

# 分离自我国蜜蜂的一株新的致病螺原体 及其基本特性

李霞 张杰 马云龙 于汉寿\*

(南京农业大学 农业部环境微生物工程重点开放实验室 江苏 南京 210095)

**摘要:** 【目的】通过分析分离自我国患病蜜蜂体内的螺原体 MF1006 的基本生物学特征, 初步确定其分类地位及致病性。【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, 运用常规螺原体分离和培养方法、分子生物学方法和血清学方法研究螺原体分离菌株可能的分类地位, 并采用饲喂接种法研究其致病性。【结果】菌株 MF1006 具有典型的螺旋形和运动性, 能通过 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜, 与我国之前发现的引起蜜蜂螺原体病的参比菌株 *Spiroplasma melliferum* CH-1 的基本生物学特征差异较大。*S. melliferum* CH-1 抗血清对其没有抑制作用。根据 16S rDNA、ITS 序列构建系统发育树显示, 菌株 MF1006 与在法国发现的引起蜜蜂“五月病”的 *Spiroplasma apis* 的亲缘关系最近。此外, 菌株 MF1006 对供试意蜂有较强的致病性。【结论】分离菌株 MF1006 是在我国蜜蜂体内发现的除 *S. melliferum* 以外的另一种致病螺原体。

**关键词:** 螺原体, 蜜蜂, 生物学特性, 致病性

## A new pathogenic spiroplasma isolate obtained from honeybee in China and its basic properties

LI Xia ZHANG Jie MA Yun-Long YU Han-Shou\*

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

**Abstract:** [Objective] The purpose of this study was to characterize the isolate MF1006, and

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870002)

\*通讯作者: Tel: 86-25-84395531; 信箱: yuhans@njau.edu.cn

收稿日期: 2011-08-25; 接受日期: 2011-11-17

to determine the taxonomy and pathogenicity of the spiroplasma obtained from diseased honeybees in China. **[Methods]** The spiroplasma morphology was examined by dark-field microscope and transmission electron microscope. The biological characteristic of the spiroplasma was investigated by using conventional culture-dependent method and molecular biology and serological methods. We determined the spiroplasma pathogenicity through feeding tests. **[Results]** MF1006 exhibited typical properties of spiral morphology and mobility. It was able to pass through membrane filters with pores size of 220 nm. This isolate was very different from the previous reported domestic isolate *Spiroplasma melliferum* CH-1 which caused honeybee spiroplasmosis seriously. *S. melliferum* CH-1 antiserum could not inhibit MF1006. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA and ITS revealed that MF1006 was close to *S. apis* which was found in France and associated with a lethal infection (“May disease”) for honeybee. In addition, MF1006 expressed strong pathogenicity to *A. mellifera*. **[Conclusion]** MF1006 was the second pathogenic spiroplasma to honeybees in China.

**Keywords:** Spiroplasma, Honeybee, Biological characteristics, Pathogenicity

螺原体是一类螺旋状、能运动、无细胞壁的原核生物。它们大多分离自昆虫和扁虱,在几种植物体内、花表和高等的无脊椎动物中也可以分离到<sup>[1-2]</sup>。螺原体和宿主的关系可分为共生 (Mutualism)、互生 (Commensalism) 和致病 (Pathogenic) 3 种,其中大多为共生或互生关系<sup>[3]</sup>。

蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 是 1976 年 Clark 等在美国 Maryland 州首次发现的,它能引起蜜蜂的“螺原体死亡病” (Spiroplasmosis),导致春季蜜蜂大量死亡<sup>[4]</sup>;此外,在法国也发现另外一种螺原体——*Spiroplasma apis* 能引起蜜蜂的“五月病” (May disease)<sup>[5-6]</sup>,两者对蜜蜂的养殖业均造成较大的损失。我国于 1986 年从病蜂中首次分离到螺原体,至今已从各地蜜蜂和植物花上分离到众多螺原体菌株,它们大多与 *S. melliferum* 的亲缘关系最近,属于螺原体属中第 I 血清组的第 2 亚组<sup>[7-10]</sup>。然而,研究发现在许多地区(特别是在美国和法国)的许多种植物花表面上均发现有 *Spiroplasma melliferum* 以外的不同种螺原体<sup>[11-12]</sup>。那么,我国蜜蜂体内是否会存在其它种类的螺原体? 它们对蜜蜂这种自然界主要的授粉昆虫会产生什么影响? 引起我国蜜蜂致病的螺

