

参赛队员姓名：Richard Hou、Devin
Chen

中学：清华大学附属中学国际部

省份：北京市

国家/地区：中国

指导老师姓名：金一

指导老师单位：北京林业大学

论文题目：肠杆菌噬菌体在猕猴桃
溃疡病复合侵染中的应用

肠杆菌噬菌体在猕猴桃溃疡病复合侵染中的应用

作者: Richard Hou, Devin Chen

摘要

猕猴桃溃疡病是一种出现在猕猴桃叶片及枝干部位的细菌性疾病，对猕猴桃的生产带来了毁灭性破坏并造成严重的经济损失。本论文以红心猕猴桃细菌性溃疡病为研究对象，研究猕猴桃溃疡病的复合侵染情况，分离鉴定溃疡病致病菌用于相应噬菌体的筛选，最终配制噬菌体鸡尾酒开展猕猴桃溃疡病的复合侵染的生物防治研究。主要研究结果如下：

1. 猕猴桃溃疡病的复合侵染分析以及霍氏肠杆菌的分离纯化

本研究对发病叶片进行致病菌分离以及纯化，结合组培苗感染实验发现霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*) 很可能参与了溃疡病的复合侵染。其与丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa) 均可单独感染导致叶片病变，而两者复合侵染后会加重叶片溃烂。

2. 霍氏肠杆菌噬菌体的分离纯化与效价测定以及生物学特征分析

霍氏肠杆菌是本研究的宿主菌，我们从水样，土壤和枝干当中分离得到 1 株噬菌体，并命名其为 pEh2001。随后测定其核酸类型，最佳感染复数，一步生长曲线等生物学特征。该噬菌体裂解量较大，且在正常自然环境温度、pH 和紫外照射条件下稳定性良好，具有良好的应用价值。

3. 霍氏肠杆菌噬菌体对猕猴桃溃疡病复合侵染的防治效果

为了评估霍氏肠杆菌噬菌体对猕猴桃溃疡病复合侵染的防治效果，本研究将噬菌体 pEh2001 和 Psa 噬菌体混合配置噬菌体鸡尾酒，随后滴加于致病菌 Psa 与霍氏肠杆菌复合侵染的猕猴桃叶片上进行防治效果测定。与单独使用 Psa 噬菌体或霍氏肠杆菌噬菌体治疗组相比，噬菌体鸡尾酒治疗组能够减轻甚至消除叶片病变，显著降低感染叶片中的细菌数量。该研究结果表明由 pEh2001 和 Psa 噬菌体组成的噬菌体鸡尾酒能够有效防治霍氏肠杆菌参与的猕猴桃溃疡病复合侵染。

关键词: 霍氏肠杆菌, 噬菌体疗法, 复合侵染, 红心猕猴桃,

目录

1	前言	4
1.1	肠杆菌在植物细菌病当中的报道	4
1.2	自然环境下植物细菌病的复合侵染情况介绍	4
1.3	红心猕猴桃与猕猴桃溃疡病的介绍	5
1.4	噬菌体在红心猕猴桃溃疡病中的应用	5
2	霍氏肠杆菌的致病性研究	7
2.1	材料以及方法	7
2.1.1	主要试剂	7
2.1.2	主要仪器	7
2.1.3	主要用具	8
2.1.4	实验方法	8
2.2	结果	11
2.2.1	霍氏肠杆菌以及丁香假单胞菌的致病性验证	11
2.2.2	霍氏肠杆菌和丁香假单胞菌的复合侵染	12
2.3	讨论	13
3	噬菌体的分离以及生物学特性研究	14
3.1	材料以及方法	14
3.1.1	主要试剂	14
3.1.2	主要仪器	14
3.1.3	主要用具	15
3.1.4	实验方法	15

3.2	结果	19
3.2.1	霍氏肠杆菌噬菌体的分离鉴定	19
3.2.2	霍氏肠杆菌噬菌体的核酸类型	19
3.2.3	霍氏肠杆菌噬菌体的生物学特性	20
3.3	讨论	24
4	噬菌体疗法以及应用	26
4.1	材料以及方法	26
4.1.1	主要试剂	26
4.1.2	主要仪器	26
4.1.3	主要用具	26
4.1.4	实验方法	26
4.2	结果	28
4.2.1	体外实验	28
4.2.2	噬菌体鸡尾酒对猕猴桃溃疡病复合侵染的防治效果	29
4.3	讨论	30
5	结论以及展望	32
5.1	结论	32
5.2	展望	32
6	参考文献	34
7	致谢	36

