

牛虻螺原体的基本生物学特性

俞徐斌 于汉寿* 史明乐 周丹霞

(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 江苏 南京 210095)

摘要: 【目的】通过分析分离自牛虻体内的螺原体 NM1108-1 和 NM1108-5 的基本生物学特性, 了解分离菌株可能的分类地位, 为进一步研究螺原体与宿主的相互作用提供信息。【方法】运用常规方法分离培养牛虻螺原体, 利用暗视野显微镜和透射电镜观察分离菌株的形态特征, 结合其生理生化特性及系统发育学特性研究初步确定分离菌株的分类地位。【结果】从牛虻中分离到大量螺原体, 以其中两个代表性的菌株 NM1108-1 和 NM1108-5 为主要研究材料, 在暗视野显微镜下观察其形态均呈螺旋状, 做翻滚式运动; 两者都能利用葡萄糖、果糖、蔗糖作为碳源, 不利用尿素和精氨酸, 对四环素比较敏感, 对青霉素不敏感; 系统发育树显示, 分离到的牛虻螺原体菌株 NM1108-1 和 NM1108-5 属于 *Apis* 一支但属于不同亚支, NM1108-1 与 *S. turonicum* 聚为一支; NM1108-5 与 *S. gladiatoris* 聚为一支。【结论】两株牛虻螺原体 NM1108-1 和 NM1108-5 的分类地位分别初步被确定为 *S. turonicum* 和 *S. gladiatoris*, 这是首次报道我国牛虻体内的螺原体。

关键词: 螺原体, 牛虻, 系统发育分析, 生物学特性

The basic biological characteristics of spiroplasma isolated from gadfly

YU Xu-Bin YU Han-Shou* SHI Ming-Yue ZHOU Dan-Xia

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

Abstract: [Objective] The purpose of this research was to analyze the biological characteris-

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: 2012-06-25; 接受日期: 2012-09-27

tics of isolates NM1108-1 and NM1108-5 obtained from gadfly in China, and to determine the taxonomy of the two isolates. It provided more information about interaction between spiroplasma and their host. **[Methods]** The gadfly spiroplasmas were isolated and cultured by conventional methods. Dark field and transmission electron microscopy were used to examine the morphology and movement of spiroplasma isolates. The taxonomy of the two isolates was evaluated according to their biological and phylogenetic characteristics. **[Results]** A large number of spiroplasmas were isolated from gadfly, and two representative strains NM1108-1, NM1108-5 exhibited helical form in logarithmic phase. Both the spiroplasmas from gadfly could use glucose, sucrose and D-fructose as a carbon and resisted to penicillin, but did not hydrolyse urea or arginine. The phylogenetic analysis based on 16S rDNA and ITS sequences showed that both isolates NM1108-1 and NM1108-5 belonged to the Apis clade but were divided into two different branches. NM1108-1, NM1108-5 were clustered into *S. turonicom*, *S. gladiatoris* respectively. **[Conclusion]** The isolates of NM1108-1 and NM1108-5 were initially determined as *S. turonicom* and *S. gladiatoris* respectively according to their biological and phylogenetic characteristics. This was the first report about the spiroplasmas from gadfly in China.

Keywords: Spiroplasma, Gadfly, Phylogenetic analysis, Biological characteristics

螺原体(Spiroplasma)是一种螺旋状、无细胞壁,能独立生活和自我复制的最简单的一类原核生物,它的基因组非常小(780–2 220 kb)^[1]。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^[2–3]。螺原体主要存在于昆虫体内、植物体内和植物花表面,它和宿主的关系可分为互利共生(Mutualism)、偏利互生(Commensalism)和寄生(Parasitism) 3种,其中大多数为共生或者互生关系^[4]。

虻科昆虫体内具有丰富的螺原体资源,在美国的 Maryland,首次发现虻科昆虫螺原体^[5]。目前在美国和法国,已有大量的螺原体从虻科昆虫,如马蝇和鹿蝇体内分离得到^[6–7]。1984年,Clark 和其同事报道,虻蝇类是螺原体最富有的资源库,仅虻科类昆虫中分离到的螺原体就已经覆盖了 11 个螺原体血清组^[8],到 2009 年,又新增加了 8 个血清组;2007 年,Whitcomb 等在哥斯达黎加的虻科昆虫里分离得到螺原体,血清组为

XXXV–XXXVIII^[9];2009 年,Regassa 等在澳大利亚的虻科昆虫里分离得到螺原体,血清组为 XXXIX–XLII^[10],这充分说明了螺原体属内具有很丰富的生物多样性和地理多样性。