原体是否仅仅是 *S. melliferum*?

本文在患病蜜蜂体内分离到一株生长速度极快、培养过程中几乎看不到菌体缠绕现象的螺原体,通过对其形态、基本生物学特性、血清学、分子生物学特性及致病性等方面的研究,初步确定其分类地位及致病性,为进一步研究蜜蜂螺原体的侵染循环、致病机理及蜜蜂爬蜂病的有效防治提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 供试螺原体菌株 MF1006 分离自患病的意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*), 其宿主于 2010 年 5 月采集自南京市晨光村蜂场。*Spiroplasma melliferum* CH-1 为对照菌株,由本实验室保存。

**1.1.2 抗血清:** *S. melliferum* CH-1 抗血清及阴性血清由本实验制备并保存; HRP 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (H+L) 为南京鼎国生物技术有限公司产品。

**1.1.3 主要试剂:** 牛心浸出液冻干粉 (PPLO)、Chelex-100、PCR 扩增所用酶和试剂同文献[13]; TIANamp Bacteria DNA Kit 购自南京丁贝生物科

技术有限公司; TMB (四甲基联苯胺)购自南京鼎国生物技术有限公司。

**1.1.4 主要仪器:** Olympus BH-2 暗视野显微镜、Olympus Tokyo 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; H7650 透射电子显微镜, 日本日立公司; Himac CR 21 GII 高速冷冻离心机, 日本日立公司; JY92-II N 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; DNM-9602 酶标仪, 北京普朗新技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 螺原体的分离及纯化:** 螺原体分离培养所用的培养基为 R2 培养基<sup>[7]</sup>。分离前先将蜜蜂表面严格消毒, 再取其腹部, 具体分离方法同文献[14]。分离菌株用梯度稀释法进行纯化。

**1.2.2 螺原体的形态及基本生物学特性:** (1) 螺原体的形态及运动性观察: 采用负染法在透射电子显微镜下观察菌株 MF1006 对数生长期的形态; 利用倒置显微镜观察其菌落形态, 并测量其大小, 方法同文献[13], 在暗视野显微镜下观察分离菌株 MF1006 的运动性。

(2) 螺原体生长曲线的测定: 参照文献[13], 接种 100  $\mu\text{L}$  初始浓度为 100 CCU/mL 的螺原体菌液于 0.9 mL 的新鲜培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养, 利用颜色改变单位(CCU)法计数, 同时用暗视野显微镜每 6 h 观察一次活动菌体数及菌体形态变化情况。3 次重复。

(3) 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[9,13]。

**1.2.3 螺原体的血清学分析:** (1) 代谢抑制试验: 将 1 mL 抗血清在无菌离心管中做 2 倍稀释至第 10 管, 各取 25  $\mu\text{L}$  滴入 96 孔板 1-10 孔, 第 11、12 孔分别以不加抗血清的抗原孔和不加供试菌株的培养基孔作为菌液对照和空白对照, 然后向

1-11 孔加入 50  $\mu\text{L}$  供试菌株的培养液(100-1 000 CCU/0.05 mL), 用 R2 培养基将各孔滴加至 200  $\mu\text{L}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养, 当培养基空白对照颜色未变化而菌液对照颜色变黄时, 立即判断结果, 即记录能抑制颜色变化的抗血清的最高稀释度, 作为 *S. melliferum* CH-1 抗体对供试菌株的代谢抑制效价。3 次重复。