1 前言

1.1 肠杆菌在植物细菌病当中的报道

肠杆菌 (*Enterobacter*)，此细菌体表鞭毛较多，呈革兰氏阴性杆状，有着易发酵的特点。是在土壤，水，动植物以及昆虫界中广泛存在的一族细菌。肠杆菌的葡萄糖发酵作用检测以及硝酸盐还原作用检测皆为阳性，而细胞色素氧化酶检测为阴性。目前为止对于肠杆菌所展开的研究主要探讨肠杆菌属细菌分类这一问题，其对农作物的影响的研究报道微乎于零。在植物细菌性疾病中已知的五个具有代表性的病原体有：阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)，生癌肠杆菌 (*Enterobacter cancerogenus*)，溶解肠杆菌 (*Enterobacter cloacae subsp.*) 为，超压肠杆菌(*Enterobacter nimipressuralis*)，以及梨形肠杆菌(*Enterobacter pyrinus*)。(王国芬，2009)

1.2 自然环境下植物细菌病的复合侵染情况介绍

复合侵染，一种由两种及两种以上病原菌侵染植株时的现象。以番茄细菌病为例，新疆作为我国最大的加工番茄基地，近几年饱受细菌性斑点病和溃疡病困扰，两种病害的病原菌复合侵染严重导致了新疆地区的加工番茄品质降低，产量减少，进而导致了巨大的经济损失。番茄细菌性斑点病有两种致病菌，一种为丁香假单胞菌番茄叶斑病致病型 (*Pseudomonas syringae pv.tomato*)，在发病时其菌会导致番茄叶片出现褐色不规则病斑，约 1~3mm，后期叶片变脆，变黑，并且易折断。而另一种致病菌为密执安棒形杆菌密执安亚种 (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*)，发病时常导致植物茎杆处中空腐烂，生出不定根，表皮粗糙，果实表面出现鸟眼状病斑。当两种病原菌同时感染时，随着发病症状加深，植株病斑逐渐连结，坏死，导致果实表面粗糙不平。虽然两种细菌单独侵染时不容易导致植株死亡，但是当两

种细菌复合侵染时，受感染的植株极有可能死亡（康华军等，2018）。此研究发现自然环境引起的猕猴桃溃疡病也很可能存在细菌复合侵染的现象。

1.3 红心猕猴桃与猕猴桃溃疡病的介绍

红心猕猴桃（*Actinidia chinensis*）是一种中华猕猴桃变种，同样也是猕猴桃属中的一员。其含有鲜艳的红色条纹，果皮呈现褐绿色，表皮仅有少毛或无毛，其果实整体呈均匀短圆柱形，果肉为黄绿色，果心较小。果重约为 60g-110g 之间，最大的果实可以达到约 130g。红心猕猴桃钙元素含量高，并且富含各种矿物质，对人体的营养价值极高（吴水美 2021）。猕猴桃溃疡病在发病后会严重导致猕猴桃的果实产量和质量下降，造成非常严重的经济损失，且其病原菌生命力强，分布广，因此对国内外果农造成了持久性的困扰。在 1984 年 Psa 首次在日本报道为猕猴桃溃疡病得病原菌。我国科学家朱晓湘也在随后证实了湖南猕猴桃溃疡病病原菌为丁香假单胞菌（王忠肃，1992）。Psa 是一种好氧，呈杆状，一端有鞭毛的革兰氏阴性细菌（龚鹏博等，2011）。Psa 主要从植株气孔、幼芽、落叶痕、伤口处等侵染并危害植株树干，枝条，花和叶片部位（李莎莎等，2013）。病症初期呈现褐绿色水渍状，经过时间推移水渍状斑点向植株边缘扩展，形成不规则多边形病斑，颜色也随之加深。受到侵染的植株韧皮部逐渐腐烂，冬季时纵向龟裂溢出白色粘稠液体，木质部与皮层逐渐分离，病情严重时会导致植株感染部位溃烂以及植株死亡。更严重的是，果园环境复杂，细菌组成丰富，在溃疡病发病过程中其他细菌将不可避免地参与感染，加重组织病变和溃烂。丁香假单胞菌死李致病变种也是被认为的一种病原菌。