系统发育学研究表明,从虻科宿主中分离到的菌株包括 *S. helicoides*、*S. apis*、*S. clarkii*、*S. corruscae*、*S. litorale*、*S. montanense*、*S. tabanidicola*、*S. turonicom* 和 *S. gladiatoris* 均属于 Apis 这一大支,并且这几株菌株之间亲缘关系较近^[11];其中 *S. turonicom* 标准菌株和 *S. gladiatoris* 标准菌株分别是来自法国和美国的虻科宿主 *Haematopota pluvialis* 和 *Tabanus gladiator* 体内分离得到^[12]。

目前还没有我国虻科昆虫螺原体的相关报道,本研究以牛虻体内分离到的两个螺原体菌株为研究对象,通过形态学特性、生理生化特性研究以及系统发育学分析初步确定其分类地位,为进一步研究螺原体与宿主间相互作用提供信息。

1 材料与方法

1.1 牛虻螺原体的分离及纯化

分离所用的培养基是由 C-3G 简化后的 R2 培养基^[13]。主要成分是 PPLO broth (1.5%, Difco 公司)、标准胎牛血清(体积分数 15%)、蔗糖 (100 g/L) 和酚红, pH 7.2–7.4。

从牛身上采集吸取牛血的牛虻样本。将整个牛虻用 1% 的次氯酸钠溶液进行表面消毒 3–5 min, 再用无菌水洗涤 4–5 次, 用无菌镊子将牛虻从腹部剖开, 取其腹部, 在 6 mL 的 R2 培养基内碾碎, 并浸泡 2 min; 用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜加压过滤; 取将滤液放到新鲜 R2 培养基中于 32 °C 培养箱中培养; 逐日观察培养基颜色变化, 并用暗视野显微镜(Olympus BH-2 型)观察^[13]。用梯度稀释法对分离到的菌株进行纯化^[14]。

1.2 宿主鉴定

宿主牛虻的鉴定由南京农业大学植物保护学院昆虫学系协助进行。

1.3 牛虻螺原体的形态及运动性观察

暗视野显微镜观察, 取 15 μL 处于对数期的螺原体菌液于载玻片上, 小心盖上盖玻片, 在暗视野显微镜下观察其个体形态及运动方式。

将 100 μL 对数生长期菌液涂布在固体 R2 培养基上, 32 °C 培养, 待培养基颜色变黄后, 将平板放在倒置显微镜(Olympus Tokyo)下观察牛虻螺原体固体菌落形状与大小。

透射电镜(Hitachi H7650 型)观察, 取 1 mL 处于对数期的螺原体培养液, 用等体积 3% 戊二醛溶液固定, 于 4 °C 静置 2–3 d; 吸一滴固定后液体置于铜网上, 静置 2 min; 用滤纸吸干溶液, 用 15 g/L 磷钨酸钠溶液染色 40 s, 再用滤纸吸干, 风干后用透射电子显微镜观察。

1.4 牛虻螺原体生理生化特性

生理生化特性包括螺原体对血清的需求, 对

碳水化合物的利用情况, 以及对抗生素的敏感性等。

取 50 μL 对数生长期的螺原体接种于不含血清的 R2 培养基中, 32 °C 静置观察培养, 连续转管 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。

将 50 μL 对数生长期的螺原体分别接种于含有 0.5% 单糖的基本培养基以及 1% 的双糖基本培养基中, 其中单糖有: 葡萄糖、D-果糖、D-木糖、山梨糖、D-半乳糖、甘露醇; 双糖有: 乳糖、蔗糖, 单糖双糖均经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 以不加任何糖的基本培养基和 R2 培养基作为对照, 将变黄的培养基转管移到同处理的培养基中再培养, 如此转管 3 次以上, 每个处理 3 次重复。

抗生素敏感性试验方法参照文献[14]稍作修改, 接种量为 0.3%, 测定其最低抑制浓度 MIC (Minimum inhibition concentration)值和最低杀菌浓度 MBC (Minimum bactericidal concentration)值。

1.5 牛虻螺原体的系统发育学分析

用 Chelex-100 法提取牛虻螺原体基因组 DNA^[15], 设计合成引物, 扩增 16S rDNA、ITS (其中包括 16S rDNA 及 23S rDNA 部分序列、16S–23S rDNA 间隔区)基因片段。PCR 反应体系: 10 \times Buffer 2.5 μL (含 25 mmol/L Mg^{2+}), dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , Primer 各 2 μL , 模板 DNA 1 μL , Taq 酶(5 U/ μL) 0.3 μL , 补水至 25 μL 。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 将含有单一明亮条带的样本送交北京华大基因科技股份有限公司测序。将测序结果与已公布的螺原体序列比对并导出序列, 用 ClustalX 1.8 软件进行多重比对, 并用 MEGA 4.0 软件绘制系统发育树图。扩增 16S rDNA、ITS 序列所用引物为通用引物^[16], 如表 1 所示。