(2) 菌体变形试验: *S. melliferum* CH-1 抗血清对供试菌株菌体变形试验效价的测定方法参见文献[10]。

(3) 间接 ELISA: 间接 ELISA 操作参照文献[15]方法进行, 以 OD 值大于 0.40 判为阳性。

**1.2.4 螺原体的 16S rDNA 和 ITS 序列的 PCR 扩增与序列测定:** 采用 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取螺原体的总 DNA。用 27F/1492R 引物和 ITS-FITS-R 引物<sup>[9]</sup>, 以螺原体总 DNA 为模板分别扩增其 16S rDNA 序列和 ITS 序列。PCR 反应体系: 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (25 mmol/L) 1.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , Primer 各 2  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 补水至 25  $\mu\text{L}$ 。16S rDNA PCR 扩增程序: 96  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 51  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。ITS 序列 PCR 扩增程序: 96  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 59  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 与 Marker 亮度相同或更亮的扩增产物送交北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

**1.2.5 螺原体的致病性:** 将健康的意蜂置于 38.5 cm $\times$ 27.0 cm $\times$ 30.0 cm 的白纱笼中, 每笼 100 只, 停食 3-4 h 后, 饲喂含有对数生长期菌液的蔗糖水 3 d, 12 h 一次, 对照组饲喂含有新鲜培养基的蔗糖水, 之后各笼均饲喂无菌的蜂蜜水, 每组 3 个重复。室温下通风处饲养 15 d, 逐日观察记录死蜂情况, 计算死亡率和校正死亡率。将处理组和对照组的死蜂随机挑取 15 只, 进行螺原体的再分离, 并计算再分离率。为完成 Koch's 法

则,对再分离的螺原体进行纯化培养,利用暗视野显微镜观察其形态特征,同时采用 Chelex-100 树脂法提取螺原体的总 DNA<sup>[16]</sup>,以 27F/1492R 通用引物扩增其 16S rDNA 序列,扩增产物经测序后,在 GenBank 中进一步比对验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离及纯化

2010 年 5 月,从南京市晨光村蜂场采集在草丛中只能爬行而不能飞翔的患病蜜蜂进行分离、培养,发现在所分离菌株中 MF1006 生长速度极快,4~5 d 便进入衰亡期,丧失螺旋形态,而 *Spiroplasma melliferum* CH-1 菌株培养 7 d 后仍可见缠绕伸长的菌丝形态, MF1006 很可能为一株新的致病菌株,因此利用梯度稀释法将其纯化 3 次后获得纯培养物,以进一步鉴定。

### 2.2 分离菌株的形态及基本生物学特征

对数生长期的菌株 MF1006 在暗视野显微镜下呈典型的螺旋状,做快速翻滚式运动;在倒置显微镜下, MF1006 菌落形态较大且不规则,菌落核心隆起部分直径约 70~110  $\mu\text{m}$ ,边缘扩散至 120~140  $\mu\text{m}$  (图 1A);在透射电镜下呈丝状螺旋形,直径在 150 nm 左右,菌体短小,多数为 5~6 个螺旋(图 1B)。

菌株 MF1006 和参比菌株 *Spiroplasma melliferum* CH-1 的生长曲线如图 2 所示,菌株 MF1006 的对数生长期和稳定生长期持续时间都相对较短,致使分离菌株 MF1006 的生长周期明显短于 *Spiroplasma melliferum* CH-1。

菌株 MF1006 在 R2 液体培养基中生长良好,30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 18 h 就可使培养基变黄, *S. melliferum* CH-1 则需要 36 h;两者均可通过孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜;在含 2 000 U/mL 氨苄青霉素钠的 R2 液体培养基中均生长良好;在不含胎牛血清的 R2 培养基中,均不能生长。两者对碳水化合物、精氨酸及尿素的利用能力如

