是属于螺原体属。而分离物在螺原体属内分类地位的确立则依赖于系统发育分析、血清学分析等。

基于 16S rDNA、ITS 序列构建系统发育树都显示, 分离菌株 YY0801 与 *Spiroplasma melliferum* 聚为一枝。由于 16S rDNA 序列较为保守, 对于确定不同血清组的螺原体分离菌株具有较好的作用。同一血清组不同血清亚组之间螺原体分离菌株的确定则依赖于血清学分析、DNA-DNA 杂交等。

本研究首次在国内从食蚜蝇中分离到螺原体菌株, 并对其进行了基本生物学特性、系统发育分析等方面的研究。根据形态学、运动性和生理生化特性

的 *Eristalis arbustorum* 的螺原体标准菌株 *Spiroplasma syrphidicola* 以及分离自意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 的 *Spiroplasma melliferum* 在形态学、基本生物学特性方面都基本相同, 都可以利用葡萄糖作为碳源, 并且能强烈代谢精氨酸, 不能利用尿素, 固体菌落都呈颗粒状, 且菌落边缘不规则^[15]。但是根据 16S rDNA、ITS 序列构建的系统发育树显示, 菌株 YY0801 与 *S. syrphidicola* EA-1 (AY189309) 亲缘关系较远, 与 *S. melliferum* 聚类较近。因此推测菌株 YY0801 可能是 *S. melliferum*, 该菌株是否对蜜蜂致病, 还需要对蜜蜂进行接种和致病性测定, 其确切的分类地位也需要血清学试验进一步证明。

在我们以前研究的过程中也发现分离自不同植物花的螺原体根据系统发育分析也与 *S. melliferum* 聚为一枝, 推测可能是蜜蜂在取食花蜜时将螺原体留在了花的表面^[8]。而本文研究的黄道蚜蝇喜取食花粉、花蜜, 且采集于花间草丛中。由此可见螺原体宿主较为广泛, 且在不同种类的昆虫中也可以水平传播。但是螺原体在昆虫宿主之间如何传播以及与昆虫宿主的相互作用关系, 是否对昆虫宿主致病等这些问题还有待于进一步研究。

致谢 本研究在昆虫鉴定方面得到南京农业大学植物保护学院孙长海老师的帮助, 在透射电镜拍摄过程中得到南京农业大学胡冰老师的帮助, 在此一并表示真诚的感谢! 感谢南京农业大学学生科研训练 (SRT) 小组成员程坤、王洪梅、刘小虎的帮助。

参考文献

[1] Carle P, Laigret F, Tully JG, et al. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. *Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45: 178 – 181.

[2] ICSB (International Committee on Systematic Bacteriology). Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes: revised minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes (Division Tenericutes). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45: 605 – 612.

[3] Clark TB. Spiroplasmas: diversity of arthropod reservoirs and host – parasite relationships. *Science*, 1982, 212: 57 – 59.

[4] Regassa LB, Gasparich GE. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity. *Frontiers in Bioscience*, 2006, 11: 2983 – 3002.

[5] Clark TB. *Spiroplasma* sp., a new pathogen in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1977, 29: 112 – 113.

[6] Mouches C, Menara A, Tully JG, et al. *Spiroplasma apis*, a new species from the honeybee (*Apis mellifera*). *Annales Institut Microbiologie (Paris)*, 1983, 134A: 383 – 397.

[7] Williamson DL, Sakaguchi B, Hackett KJ, et al. *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.

[8] 于汉寿, 阮康勤, 纪燕玲, 等. 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.

[9] 陈永萱, 薛宝娣, 郭永红. 蜜蜂螺原体基本性状的研究. *中国科学 (B 辑) (Scientia Sinica series B)*, 1988, 31(2): 149 – 154.

[10] 阮康勤, 周秀文, 张晶, 等. 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.

[11] Rebekah WM, Frank EF. Simplified media for spiroplasma associated with tabanid flies. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48: 1 – 6.

[12] Aluotto BB, Wittler RG, Williams CO, et al. Standardized bacteriologic techniques for characterization of Mycoplasma species. *Journal of Systematic Bacteriology*, 1970, 20: 35 – 58.

[13] Wang W, Gu W, Ding Z, et al. A novel *Spiroplasma* pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapod), in China. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 249: 131 – 137.

[14] 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.

[15] Whitcomb RF, Gasparich GE, French JG, et al. *Spiroplasma syrphidicola* sp. nov., from a Syrphid fly (Diptera: Syrphidae). *Journal of Systematic Bacteriology*, 1996: 797 – 801.

Isolation and characterisation of *Spiroplasma* sp. from *Phytomyia zonata* (Diptera: Syrphidae)

Shuyuan Liu, Hanshou Yu*, Meng Su, Yongxuan Chen, Ziyi He, Zhiwei Wang

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

Abstract: [Objective] To obtain the spiroplasma resources and characterize the spiroplasmas from insects in China, as well as study the taxonomy of spiroplasma based on biological characteristics. [Methods] We determined morphology by using dark field and transmission electron microscopy. The biological characteristics of the spiroplasmas were studied by using conventional culture-dependent method and phylogenetic analysis based on 16S rDNA. [Results] Based on morphological characteristics, biological characteristics and phylogenetic evidences, we studied the taxonomy of the strain YY0801 isolated from *Phytomyia zonata* (Diptera: Syrphidae). The isolate grew well in R2 liquid medium and could pass through 0.22 μm and 0.45 μm filtrate membranes. The colony was grain-like in solid medium. Through electron microscopy, the isolate YY0801 exhibited helicity during their exponential growth phase. The isolate YY0801 was able to ferment glucose and D-fructose and to catabolize arginine, but did not to hydrolyse urea. The isolate was resistant to ampicillin (2000 U/mL). The phylogenetic relationships based on 16S rDNA supported YY0801 grouped with the serogroup I and was close to *S. melliferum*. [Conclusion] The result indicated that the spiroplasma isolate YY0801 was close to *S. melliferum*, but further designation need support of serological analyses.

Keywords: *Spiroplasma* sp.; *Phytomyia zonata*; biological characteristics; phylogenetic analysis

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870002)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84395531; E-mail: yuhans@njau.edu.cn

Received: 12 January 2009/Revised: 23 February 2009

科学出版社新书推介(2009-04)

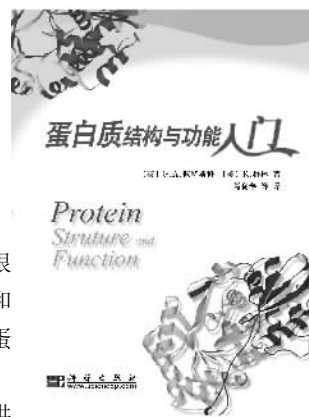
蛋白质结构与功能入门(翻译版,含光盘)

(英)D.惠特福德 著 魏群 主译

978-7-03-021010-4 ¥79.00 2009年4月出版

内容简介: 蛋白质结构功能的研究是从分子水平了解生命现象的基础。本书涉及的知识范围很广,从氨基酸到蛋白质的三维结构及检测方法,酶、膜蛋白、纤维蛋白等的结构功能,酶的催化和动力学,蛋白质的表达、纯化、合成、加工及在细胞中的周转,蛋白质的多样性和蛋白质组学,蛋白质体内外的折叠及蛋白质结构与医学分子生物学的进展等。

本书适合作为国内大专院校生命科学领域本科生和研究生的教材或教学参考用书,也可供研究生生命科学的相关人员及有兴趣了解现代生命科学的人士阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人 周文字 联系电话 010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目