表 1 引物序列以及对应的 PCR 反应条件
Table 1 Primer sequences and reaction conditions

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增程序 Reaction conditions
16S-L	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 51 °C 40 s, 72 °C 2 min,
16S-R	TACCTTGTTACGACTT	35 cycles; 72 °C 10 min
ITS-L	CCCCTTATGTCTTGGGCTAC	94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 59 °C 40 s, 72 °C 2 min,
ITS-R	CTATCTCCAGGTTTCGATTGG	35 cycles; 72 °C 10 min

2 结果与分析

2.1 牛虻螺原体的分离及纯化

在所有采集到的牛虻中, 每个牛虻个体基本上都能分离得到螺原体, 分离率达 100%, 共分离到 85 株螺原体, 以其中两个分离自不同牛虻个体的代表性分离物 NM1108-1、NM1108-5 作为研究对象, 并用梯度稀释法纯化得到纯培养物。

2.2 宿主鉴定

经鉴定, 分离到螺原体的宿主牛虻为嗜牛原虻 *Tabanus bovinus* Linnaeus (双翅目 Diptera, 虻科 Tabanidae, 原虻属 *Tabanus*)。

2.3 牛虻螺原体的形态

分离菌株在 R2 液体培养基中生长良好, 32 °C 静置培养, 两株菌培养 12 h, 培养基由红变黄, 在暗视野显微镜下可见大量螺旋丝状螺原体, 并且它们在 R2 培养基中呈翻滚式运动(图 1)。牛虻螺原体在固体 R2 培养基上培养 2 d 后, 固体培养基由红色变成黄色, 在倒置显微镜下观察,

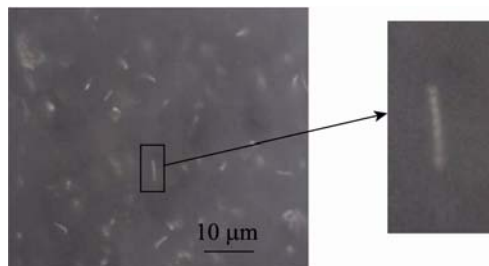


图 1 暗视野显微镜下观察到的螺原体菌株 NM1108-1 形态

Fig. 1 Micrograph of spiroplasma isolate NM1108-1 under dark-field microscopy

其菌落形态不规则, 两个牛虻螺原体菌株之间的菌落大小差异不大, 直径大小约 90 μm (图 2)。

采用负染法在透射电子显微镜下观察牛虻螺原体的形态结构(图 3)。牛虻螺原体菌株在生长对数期均可见丝状螺旋形菌体, 在较高的放大倍数下可见单层膜结构, 菌株 NM1108-1 的长度约为 3.5 μm, 菌株 NM1108-5 的长度约为 4.5 μm, 螺旋数在 5 个左右, 直径均在 180 nm 左右。

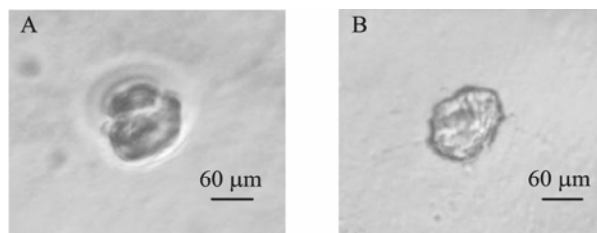


图 2 螺原体 NM1108-1 (A) 和 NM1108-5 (B) 的菌落形态 (R2 培养基 32 °C)

Fig. 2 Colonies of NM1108-1 (A) and NM1108-5 (B)

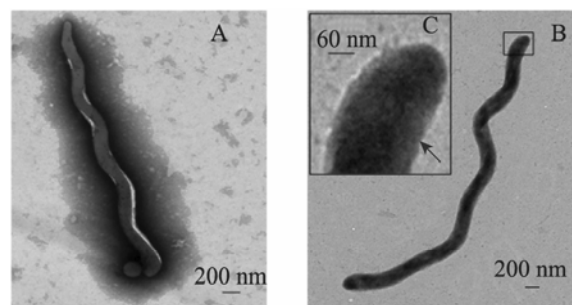


图 3 螺原体经负染后在透射电镜下的形态

Fig. 3 Electron micrograph of negative-stained isolates
注: 箭头表示单层膜结构. A: NM1108-1 (4 000×); B: NM1108-5 (5 000×); C: NM1108-5 局部放大图.