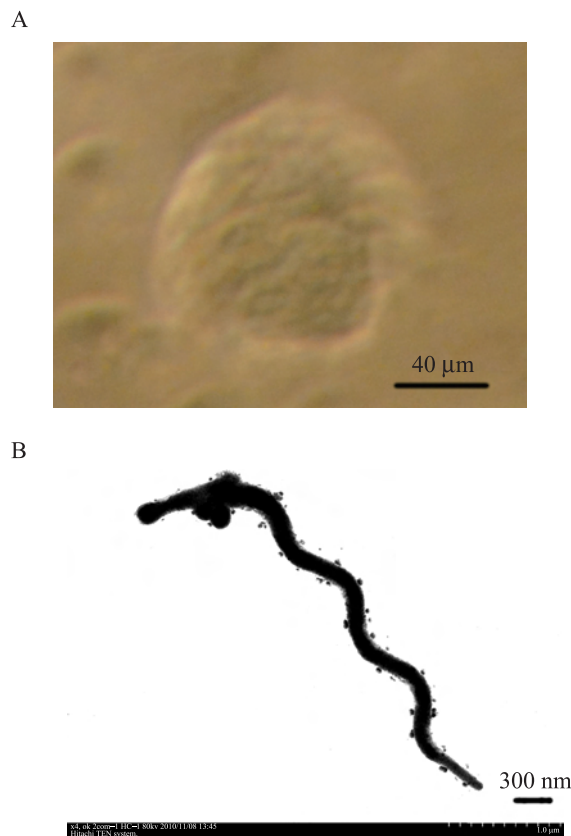


图 1 分离菌株 MF1006 菌落形态(A)和生长对数期菌体显微形态(B)

Fig. 1 Colonies (A) and electron micrograph (B) of spiroplasma isolate MF1006 in the exponential phase

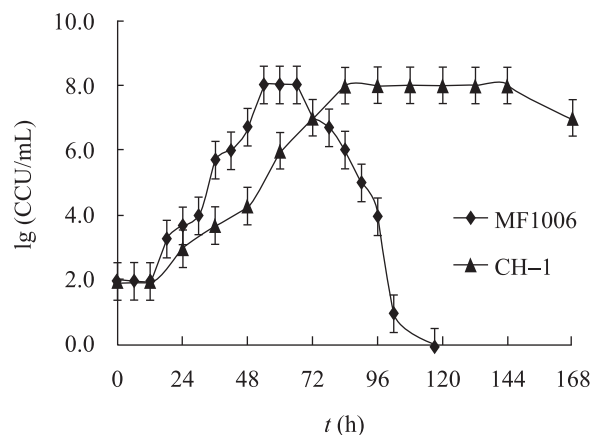


图 2 螺原体分离菌株 MF1006 和 *Spiroplasma melliferum* CH-1 在 R2 培养基中的生长曲线(30  $^{\circ}\text{C}$ )

Fig. 2 Growth curves of spiroplasma isolates MF1006 and CH-1 in R2 medium (30  $^{\circ}\text{C}$ )

表 1 供试菌株对几种物质的代谢特性  
Table 1 Material utilization of spiroplasma isolates

菌株 Strains	单糖 Monosaccharide					双糖 Disaccharid			其它物质 Other materials	
	葡萄糖 Glucose	D-果糖 D-fructose	山梨糖 Sorbose	D-木糖 D-xylose	D-半乳糖 D-galactose	甘露醇 Mannitol	蔗糖 Sucrose	乳糖 Lactose	精氨酸 Arginine	尿素 Urea
MF1006	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
CH-1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

注: +: 阳性反应, 表示能利用; -: 阴性反应, 表示不能利用.  
Note: +: Positive response; -: Negative response.

