

3 种植物花螺原体的分离及其基本特性

于汉寿, 阮康勤, 纪燕玲, 陈永萱, 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】调查我国植物花上的螺原体的存在, 搜集我国的螺原体资源, 并研究它们的基本生物学特性。【方法】常规螺原体分离、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 和 ITS 序列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】分别从油菜(*Brassica napus*)、杜鹃(*Rhododendron simsii*)、红花酢浆草(*Oxalis corymbosa*) 3 种植物花表分离到 4 株螺原体 CNR-1 和 CNR-2、CNA-1、CRW-1, 对其形态、部分生理生化特性及分子生物学特性进行了初步研究。这 4 株螺原体在 R-2 液体培养基中生长良好, 都能通过孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜; 在 R-2 固体培养基上呈圆形或颗粒状菌落, 菌落直径约 50~600 μm ; 在生长的某个阶段可呈典型的螺旋状, 菌体直径为 37.04~370.40 nm, 长度约 0.89~11.88 μm ; 它们都能利用葡萄糖作为碳源, 不能利用尿素; 在不含胎牛血清的 R-2 培养基中, 它们都不能生长; 菌株 CNR-1、CNA-1 能强烈代谢精氨酸, 而 CNR-2 和 CRW-1 不能代谢精氨酸; 在氨苄青霉素钠浓度高达 2000 U/mL 的 R-2 培养基中, 分离菌株生长良好。根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树显示, 分离菌株 CNR-1 和 CNR-2、CNA-1 与蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 聚类较近, 而 CRW-1 与 *S. clarkii* 聚类较近; 根据 ITS 序列构建的系统发育树显示, CRW-1 形成一个单独的分枝, 其它 3 个菌株仍与 *S. melliferum* 聚类。

【结论】以上结果初步表明, 分离菌株 CNR-1 和 CNR-2、CNA-1 极有可能是 *Spiroplasma melliferum*, 而 CRW-1 可能是一个新的螺原体种, 但还需要血清学试验进一步验证。

关键词: 螺原体; 生物学特性; 油菜; 杜鹃; 红花酢浆草

中图分类号: Q939.34 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1141-06

螺原体 (*Spiroplasma*) 是硬壁菌门 (Firmicutes) 柔膜菌纲 (Mollicutes) 的一类螺旋状、无细胞壁的原核生物, 它们基因组小 (0.78~2.22 Mb), 是能独立生活和自我复制的最简单的原核微生物^[1]。作为一类重要的微生物资源, 由于其形态结构和营养代谢的特点, 螺原体常作为研究生物膜和运动的模式生物受到关注^[2,3]。

绝大多数螺原体分离自昆虫和扁虱, 在几种植物体内或花表也分离到螺原体^[4]。有些螺原体对宿主有致病性, 如螺原体 *Spiroplasma apis* 和 *S. melliferum* 导致蜜蜂 (*Apis* spp.) “五月病” (May disease) 和 “爬蜂病”, *S. citri*, *S. kunkelii* 和 *S. phoneiceum* 分别引起

柑橘顽固病 (Citrus stubborn)、玉米矮缩病 (Corn stunt) 和紫苑黄化病 (Aster yellow), 而大多数螺原体和宿主之间是共生 (Mutualism) 或互生 (Commensalism) 关系^[4]。

有许多研究证实花上螺原体与昆虫之间有密切的关系, Clark 认为蜜蜂螺原体在蜜蜂体内出现和消失的时间与植物开花时间一致表明花可以作为传播中间体^[5], 这种推测得到 Davis 等的支持, 后来大量植物花螺原体的发现进一步支持了这种观点^[6]。目前一般观点认为, 花上螺原体可能是携带螺原体的昆虫在取食花蜜或花粉时留下的, 花仅是作为定居场所在昆虫传播中起作用, 这种推测也被食叶昆虫及非虫媒

基金项目: 南京农业大学引进人才基金项目 (804052)

作者简介: 于汉寿 (1964-), 男, 江苏人, 博士, 副教授, 研究方向为微生物资源与分子生态。Tel/Fax: +86-25-84395531; E-mail: yuhans@njau.edu.cn

收稿日期: 2008-03-25; 修回日期: 2008-05-25

花上没有发现类似的螺原体所支持^[4]。但是,直接从植物花分离得到的螺原体从哪里来?在自然界中如何传播?螺原体是否在植物花上增殖?是否进入植物体内?是否对植物产生什么影响?这些问题目前尚不清楚。