Note: Arrows: The unit membrane structure. A: NM1108-1 (4 000×); B: NM1108-5 (5 000×); C: NM1108-5 at higher magnification.

2.4 牛虹螺原体生理生化特性

测定螺原体的生理生化特性中, 以蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* CH-1 作为参照菌株。分离得到的两个代表菌株都能利用 D-果糖和葡萄糖作为碳源, 都不能利用 D-半乳糖、D-山梨糖、D-木糖、乳糖; 牛虹螺原体 NM1108-1 和 NM1108-5 均能利用蔗糖, 而蜜蜂螺原体 *S. melliferum* CH-1 则不能利用蔗糖; 牛虹螺原体 NM1108-1 能利用甘露醇, 而 NM1108-5 与 *S. melliferum* CH-1 则不能利用甘露醇; 牛虹螺原体与蜜蜂螺原体均不能利用尿素; 对精氨酸的代谢存在差异; 3 株螺原体在无血清的培养基中均不

能生长, 说明 3 株螺原体生长都需要血清(表 2)。

由于螺原体没有细胞壁, 且抗生素敏感性试验作为细菌生理生化试验中的一个基本研究内容, 有必要测定其对部分抗生素的敏感性。3 株螺原体对四环素比较敏感, 其次是氯霉素、庆大霉素、卡那霉素; 青霉素对螺原体无明显的抑制作用; 3 株螺原体对 4 种抗生素有明显的差异: 牛虹螺原体 NM1108-5、NM1108-1 对四环素的敏感性比蜜蜂螺原体 *S. melliferum* CH-1 更加敏感, 牛虹螺原体 NM1108-5、NM1108-1 对于庆大霉素和卡那霉素比蜜蜂螺原体 *S. melliferum* CH-1 敏感性弱(表 3)。

表 2 供试菌株对几种物质的代谢特性
Table 2 Material utilization of spiroplasma isolates

供试菌株 Strains	单糖 Monosaccharide						双糖 Disaccharide		其他物质 Other material		
	甘露醇 Mannitol	D-木糖 D-xylose	D-半乳糖 D-galactose	山梨糖 Sorbosc	D-果糖 D-fructose	葡萄糖 Glucose	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose	精氨酸 Arginine	尿素 Urea	不加血清 No serum
	NM1108-1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
NM1108-5	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>S. melliferum</i> 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 3 3 株螺原体对几种抗生素的敏感性
Table 3 The sensibility of three spiroplasma isolates to some antibiotics

抗生素 Antibiotic	MIC (mg/L)			MBC (mg/L)		
	NM1108-5	NM1108-1	<i>S. melliferum</i> CH-1	NM1108-1	NM1108-5	<i>S. melliferum</i> CH-1
四环素 Tetracycline	0.64	0.16	1.28	1.28	0.64	5.12
氯霉素 Chloromycetin	2.56	2.56	2.56	5.12	50.00	100.00
庆大霉素 Gentamicin	50.00	200.00	50.00	50.00	200.00	100.00
卡那霉素 Kanamycin	100.00	200.00	50.00	100.00	200.00	100.00
青霉素 Penicillin	>2 000.00	>2 000.00	>2 000.00	-	-	-

注: MIC: 最低抑制浓度; MBC: 最低杀菌浓度。

Note: MIC: Minimum inhibition concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration.

2.5 牛虻螺原体系统发育学分析

选择了两个保守序列 16S rDNA, ITS 来比较牛虻螺原体与其他已知序列的螺原体的关系,初步了解分离菌株的分类地位。参照前人报道的螺原体 16S rDNA, ITS 通用引物成功的扩增出螺原体 NM1108-1, NM1108-5 的 16S rDNA, ITS 序列。扩增出来的电泳条带明亮清晰且单一(图 4), 经测序所得的 NM1108-1 的 16S rDNA 序列长度分别是: 1 375 bp, ITS 为 1 368 bp; NM1108-5 的 16S rDNA 序列长度分别是 1 319 bp, ITS 为 1 379 bp。将所测得的序列提交到 GenBank 中, 获得了登录序列号分别是 JQ966968 (1 375 bp)、JQ966969 (1 368 bp)、JQ966970 (1 319 bp)、JQ966971 (1 379 bp)。