1.4 噬菌体在红心猕猴桃溃疡病中的应用

目前猕猴桃溃疡病的主要防治手段包括：1.通过抗生素、消毒剂、生物控制剂、植物抗体诱导剂等消灭病原菌。虽然这类产品的广泛使用在农业，林业范围内，并起到了很重要的作用，但是它们也逐渐导致了病原菌对其产生了很强

的抗药性。2. 加强果园管理，例如在育苗时期开始对植株施肥可以积累植株所需要的碳、氮、磷、钾等生长所必需的营养物质，进而增强植株免疫系统的功能并加强植株生长趋势；及时去除植株感染部位防止菌株大规模传播；严格对栽培工具进行消毒以防止人为因素所导致的传播；在冬季通过对植株刷粉、增加保暖材料来等预防寒冷，减少自然冻害所造成的植株损伤等。3. 以有益微生物为基础的生物防治技术。该技术利用自然界中已被证实能够有效抑制病原菌的微生物，或能有效诱导植物免疫机制的微生物进行防治。其中利用噬菌体为细菌天敌的自然关系削弱并消灭病原菌，既可以杀灭病原菌，也保障了植物生长环境的安全性并解决了传统药物防治技术对人体健康所带来的危害。（马超等，2017）

噬菌体作为全球范围内来源最为广泛，形态特征最为丰富的生物之一，在生物防治占据有着必不可少的地位。他们有着极强的特异性，在多种菌群中不会干扰正常菌群生态，只会裂解掉宿主细菌。其次，噬菌体虽然繁殖能力强，但是是一种有限复制的病毒，在宿主细菌缺乏的环境下会自我降解，不会留下任何痕迹。再有，相比于抗生素，宿主细菌对噬菌体产生抗性的机会更低，突变率仅有 10^{-7} 。因此，使用噬菌体会是比抗生素更持久的一种方法。在实际农业应用中，噬菌体对生长环境要求十分苛刻。噬菌体通常利用土壤中的水作为介质进入植物根茎处，但当缺乏足够的水以及水的 PH 值不适合噬菌体生长时，噬菌体就会失去活性，影响对病原菌的抑制作用。（刘彦希等，2021）

虽然噬菌体的特异性强，只对一种细菌产生裂解效应，但是将多种不同目标细菌的噬菌体混合在一起成为“噬菌体鸡尾酒”的时候，他们可以对一定种类范围内的细菌进行裂解，有效削弱、消灭病原菌活性。在 Balogh 等人对 *Xanthomonas campestris* 引起的番茄细菌性斑点病的研究中发现使用噬菌体鸡尾酒疗法比单噬菌体鸡尾酒疗法产生的效果能够提高 3% 到 23%（Balogh et al., 2018）。此外，当处在多种噬菌体混合环境中的细菌很难对所有的噬菌体产生抗性，并且噬菌体的协同作用能够提升其裂解能力。当植株遭受两种及以上病原菌侵染的时候，针对单一细菌的噬菌体无法消灭全部病原菌，使用多种细菌噬菌体配制鸡尾酒能够弥补这一生物防治中的缺陷，有效应对植物细菌病的复合侵染。