表 1 所示, 分离菌株 MF1006 的生理学特性与参比菌株 *S. melliferum* CH-1 表现出明显不同, 但其基本生物学特性完全符合螺原体属的描述, 说明分离菌株 MF1006 确实属于螺原体属, 它可能是我国蜜蜂体内不同于 *S. melliferum* 的一株螺原体。

2.3 分离菌株的血清学分析

在代谢抑制试验中, *S. melliferum* CH-1 抗血清同源反应效价为 256, 对菌株 CH-1 的代谢有明显抑制作用, 而对菌株 MF1006 的代谢几乎没有抑制作用, 菌株 MF1006 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 *S. melliferum* CH-1 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 MF1006 能在各种抗体浓度下良好生长, 菌体很少变形; 在间接 ELISA 中, *S. melliferum* CH-1 抗血清与自身抗原反应的平均 OD 值为 0.779, 而与异源抗原 MF006 反应较弱, OD 值

接近于阴性对照。3 种血清学试验的结果一致表明: 菌株 MF1006 与 *S. melliferum* CH-1 的差异较大, 可能不属于同一个种(表 2)。

2.4 分离菌株的系统发育分析

通过 PCR 扩增后, 得到 16S rDNA、ITS 序列, 片段大小分别为 1 415 bp 和 1 207 bp。将测序所获序列提交到 GenBank, 获得登录号分别为 JN377496 和 JN377497。利用 BLAST 软件将所获序列与 GenBank 数据库的序列进行同源性比较, 结果显示: 菌株 MF1006 的 16S rDNA 序列和 ITS 序列均与 *S. apis* 同源性较高, 达 99%。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, 应用 MEGA 4.0 软件进行聚类分析, 并以邻接法构建系统发育树<sup>[16]</sup>。图 3 为基于 16S rDNA 构建的系统发育树<sup>[1]</sup>, 由图 3 可知, 菌株 MF1006 与 *S. apis* 聚为一支, 自展支持率为 94%。根据 ITS 序列构建的系统发育树的拓扑结构和 16S rDNA 的相似, 说明菌株 MF1006 可能是 *S. apis*。

表 2 *Spiroplasma melliferum* 抗血清对供试菌株的 3 种血清学方法检测结果  
Table 2 Detection results of three serological methods about antibody of *Spiroplasma melliferum* against spiroplasma isolates

血清学试验 Serological test	螺原体菌株 Spiroplasma isolates	
	<i>S. melliferum</i> CH-1	MF1006
生长抑制试验 Metabolic inhibition test (titer)	256	2
菌体变形试验 Deformation test (titer)	2 048	0
酶联免疫吸附试验 ELISA (OD)	0.779±0.039	0.141±0.001