根据 16S rDNA, ITS 序列采用邻接法构建了系统发育树进行分析(图 5、图 6)。基于 16S rDNA, ITS 序列构建的系统发育树都显示出分离菌株属于进化支 Apis 一大支的不同亚支。16S rDNA 序列构建的 NJ 树显示: 螺原体 *S. sp.* NM1108-1 与 *S. turonicum* 聚为一支, 自展值为 100%; *S. sp.* NM1108-5 与 *S. gladiatoris* 聚为一支, 自展值为 100%。ITS 序列构建的系统发育树进一步证明: 螺原体 *S. sp.* NM1108-1 与 *S. turonicum* 亲缘关系较近; 牛虻螺原体 *S. sp.* NM1108-5 与 *S. gladiatoris* 亲缘关系较近。

3 讨论

节肢动物门是动物界最大的一门, 种类繁多。我国地处亚州东部, 地域辽阔, 生态环境多种多样, 昆虫资源丰富, 牛虻既是中药材, 又是卫生害虫, 已成为越来越多研究者的研究对象, 如赖韧领导的团队通过对牛虻唾液腺分泌物中蛋白质和多肽的结构和药理功能进行了系统的研究^[17]。本研究从牛虻体内分离到大量的螺原体菌株, 分离率达 100%, 研究了其中两个代表性菌株 NM1108-1 和 NM1108-5 的基本生物学特性。这是国内首次有关牛虻体内螺原体的研究报道。

按照国际柔膜菌纲分类委员会规定, 鉴定一个菌株需要对其进行多项分类研究和详细描述, 除了描述其表型特征和血清学特征外, 还需要了解其系统发育学特性^[18]。本研究对分离菌株的形态学, 基本生物学特性以及系统发育学进行了测定。结果显示 2 株牛虻螺原体在 R2 培养基中良好生长, 在含有青霉素的 R2 液体培养基中都能生长良好, 并且牛虻螺原体螺原体在生长过程中需要血清; 暗视野显微镜以及负染电镜下观察对数生长期的螺原体呈典型的螺旋状, 做翻滚式运动; 这些表型特性符合 Brown 等对螺原体属 (*Spiroplasma*) 形态的描述^[18]。牛虻螺原体菌株 NM1108-1, NM1108-5 均不能利用尿素; 糖类代

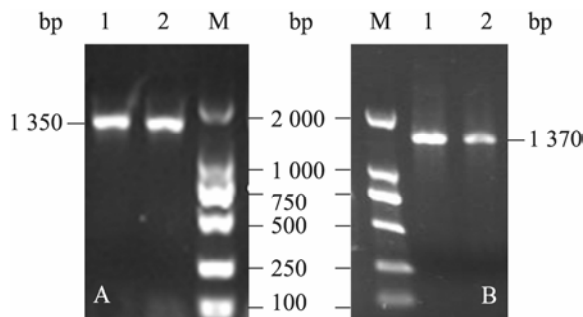


图 4 螺原体菌株 16S rDNA (A)和 ITS 扩增电泳图谱(B)

Fig. 4 Electrophoretic pattern of PCR amplification of 16S rDNA (A) and ITS (B) of Spiroplasma

Note: M: Marker DS2000; 1: NM1108-1; 2: NM1108-5.