2 霍氏肠杆菌的致病性研究

2.1 材料以及方法

2.1.1 主要试剂

胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB 培养基）（Oxiod, 英国）

TSA 固体培养基：TSB 液体培养基中添加 1.5% 的琼脂。

琼脂粉（奥博星, 北京）

MS 培养基：4.6g 商品化的 MS 培养基溶于 1 L 去离子水（solarbio, 北京）。

75% 乙醇：取无水乙醇 75mL，加 ddH₂O 至 100mL。

30% 甘油：取无菌甘油 15mL，加 ddH₂O 至 50mL。

DP320 细菌基因组提取试剂盒（天根, 北京）

Agarose（全式金, 北京）

Marker 8K（全式金, 北京）

50xTAE（拜尔迪, 北京）

Golden View（拜尔迪, 北京）

2xTaq PCR Mix（博迈德, 北京）

溶菌酶（Amresco, 美国）

2.1.2 主要仪器

Legend Micro 17R 型离心机（Thermo Fisher, 美国）

YT-CJ-1ND 标准型净化超净工作台（亚泰科隆, 北京）

数显全温振荡培养箱：HZQ-F160，购自苏州培英实验设备有限公司

电子分析天平（Sartorius, 德国）

HH 系列数显恒温水浴锅（朗越, 常州）

DKT200-4 型恒温金属浴（米欧, 杭州）

凝胶成像仪（Tanon, 上海）

DYY-III-11 型三恒电泳仪（六一，北京）

灭菌锅（博讯，上海）

ZRG-350C-L 型人工气候培养箱（丙林，上海）

-80°C超低温冰箱（Thermo Fisher，美国）

BCD-610WMBW 对开门冰箱（惠而浦，美国）

移液器（Thermo Fisher，美国）

三角瓶（蜀牛，中国）

2.1.3 主要用具

剪刀、镊子、接种环、量筒、锥形瓶、培养皿、研磨棒、各种规格大小的离心管、PCR 管。

2.1.4 实验方法

（1）致病菌的分离

将采集的溃疡病枝条的发病组织用 75%酒精进行表面消毒后，切取直径约为 5-10 mm 的发病斑块，用无菌水将其冲洗三次后移至无菌 TSB 液体培养基中。随后将其置入 25°C培养箱，对其进行 150 rpm/min 的振荡培养。16 小时后取出并挑取单个菌落，随后采用平板划线法进行菌落分离，此步骤需要在 TSA 固体培养基上纯化划线，操作 2-3 次。

（2）致病菌的鉴定

挑取单菌落菌株 200 μ L，将其加入到 20 mL TSB 无菌液体培养基中，随后将其置于 25°C培养箱，对其进行 150 rpm/min 的振荡培养。16 小时后取出，使用北京天根生物技术有限公司的 TIANamp 细菌基因组提取试剂盒来提取核酸，提取步骤如下：

a. 取枝条样品 1-5 mL，10,000 rpm 离心 1 min，吸净上清；

- b. 为了对其进行破壁处理，需要加入 200 μ L 溶菌酶溶液到菌体沉淀物当中，随后将其振荡至菌体彻底悬浮，37 $^{\circ}$ C 处理 30 min 以上；
- c. 向管中加入 20 μ L Proteinase K 溶液，混匀；
- d. 向管中加入 220 μ L 缓冲液 GB，对其振荡 15 sec，随后将其放置于 70 $^{\circ}$ C，持续 10 min。溶液应变清亮，为了去除管盖内壁的水珠，需要对其简短离心；
- e. 向管中加入 220 μ L 无水乙醇，对其振荡混匀 15 sec，此时絮状沉淀可能会出现，为了去除管盖内壁的水珠，需要对其简短离心；
- f. 将上一步所得的溶液和絮状沉淀加入进一个吸附柱 CB3 当中，对其进行 12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉废液后，将吸附柱 CB3 放入收集管中；
- g. 向管中加入已加入无水乙醇的 500 μ L 缓冲液 GD 到吸附柱 CB3 中，对其进行 12,000 rpm 离心。持续 30 sec，随后倒掉废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中；
- h. 向管中加入已加入无水乙醇的 600 μ L 漂洗液 PW 到吸附柱 CB3 中，对其进行 12,000 rpm 离心。持续 30 sec，随后倒掉废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中，重复操作步骤 g；
- i. 对收集管进行 12,000 rpm 离心，时间持续 2 min，随后倒掉废液。为了彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液，需要将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟；
- j. 拿出一个干净的离心管，将吸附柱 CB3 转入其中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-200 μ L 洗脱缓冲液 TE，随后将其放置于室温，2-5 min 后对其进行 12,000 rpm 离心 2 min，并将溶液收集到离心管当中。为了防止 DNA 降解，得到的 DNA 产物需保存在 -20 $^{\circ}$ C。

之后，使用通用引物 27F (5'-AGAGAGTTTCCTGGCTCG-3') 和 1492R (5'-GGTACTCTCTCT-3') (Webb et al. 2016)，和上述提取的细菌基因组为模板，进行聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增 16S rDNA 基因片段。其反应体系为：模板 2 μ L，正向引物 1 μ L，反向引物 1 μ L，2 \times Easy Taq Mix 12.5 μ L，灭菌 ddH₂O 8.5 μ L。