国际上已有 36 个螺原体有效种的记录,但国内有关螺原体的研究极少^[7,8]。为获得我国的螺原体资源,并为以后进一步研究螺原体与宿主之间的相互关系,2005 年 3~7 月间,我们从江苏省南京市东郊采集了大量的植物花分离得到 4 株螺原体,并研究了其基本生物学特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物花和螺原体菌株:用于分离螺原体的植物花有油菜(*Brassica napus*)、杜鹃(*Rhododendron simsii*)、红花酢浆草(*Oxalis corymbosa*)、牡丹(*Paeonia suffruticosa*)、现代月季(*Rosa hybrida*)、虞美人(*Papaver rhoeas*)、诸葛菜(*Orychophragmus violaceus*)、唐菖蒲(*Gladiolus hybridus*)等 80 多种,都是在华东地区于 3~7 月间开花的植物。用镊子随机采集盛开的花盛放于干净的保鲜袋中,3~5 朵花为一个样品,避免用手直接接触样品,扎紧样品袋口后带到室内立即进行分离。

1.1.2 主要试剂和仪器:DNA 提取和纯化、PCR 扩增所用酶和试剂同文献^[9]。Chelex-100 树脂和牛心冻干粉(PPLO)购自 Sigma 公司;所用暗视野显微镜为 Olympus BH-2,透射电子显微镜为 Hitachi H7650。

1.2 螺原体的分离及纯化

分离所用培养基是由 C-3G 简化后的 R-2 培养基^[7]。在无菌的平皿中加入 5 mL 左右的 R-2 培养基,将样品用无菌镊子取出,将花瓣分离后浸泡于培养基中,并轻轻转动 2~5 min 后,将浸泡过花瓣的培养基用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,滤液收集于无菌的 1.5 mL 离心管中,于 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,持续观察一个月。分离菌株的纯化用梯度稀释法^[8]。

1.3 分离物的滤过性及对青霉素的抗性

取 1 mL 培养物用孔径 0.22 μm 的滤膜加压过滤,在暗视野显微镜下检查是否有菌体存在。在 R-2 培养基中加入不同单位的氨苄青霉素钠以检查螺原体对青霉素的抗性^[7]。

1.4 螺原体的形态及运动性观察

应用负染法在电子显微镜下观察分离菌株的形态^[7]。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, pH7.3~7.5)固定,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1~3 d,吸一滴固定后的液体置于铜网上,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 40 s,再用滤纸吸干,风干后用透射电子显微镜(Hitachi H7650)观察其形态。用暗视野显微镜观察分离菌株的运动性^[7]。

1.5 螺原体的培养及其生理学特性

将分离物接种到 R-2 液体或固体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养,逐日观察培养基颜色变化,并用暗视野显微镜观察分离物的密度和运动方式。用倒置显微镜观察分离物在 R-2 固体培养基中的菌落形态。

在研究分离菌株对葡萄糖、精氨酸及尿素时,分别用 1% 的葡萄糖或精氨酸、或 0.2% 的尿素替代 R-2 培养基中的蔗糖,然后接种 20 μL 对数生长期的菌体,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养;在研究螺原体生长对血清需求中,取 20 μL 对数生长期的菌体接种于不含胎牛血清的 R-2 培养基^[7]。30 $^{\circ}\text{C}$ 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,并用暗视野显微镜观察验证。以接种 R-2 培养基作对照,重复 3 次。

1.6 螺原体的 16S rDNA 和 ITS 分析

用 Chelex-100 树脂法提取螺原体的总 DNA^[8],利用 PCR 技术以螺原体总 DNA 为模板扩增其 16S rDNA^[10],所用通用引物为 27F(5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACCTTGTTACGACTT-3')。扩增 ITS 序列所用引物为 ITS-F(5'-CCCC-TTATGTCTTGGGCTAC-3')和 ITS-R(5'-CTATCTC-CAGGTTTCGATTGG-3'),扩增片断为 16S rDNA 序列全长和 ITS 序列(其中包括 16S rDNA 及 23S rDNA 部分序列、16S~23S rDNA 间隔区)。用凝胶回收试剂盒(Axygen 公司)对扩增到的片段进行回收,将回收产物酶连到 pMD19-T 载体上,转化至 *E. coli* DH5 α ,通过蓝白斑挑选转化子,经过培养后提取质粒,酶切验证插入片段大小,测序由 Invitrogen 公司完成。利用 BLAST 将测序结果在 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)中与相关的 16S rDNA 序列进行同源性分析。下载与菌株 16S rDNA 同源并经过菌种鉴定的序列,用 ClustalX 1.8 进行多重序列对比,然后用 MEGA 4.0 采用邻接法生成系统发育树,以亲缘关系较近的 *Mycoplasma hominis* 作为外群。