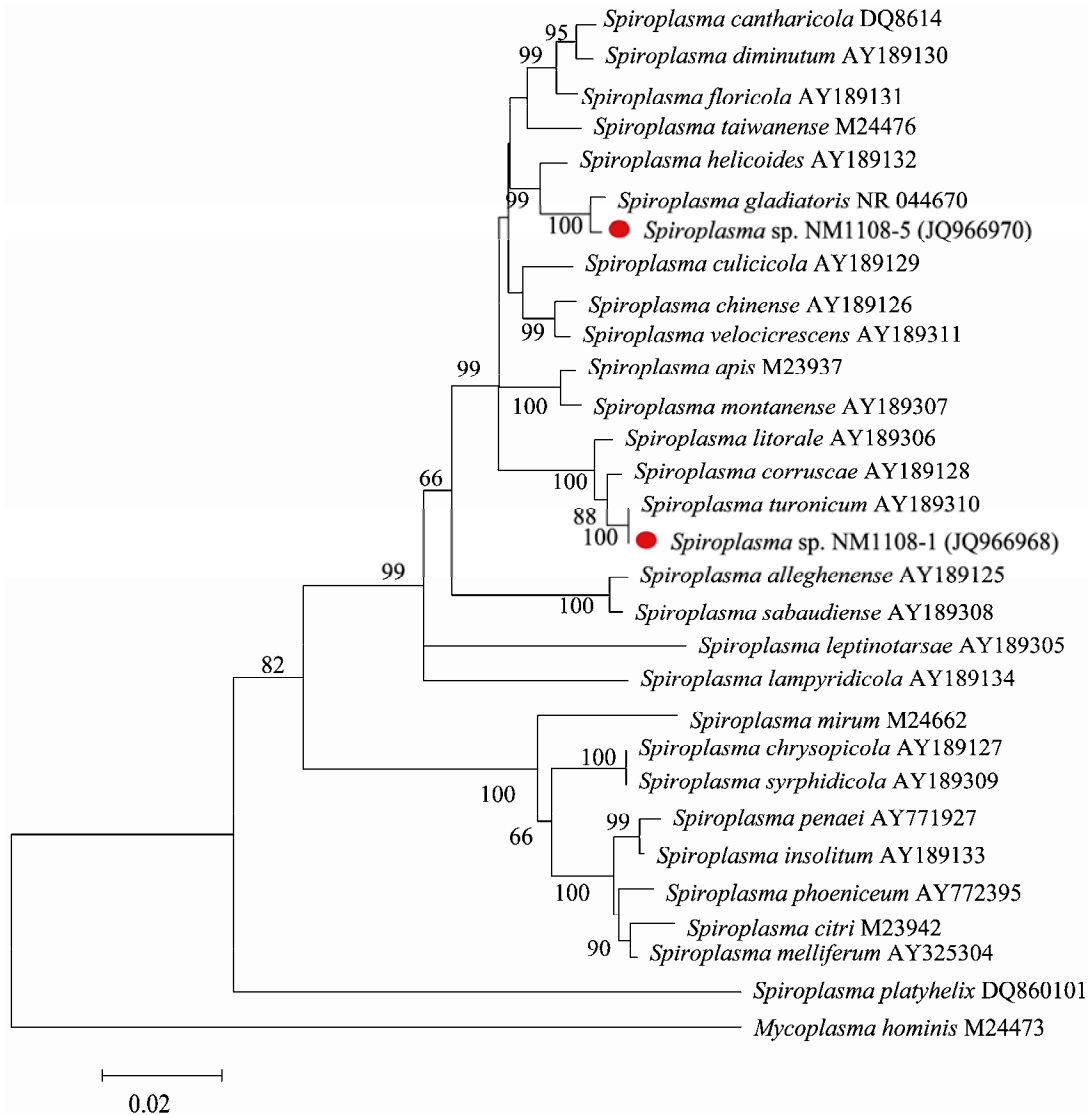


图 5 根据 16S rDNA 基因构建的螺原体发育树(NJ 法, 1 500 次)

Fig. 5 Phylogenetic trees of 16S rDNA showing the position of 2 *Spiroplasma* isolates among the genera *Spiroplasma* and *Mycoplasma* based on Neighbor-Joining (NJ) with 1 500 bootstrap replications

谢情况表明, 所分离的牛虻螺原体与蜜蜂螺原体 *S. melliferum* CH-1 糖类代谢和精氨酸利用方面有差异, 可能两者之间在相关的代谢途径中存在差异。螺原体 NM1108-5 与 NM1108-1 则在代谢甘露醇能力上有差异。在测定的青霉素的浓度范围内对 3 株螺原体无任何抑制或者致死作用, 这是因为青霉素的作用机理是抑制细菌细胞壁的合成, 而螺原体无细胞壁。其它 3 种抗生素的作用

机制是抑制蛋白质或核酸的合成, 因而对 3 株螺原体的生长都有不同程度的影响。不同抗生素对不同螺原体菌株生长的影响存在差异, 其中以四环素抑制作用最强, 其次是氯霉素、庆大霉素、卡那霉素。

无论是基于 16S rDNA 序列还是基于 ITS 序列构建的发育树均表明, 分离到的牛虻螺原体 NM1108-1 和 NM1108-5 属于 *Apis* 一支但属于不

同亚支, 牛虻螺原体 NM1108-1、NM1108-5 与蜜蜂螺原体 *S. melliferum* CH-1 亲缘关系较远, 差异较大。目前在虻科宿主中已报道的螺原体种或菌株都属于系统发育树的 Apis 这一大支, 其中与本

研究中的分离株 NM1108-1 亲缘关系较近的是 *S. tauronicum*, 较远的是 *S. syrphidicola*, 它们分别分离自法国的 Indre-et-Loire 与美国的 Maryland; 与分离株 NM1108-5 亲缘关系较近的是