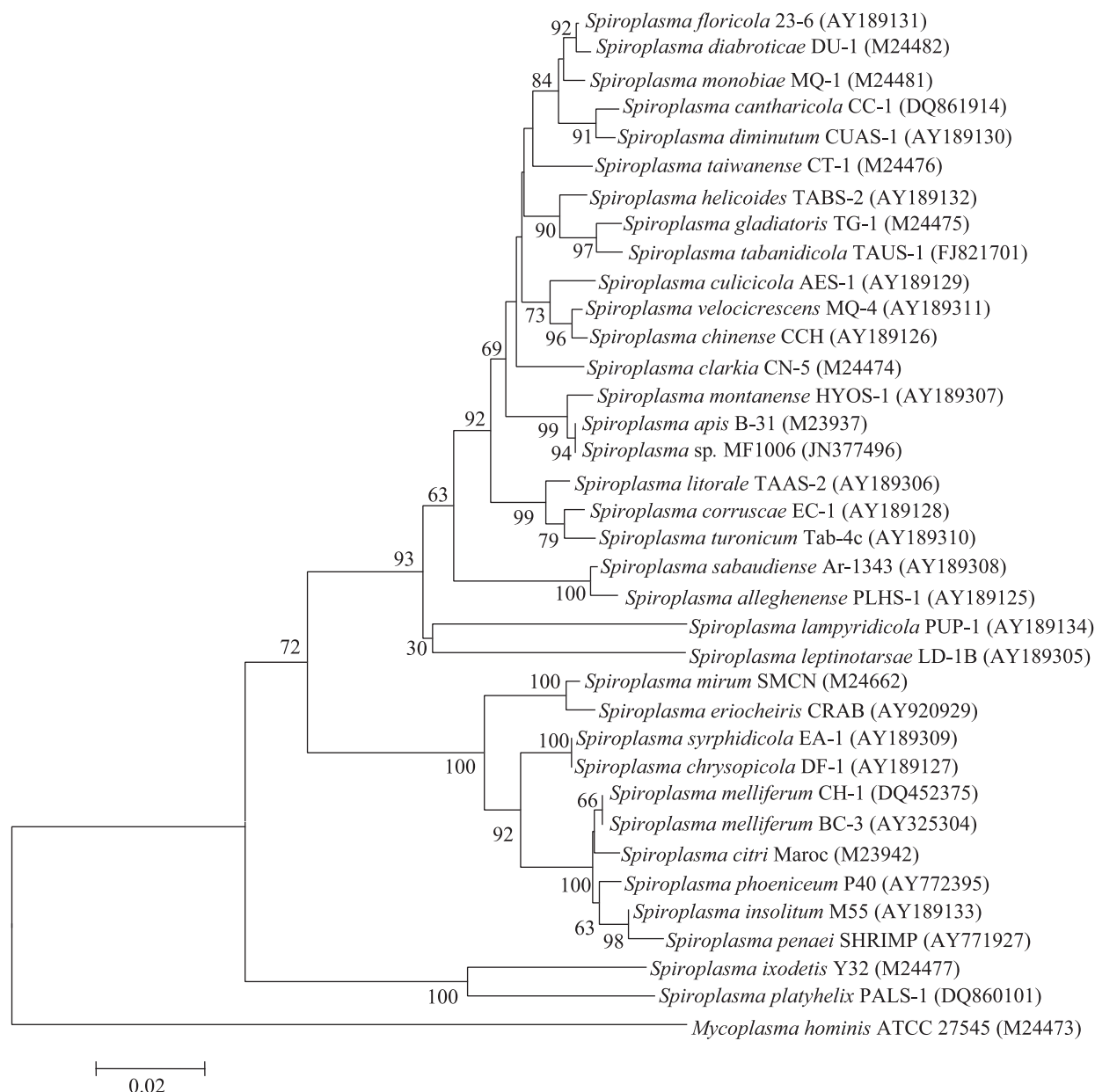


图3 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences showing the position of the strain MF1006 and related strains

Note: Numbers at each branch point indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1 500 replicates. The GenBank accession number is showed in parentheses. Bar: 0.02 substitutions per nucleotide.

## 2.5 分离菌株的致病性研究

通过饲喂新鲜菌液法对螺原体进行致病性研究,发现感染 MF1006 菌液的意大利蜜蜂在第 5 天出现症状:意蜂表现为骚动不安,在笼中乱飞乱撞,随后便不能飞起,慢慢爬行,直至抽搐而

死。发病症状与自然状态下患“爬蜂病”的蜜蜂症状以及在相同实验条件下感染 *S. melliferum* CH-1 菌液的意蜂症状相似,但发病速度比感染 *S. melliferum* CH-1 菌液的意蜂快,第 5 天时已有 59.02% 的意蜂死亡。到第 9 天时,感染 MF1006

表 3 螺原体对意大利蜜蜂的致病性  
Table 3 Pathogenicity of spiroplasma isolates to honeybee (*Apis mellifera*)

饲喂处理 Feeding treat- ment	出现症状的时间 Time of onset of symptoms (d)	死亡率 Mortality rate (%)	校正死亡率 Corrected mortality (%)	1%显著水平 1% significance level	再分离率 Rate of re-isolation (%)
MF1006	5	61.40±4.72	24.90	A	86.7
CH-1	5	55.03±4.48	18.53	A	66.7
Medium (CK)	—	36.50±1.70	—	B	0