2 结果和分析

2.1 植物花螺原体分离物的获得

从采集到的 80 多种植物花进行螺原体的分离, 结果从油菜(*Brassica napus*)、杜鹃(*Rhododendron simsii*)、红花酢浆草(*Oxalis corymbosa*) 3 种植物花上分离到 4 个来源不同的分离物, 分离物用梯度稀释法纯化 3 次。获得分离物的花外表与正常花无明显差异。分离物 CNR-1 和 CNR-2 分离自油菜花, CNA-1 和 CRW-1 分别分离自杜鹃花和红花酢浆草的花表。

2.2 植物花螺原体分离物的滤过性、对青霉素的抗性及其它基本特征

分离菌株 CNR-1、CNR-2 和 CNA-1 在 R-2 液体培养基中生长繁殖速度较快, 30 静置培养 2 d 培养基就变色, 而 CRW-1 生长相对较慢, 培养 4~5 d 培养基才变色。用暗视野显微镜观察到上述 4 种分离物

的菌体螺旋状, 在液体培养基中可作翻滚式运动。都能通过孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜。在氨苄青霉素钠浓度高达 2000 U/mL 的 R-2 培养基中, 分离菌株能正常繁殖, 生长良好。以上结果说明这些分离物为螺原体。

将分离菌株接种到 R-2 固体培养基中, 30 培养 2 d (CNR-1、CNR-2 和 CNA-1) 或 4 d (CRW-1) 后用倒置显微镜观察到菌落呈圆形或颗粒状, 菌落直径在 50~600 μm 之间变化, 形态没有明显差别。菌落大小与琼脂浓度、接种量密切相关。琼脂浓度低、接种量少则菌落相对较大。

在电镜下 4 个菌株均可见丝状螺旋形菌体, 其中, CNR-1、CNR-2 和 CNA-1 菌株的菌体直径在 0.18 μm 左右, 一般有 5~8 个螺旋, CRW-1 菌体直径约 0.20 μm , 多数有 5~6 个螺旋, 菌体中间或末段可见膨大部分 (图 1)。

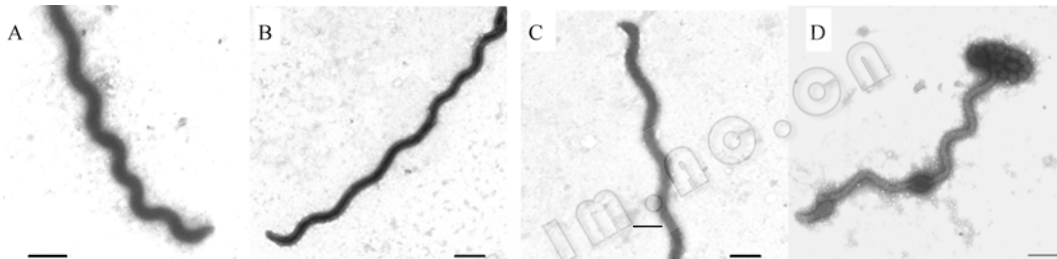


图 1 用负染法在电镜下观察 4 株植物花螺原体分离菌株的形态 (标尺为 500 nm)

Fig. 1 Electron micrograph of negative-stained preparations of four spiroplasma isolates.

A: CNR-1; B: CNR-2; C: CNA-1; D: CRW-1. scale bars: 500 nm.

2.3 分离菌株的生理特性

在不含胎牛血清的 R-2 培养基中, 分离菌株都不能生长, 说明上述植物花螺原体分离物依赖血清中的甾醇生长。分离菌株都能利用葡萄糖作为碳源, 而不能利用尿素。在以精氨酸为唯一碳源的 R-2 培养基中, 接种和培养 CNR-1、CNA-1 2-4 d 后培养基由红色逐

渐变成黄色, 培养液仍然保持澄清。在暗视野显微镜下也发现螺原体分离物密度的快速增加, 螺原体呈剧烈的翻滚运动; 而接种和培养 CNR-2 和 CRW-1 14 d 后培养基颜色仍没有变化, 而且在暗视野显微镜下也没有发现螺原体密度的增加。这些说明 CNR-1、CNA-1 能代谢精氨酸, 而 CNR-2 和 CRW-1 不能 (表 1)。

表 1 供试菌株对血清的需求及几种物质的代谢特性

Table 1 Serum requirement and other materials utilization of spiroplasma isolates

Spiroplasma isolates	Host	Glucose fermentation	Arginine hydrolysis	Urea hydrolysis	Growth in serum-free
<i>Spiroplasma melliferum</i>	<i>Apis melliferum</i>	+	+	-	-
CRW-1	<i>Oxalis corymbosa</i>	+	-	-	-
CNR-1	<i>Rhododendron simsii</i>	+	+	-	-
CNR-2	<i>Rhododendron simsii</i>	+	-	-	-
CNA-1	<i>Brassica napus</i>	+	+	-	-

“+”means positive reaction, “-”means negative reaction.