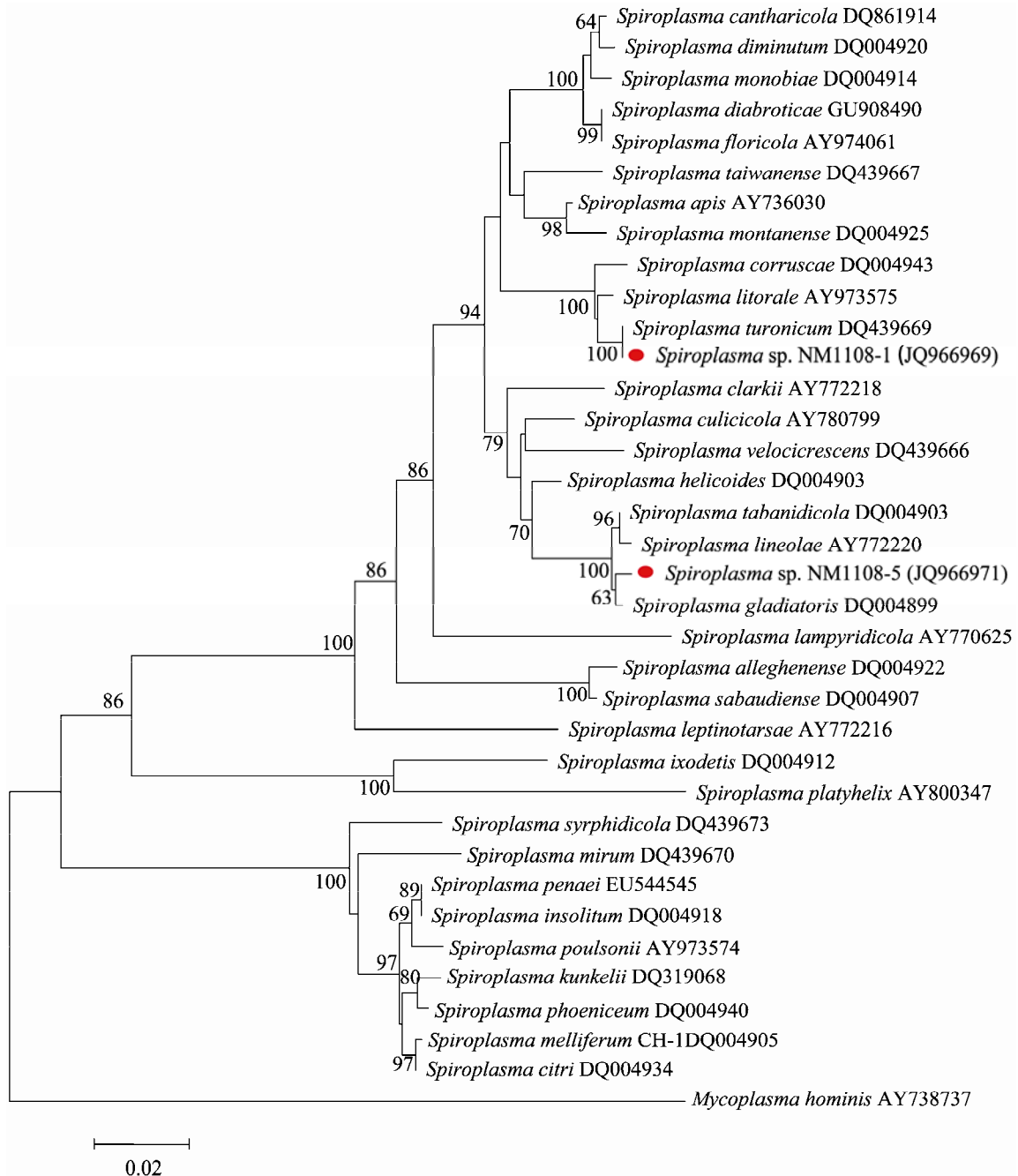


图 6 根据 ITS 基因构建的螺原体发育树(NJ 法, 1 500 次)

Fig. 6 Phylogenetic trees of ITS showing the position of 2 *Spiroplasma* isolates among the genera *Spiroplasma* and *Mycoplasma* based on Neighbor-Joining (NJ) with 1 500 bootstrap replications