PCR 的反应总体积为 25 μ L，其扩增条件包括 1. 94 $^{\circ}$ C 预变性，时间需持续 5min； 2. 94 $^{\circ}$ C 变性，时间需持续 30s； 3. 56 $^{\circ}$ C 退火，时间需持续 30 s； 4. 72 $^{\circ}$ C 延伸，时间需持续 90 s，一共需要进行 30 个循环。最终 72 $^{\circ}$ C 延，时间需持续 10 min，4 $^{\circ}$ C 终止保存。

随后，需要对 PCR 得到的产物进行电泳。首先用琼脂糖与 1×TAE 电泳缓冲液混合制成 1 % 琼脂糖溶液，并加入 Golden View 混匀，确保 Golden View 的浓度为 0.6 %。插上样品梳后，将调匀好的溶液倒入已封好的制胶台上。等待 20-30 分钟，确定胶凝固后，再从制胶平台上拔出梳子，并在电泳槽中加入高出凝胶表面约 1 cm 的 1×TAE 电泳液。用微量移液器将 10 μ L 加有 loading Buffer 的细菌核酸样品移入样品孔中，并接通电极。在 100V 的电压下进行电泳，结束后将凝胶取出，放在凝胶成像仪上，拍照记录扩增结果。

将明亮条带的 PCR 扩增产物单独切除送至上海生工生物工程有限公司测定 16S rDNA 序列。

(3) 致病性验证

a. 猕猴桃的组培苗培养

以红心猕猴桃‘红阳’品种为试材，将无菌组培苗分别接种到在装有固体 MS 培养基的育苗瓶中，封好瓶盖，将其放置于湿度 35% RH，光强 12000 Lx，光照 12 h/d，和温度 25 $^{\circ}$ C 条件下的气候箱中培养。

b. 对猕猴桃枝干的致病性测试

根据科赫氏法则对菌株与猕猴桃枝干进行致病性实验：

- ①选择尺寸大小相同培养了一个半月的组培苗，高度约 5cm 左右。
- ②在无菌台进行操作，剪去多余叶片以及根部。
- ③在试验叶片上用手术刀切开 2-4 个 0.5 cm 的切口，便于细菌感染。
- ④将无菌棉布剪成 0.5cm² (1 cm×0.5 cm) 大小的方块置于叶片表面切口处。
- ⑤用移液枪吸取 50 μ L 过夜培养的菌液，采用悬滴法接种在叶片棉布上。
- ⑥在另一株组培苗上重复第④步，用无菌 TSB 液体培养基作为对照。
- ⑦将接种后的组培苗封号瓶盖置于气候培养箱中，两小时后移除棉布，观察叶片发病状态。
- ⑧当叶片出现感染防病状况后，在无菌台进行操作，剪下感染叶片。
- ⑨在有病斑处剪取 0.25 cm² (0.5 cm×0.5 cm) 大小面积的叶组织加入 1 mL 无菌 TSB，使用无菌研磨棒将其研碎后，12,000 rpm 离心 3 min，收集上清液加无菌培养基配成菌悬液。

⑩依据科赫法则重新分离鉴定致病菌，涂布在 TSA 固体培养基上，置于 25 °C 培养 20 h 后再次纯化、鉴定。

注：Psa 的分离纯化由本实验室前期工作中获得。

2.2 结果

2.2.1 霍氏肠杆菌以及丁香假单胞菌的致病性验证

从四川省苍溪县猕猴桃溃疡病的病枝样本中共分离得到一株霍氏肠杆菌，命名为 Eh20L，并对其提取基因组 DNA。随后对其进行 PCR 扩增出 16S rDNA 基因，大小约为 1.4kb。PCR 产物测序后，通过 NCBI-BLAST 中的核酸数据进行分析对比，证实分离到的菌株分别为为霍氏肠杆菌，其学名为 *Enterobacter hormaechei*。本实验在前期工作中已完成丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 Psa BJ530 的分离及鉴定。

将猕猴桃叶片分为为三组，其中两组为实验组分别在猕猴桃幼苗叶片上接种两种细菌，另一组用 TSB 培养基做空白对照。在接种 4 天后，根据实验情况记录为图 2.1 与表格 2.1，实验组中的猕猴桃组育苗种口都开始表现出不同程度的病变。两种菌体均导致叶片切口部位呈褐色并向周围扩展溃烂。TSB 培养基对照组在相同条件下并无症状出现。根据科赫法则，收集感染发病的叶片再次对菌体进行分离测序。并发现受感染发病的叶片测序得到相同细菌。因此符合科赫法则，证实两种细菌对猕猴桃的致病性。