菌液的意蜂校正死亡率达到 24.90%，而感染阳性对照菌株 *S. melliferum* CH-1 的意蜂校正死亡率才达到 18.53%，两者与对照组意蜂(饲喂新鲜培养基)在 1%显著水平下相比差异均极显著(表 3)。以上结果表明，螺原体 MF1006 对意蜂具有较强的致病性。

本研究在感染 MF1006 和 *S. melliferum* CH-1 菌液致死的意蜂的腹部中，均能分离到螺原体。再分离菌株在暗视野显微镜下呈典型的螺旋状，做翻滚式运动。利用 27F/1492R 通用引物以螺原体总 DNA 为模板扩增得到其 16S rDNA 序列，经测序、比对后，实验结果表明再分离菌株与原菌株 MF1006 相同，均与 *S. apis* 的同源性最高，二者为同一种螺原体，说明分离菌株 MF1006 确实是意蜂死亡的病因。

3 讨论

蜜蜂是自然界最主要的授粉昆虫，它们除了为人类提供众多营养丰富的蜂产品之外，还能为农作物授粉，也具有重要的经济价值和社会效益。此外，蜜蜂授粉对于保持生物多样性和维持生态系统的平衡有着极为重要的作用。然而春季蜜蜂的“爬蜂病”几乎是年复一年的发生，轻则削弱蜂群，重则使蜜蜂全部死亡。引起蜜蜂“爬蜂病”的病原又包括细菌、孢子虫、花粉、病毒、螺原体等多种，它们均能引起蜜蜂的“爬蜂”现象，因此，准确鉴定出蜜蜂发病的病因，了解春季发病蜂群的特征对于蜜蜂疾病的正确防治非常必要。

本研究在春季发病蜂群随机采集的样本中，分离到一株生长速度极快、生命周期较短的螺原体菌株 MF1006。根据螺原体的分类标准，从形态学、基本生物学特性、血清学、分子生物学特性几个方面对其进行了研究。根据其形态学、生理生化特征及血清学特性的研究结果，发现分离菌株 MF1006 与我国之前发现的引起蜜蜂“爬蜂病”的 *S. melliferum* CH-1 相比差异显著，*Spiroplasma melliferum* CH-1 的抗血清对菌株 MF1006 也没有抑制作用。初步确定分离菌株 MF1006 是分离自病蜂体内的一株新的螺原体菌株，与 *Spiroplasma melliferum* 亲缘关系较远。

在 2004 年召开的国际原核生物分类委员会上提出螺原体多相分类的概念，其核心就是系统发育分析。本研究根据 16S rDNA 序列构建了系统发育树，结果显示菌株 MF1006 与 *S. melliferum* 亲缘关系较远，而与 *S. apis* 亲缘关系较近，以 94%自展支持率聚在一起。由于 16S rDNA 序列较为保守，在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，我们又选择了 ITS 序列进行分析，结果基于 ITS 序列构建的系统发育树的拓扑结构与 16S rDNA 的相似。因此推测菌株 MF1006 可能是 *S. apis*，这是从我国蜜蜂体内分离的不同于 *S. melliferum* 的另一种螺原体。

本研究采用饲喂菌液的方法对分离菌株 MF1006 的致病性做了进一步的研究。由于发病蜜蜂数量较难统计，如有些蜜蜂感染菌液后病情较轻，我们在致病性试验中采用记录每天的死蜂

数来观察螺原体对蜜蜂的致病力强弱, 结果发现分离菌株 MF1006 对意蜂有较强的致病性。在随机挑选的死蜂体内, 有 86.7% 的意蜂腹部中分离到螺原体, 而培养基对照组中的死蜂内未能分出(表 3)。经过进一步分子生物学特性的研究, 发现死蜂内再分离物与饲喂的 MF1006 菌株为同一种螺原体, 从 Koch's 法则角度充分证明了螺原体 MF1006 是蜜蜂死亡的病因。