S. gladiatoris, 较远的是 *S. syrphidicola*, 都是从美国 Maryland 虻科宿主分离得到, 没有证据表明它们的亲缘关系与地理位置有显著的相关性, 这可能与虻科螺原体和宿主的特异性不强有关。本研究中的 2 株牛虻螺原体的采样地点均为我国浙江永康, 基于 16S rDNA 和 ITS 序列构建的发育树表明它们之间的亲缘关系较远。在同一地点可分离到亲缘关系较远的菌株, 而不同地理位置的分离菌株的亲缘关系可能很近, 这些都说明地理位置与螺原体的亲缘关系没有显著的相关性。NM1108-1 与 *S. turonicom* 聚为一支; NM1108-5 与 *S. gladiatoris* 聚为一支, 且自展值均达到了 100%, 从我国虻科宿主分离到的两株菌分别与国外这两株标准菌株的亲缘关系非常近。*S. turonicom* 和 *S. gladiatoris* 这两株标准菌株的血清型分别是属于 X VII 和 X X III 组, 由于有研究表明利用 16S rDNA 对 34 个血清组的螺原体构建系统发育树, 反映出的螺原体的亲缘关系与经典的血清学反映的关系一致^[19-20], 所以初步推测在我国分离到的两株菌分别属于血清型 X VII 和 X X III 组, 其确定的血清型还有待更全面的血清学试验验证。根据生物学特性及系统发育学特性分析, 牛虻螺原体菌株 NM1108-1 的分类地位初步确立为 *S. turonicom*, 而 NM1108-5 属于 *S. gladiatoris*。如扩大采样地点和牛虻的样本数量, 可能会分离到更多不同种类的螺原体菌株。

致谢: 在电镜样品的制作及照片的拍摄过程中, 得到了南京农业大学生命科学院实验中心胡冰老师的尽心帮助; 在宿主鉴定过程中, 得到了南京农业大学植保学院昆虫学系孙长海老师的热情帮助, 一并表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] Carle P, Laigret F, Tully JG, et al. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(1): 178-181.
- [2] Trachtenberg S. Shaping and moving a *Spiroplasma*[J]. Journal Molecular of Microbiology and Biotechnology, 2004, 7(1/2): 78-87.
- [3] Shaevitz JM, Lee JY, Fletcher DA. Spiroplasma swim by a processive change in body helicity[J]. Cell, 2005, 122(6): 941-945.
- [4] Regassa LB, Gasparich GE. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity[J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11(1): 2983-3002.
- [5] Clark TB, Peterson RV, Whitcomb RF, et al. Spiroplasmas in the Tabanidae[J]. Israel Journal of Medicine Sciences, 1984, 20(10): 1002-1005.
- [6] French FE, Whitcomb RF, Tully JG, et al. Tabanid spiroplasmas of the southeast USA: new groups, and correlation with host life history strategy[A]//Proceedings of the 7th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology[C]. Zentralblatt fur Bakteriologie Supplement 20, 1990: 919-921.
- [7] Le Goff F, Marjolet M, Humphery-Smith I, et al. Tabanid spiroplasmas from France: characterization, ecology and experimental study[J]. Annles de Parasitologie Humaine et Comparée, 1993, 68: 150-153.
- [8] French FE, Whitcomb RF, Tully JG, et al. *Spiroplasma lineolae* sp. nov., from the horsefly *Tabanus lineola* (Diptera: Tabanidae)[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(4): 1078-1081.
- [9] Whitcomb RF, Tully JG, Gasparich GE, et al. *Spiroplasma* species in the Costa Rican highlands: implications for biogeography and biodiversity[J]. Biodiversity and Conservation, 2007, 16(3): 3877-3894.
- [10] Regassa LB, Murphy AC, Zarzuela AB, et al. An Australian environmental survey reveals moderate *Spiroplasma* biodiversity: characterization of four new serogroups and a continental variant[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(12): 1347-1354.
- [11] Konai M, Whitcomb RF, French FE, et al. *Spiroplasma litorale* sp. nov. from tabanid flies

- (Tabanidae: Diptera) in the southeastern United States[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(2): 359–362.
- [12] Gasparich GE. Spiroplasmas: evolution, adaptation and diversity[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2002, 7(1/3): 619–640.
- [13] 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.
- [14] 郭永红, 陈永萱. 三株螺原体对抗生素敏感性的体外测定[J]. *微生物学通报*, 1990, 17(4): 194–196.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Xu XQ, Yang HL, Ma DY, et al. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2008, 7(3): 582–590.
- [18] Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(11): 2703–2719.
- [19] Whitcomb RF, French FE, Tully JG, et al. Spiroplasma species, groups, and subgroups from North American Tabanidae[J]. *Current Microbiology*, 1997, 35(5): 287–293.
- [20] Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(12): 6455–6467.

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,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“名课讲堂”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!