CNA-1 与 *S. melliferum*、*S. citri* 聚成一类(在根据 16S rDNA 序列构建的邻接树中, CNR-1、CNR-2、CNA-1 并不与 *S. citri* 聚类)(图 2)。根据 16S rDNA 和 ITS 序列构建的最大简约树和邻接树的拓扑结构相似。

3 讨论

植物花表是螺原体主要存在场所之一, 有报道证实花上螺原体与昆虫有密切关系, 几种植物花螺原体可能对昆虫致病^[11], 然而植物花螺原体对植物的影响目前还不清楚。一般认为植物花螺原体是通过媒介——主要是节肢动物在取食花蜜时留下的^[12]。由于昆虫取食的偶然性及取样的随机性, 每种植物花上分离螺原体的概率不但与样品量有关, 还与植物的栽培面积、花本身的结构如蜜腺的暴露程度、开花时间是否与介体活动时间吻合及采样前天气情况等相关。

分离得到的螺原体菌株在生长的某一阶段(多数为对数生长期)呈现典型的螺旋形(图 1), 能通过 0.22 μm 孔径的滤膜, 对干扰细菌细胞壁合成的青霉素类抗生素有较强的抗性, 在液体培养基中呈翻滚式运动, 在 R-2 固体培养基上的菌落形态为圆形或颗粒状, 这些特性完全符合 Brown 等对螺原体属(*Spiroplasma*)形态的描述^[1]。

尽管少量螺原体如 *S. floricola*、*S. gladiatoris* 在生长过程中并不需要甾醇^[13,14], 但是本研究中分离得到的 4 株螺原体在不含血清的培养基中不能生长, 说明这几株菌在生长过程中需要利用血清中的甾醇(表 1)。分离得到的菌株均能利用葡萄糖作为碳源, 不能利用尿素(表 1), 这些也是螺原体属的特性^[4,15]。但是对精氨酸的代谢能力, 不同菌株差异很大(表 1), CNR-2 和 CRW-1 不能代谢精氨酸, CNR-1、CNA-1 能强烈代谢精氨酸, 而蜜蜂螺原体 *S. melliferum* 也能代谢精氨酸, 说明菌株 CNR-2 和 CRW-1 的代谢特性与 *S. melliferum* 有一定差异。

螺原体的分类一直依赖于血清学分析, 而大量的研究表明, 基于 16S rDNA 序列构建系统发育树反映出的螺原体亲缘关系与经典的血清学反应的关系一致^[1,4,13], 因而在螺原体的分类鉴定中日益重要。基于 ITS 序列构建的系统发育树与基于 16S rDNA 构建的系统发育树基本一致, 但对于血清组 和血清组 中的不同亚组 ITS 序列的分辨率(resolving power)更好^[4]。将已分离菌株的 16S rDNA 序列和 ITS 序列进行比较, 结果显示 16S rDNA 序列较为保守, 而 ITS

序列无论是核苷酸数量还是组成上都有明显差异。无论 16S rDNA 还是 ITS, CNR-1、CNR-2、CNA-1 之间的差异都较小, 而 CRW-1 与这 3 株螺原体的差异较大(图 2), 说明分离自红花酢浆草的螺原体 CRW-1 与蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 和其它 3 种植物花的螺原体有明显的差异。

从基于 16S rDNA 和 ITS 序列构建的邻接树中可以看出, 螺原体 CNR-1、CNR-2、CNA-1 都与 *S. melliferum* 聚成一类, 自展值较高。从基于 16S rDNA 序列构建的邻接树中可以看出, CRW-1 与 *S. clarkii* 聚类较近, 根据 ITS 序列构建的邻接树则 CRW-1 单独形成一个分枝(图 2), 由于 GenBank 中 *S. clarkii* 的 16S rDNA 有较多未知碱基, 精确度不高, 而 ITS 序列中无未知碱基, 故我们更倾向于根据 ITS 序列构建的系统发育树来推断 CRW-1 的分类地位。