致病菌株 MF1006 的发现丰富了对我国蜜蜂“爬蜂病”病原的认识。此外, 阮康勤等在感染 *S. melliferum* 致死的蜜蜂的头、胸、腹、足等不同部位都检测到了螺原体的存在<sup>[14]</sup>; 王文等从我国患病的中华绒螯蟹、小龙虾、对虾等淡水生物的血淋巴、消化道及肌肉等组织内也相继检测到其致病因子——螺原体, 并经 16S rDNA 系统发育分析发现分离自不同水生动物体内的螺原体亲缘关系都较近, 均与 *S. mirum* 聚为一类<sup>[16,18-19]</sup>。本研究中从病蜂体内分离到的螺原体菌株 MF1006 对其宿主蜜蜂的作用机理及其在自然界中的侵染循环还有待进一步研究。

**致谢:** 本研究在电子显微镜观察过程中得到南京农业大学生命科学实验中心胡冰老师的热心帮助, 在此表示真诚的感谢! 感谢南京农业大学学生科研训练(SRT)小组成员李晶晶、李睿、周惠民的帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Regassa LB, Gasparich GE. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2006, 11: 2983–3002.
- [2] Clark TB. Spiroplasmas: diversity of arthropod reservoirs and host-parasite relationships[J]. *Science*, 1982, 217(4554): 57–59.
- [3] Gasparich GE. Spiroplasma and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts[J]. *Biologicals*, 2010, 38(2): 193–203.
- [4] Clark TB. *Spiroplasma* sp., a new pathogen in honey bees[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1977, 29(1): 112–113.
- [5] Mouches C, Bov JM, Tully JG, et al. *Spiroplasma apis*, a new species from the honey-bee *Apis mellifera*[J]. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiology*, 1983, 134A(3): 383–397.
- [6] Mouches C, Bove JM, Albisetti J. Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in southwestern France[J]. *Annals of Microbiology*, 1984, 135A(1): 151–155.
- [7] 陈永萱, 薛宝娣, 郭永红. 蜜蜂螺原体基本性状的研究[J]. *中国科学(B 辑)*, 1988, 31(2): 815–820.
- [8] 董秉义, 陈永萱, 许少玉, 等. 蜜蜂和植物花螺原体对蜜蜂的致病性及其血清学关系[J]. *南京农业大学学报*, 1993, 16(2): 37–41.
- [9] 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[J]. *微生物学报*, 2008, 48(9): 1141–1146.
- [10] 回丽静, 钟志平, 胡冰, 等. 分离自蜜蜂(*Apis mellifera*)的三株螺原体的基本特性[J]. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1366–1372.
- [11] Hackett KJ, Clark TB, Hicks A, et al. Occurrence and frequency of subgroup 1–6 spiroplasma in arthropods associated with old fields in Maryland and Virginia[J]. *Israel Journal of Medical Sciences*, 1984, 20(10): 1006–1008.
- [12] Davis RE. Spiroplasma associated with flowers of the tulip tree (*Liriodendron tulipifera* L.)[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978, 24(8): 954–959.
- [13] 刘淑园, 于汉寿, 苏萌, 等. 黄道蚜蝇螺原体的分离及其基本生物学特性[J]. *微生物学报*, 2009, 49(6): 786–791.
- [14] 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[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 695–699.
- [15] 回丽静. 膜翅目昆虫螺原体的研究及我国部分螺原体遗传多样性分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010.
- [16] Wang W, Gu W, Ding ZF, et al. A novel spiroplasma



- pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapod), in China[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249(1): 131–137.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [18] Wang W, Gu W, Gasparich GE, et al. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(4): 703–708.
- [19] Liang TM, Li XL, Du J, et al. Identification and isolation of a spiroplasma pathogen from diseased freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, in China: A new freshwater crustacean host[J]. Aquaculture, 2011, 318(1/2): 1–6.

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师名课”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!