因此, 根据系统发育分析, 结合形态、生理学特性研究结果, 分离自油菜花的螺原体 CNR-1、CNR-2 和分离自杜鹃花的螺原体 CNA-1 极有可能就是蜜蜂螺原体 *S. melliferum*, 属于第 血清组第 2 亚组; 而分离自红花酢浆草的螺原体 CRW-1 极有可能是一个新种, 但还需要用血清学试验进一步证明。

参 考 文 献

- [1] Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57: 2703–2719.
- [2] Wada H, Netz RR. Model for self-propulsive helical filaments: kink-pair propagation. *Phys Rev Lett*, 2007, 99(10): 108102–108104.
- [3] Shaevitz JM, Lee JY, Fletcher DA. Spiroplasma swim by processive change in body helicity. *Cell*, 2005, 122: 941–945.
- [4] Regassa LB, Gasparich GE. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity. *Front Biosci*, 2006, 11: 2983–3002.
- [5] Clark TB. Spiroplasmas: diversity of arthropod reservoirs and host-parasite relationships. *Science*, 1982, 212: 57–59.
- [6] Davis RE. Spiroplasma associated with flower of the tulip tree (*Liriodendron tulipifera*). *Can J Microbiol*, 1978, 24: 954–959.
- [7] 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: 815–820.
- [8] 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 Microbiol Lett*, 2005, 249: 131–137.
- [9] 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.
- [10] Gasparich GE, Whitcomb RF, Dodge D, *et al.* The genus *Spiroplasma* and its nonhelical descendents: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54: 893–918.
- [11] 董秉义, 陈永萱, 许少玉, 等. 蜜蜂及植物花螺原体对蜜蜂的致病性及其血清学关系. *南京农业大学学报*(*Journal of Nanjing Agricultural University*), 1993, 16(2): 37–41.
- [12] Garnier M, Foissac X, Gaurivaud P, *et al.* Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *Life science*(Paris), 2001, 324: 923–928.
- [13] Rose DL, Tully JG, Bové JM, *et al.* A test for measuring growth responses of mollicutes to serum and polyoxyethylene sorbitan. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 527–532.
- [14] Whitcomb RF, French FE, Tully JG, *et al.* *Spiroplasma chrysopicola* sp. nov., *Spiroplasma gladiatoris* sp. nov., *Spiroplasma helicoids* sp. nov., and *Spiroplasma tabanidicola* sp. nov., from tabanid (Diptera: Tabanidae) flies. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47: 713–719.
- [15] Nunan LM, Lightner DV, Oduori M, *et al.* *Spiroplasma penaei* sp. nov. associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55: 2317–2322.

Isolation and biological characteristics of spiroplasmas from flower surface

Hanshou Yu^{*}, Kangqin Ruan, Yanling Ji, Yongxuan Chen, 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 investigate the characteristics of the spiroplasmas on the surface of flowers in China. [Methods] The spiroplasma morphology was examined by dark-field microscope and transmission electron microscopy. The biological characteristics of the spiroplasmas were investigated by using conventional culture-dependent method and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene and ITS (16~23S rDNA intergenic space) sequence comparisons. Phylogenetic analysis was performed using the software package MEGA4.0 after multiple alignment of sequence data by CLUSTAL X. [Results] Four spiroplasma isolates were obtained from three kinds of flower surface. Isolates CNR-1 and CNR-2 were from *Brassica napus*; CNA-1 and CRW-1 from *Rhododendron simsii* and *Oxalis corymbosa* respectively. All isolates grew well in R-2 liquid medium and exhibited contractive movements. The colonies of all isolates were circular and grain-like in solid medium. Through electron microscopy, all isolates exhibited helicity during their growth phase. All isolates could pass through a 0.22 μm filtrate membrane and resist to penicillin (2000 U/mL). They must grow in medium with serum. Glucose could be used as their carbon source instead of sucrose. The ability to hydrolyze arginine varied from different spiroplasmas but urea could not be hydrolyzed. The phylogenetic relationships based on 16S rDNA supported CRW-1 was close to *S. clarkii*, and others were close to *S. melliferum*. The phylogenetic relationship based on ITS sequence supported CRW-1 formed a separate clade, and others were also close to *Spiroplasma melliferum*. [Conclusion] The result indicated that spiroplasma isolate CRW-1 might be a new species and other three isolates were *S. melliferum*, but this need further support of serological test.

Keywords: spiroplasma; biological characteristics; *Brassica napus*; *Rhododendron simsii*; *Oxalis corymbosa*

Supported by the Program for Young Excellent Talents in Nanjing Agricultural University (804052)

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

Received: 25 March 2008/ Revised: 25 May 2008