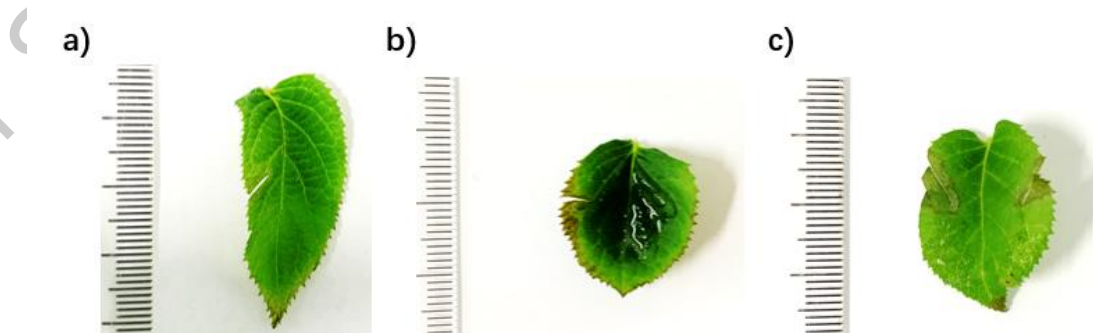


图 2.1 组培苗单独感染实验结果：a. 白对照，b. Psa BJ530 单独感染，c. Eh20L 单独感染

表 2.1 组培苗单独感染实验结果

	空白对照	Psa BJ530	Eh20L
菌落计数 (CFU/mL)	$1 \pm 0.68 \times 10^2$	$2 \pm 1.22 \times 10^8$	$4 \pm 0.93 \times 10^8$
序列对比		√	√
判断病变	-	++	++

2.2.2 霍氏肠杆菌和丁香假单胞菌的复合侵染

为了检测两种细菌复合侵染对溃疡病的影响，将猕猴桃幼苗叶片分为两组，一组接种 Psa 和霍氏肠杆菌，另一组则使用 TSB 培养基作为对照。在接种 4 天后，根据实验情况记录为图 2.2 以及表 2.2，猕猴桃组培苗种口开始表现出更加严重的病变。对比单独接种 Psa 或者霍氏肠杆菌，复合侵染后的叶片褐色病变面积更大。同样从复合侵染后的菌落计数为 6×10^8 ，大于 Psa 单独感染的 4×10^8 以及霍氏肠杆菌单独感染的 2×10^8 。

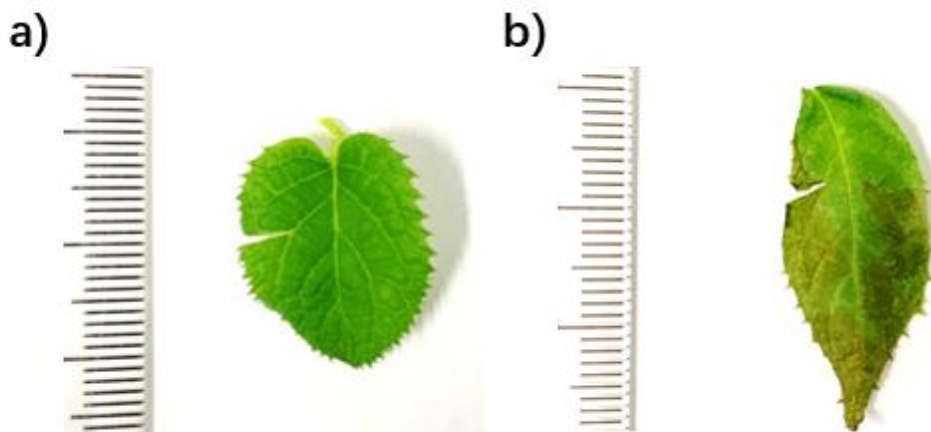


图 2.2 组培苗复合侵染实验结果：a) 空白对照，b) Psa BJ530 与 Eh20L 复合侵染

表格 2.2 组培苗复合侵染实验结果

	空白对照	复合侵染组
菌落计数 (CFU/mL)	$3 \pm 1.12 \times 10^2$	$6 \pm 0.91 \times 10^8$
判断病变	-	++

2.3 讨论

中国是猕猴桃的起源国，同时也是猕猴桃的生产大国，溃疡病的大量爆发严重地损害了中国的经济。在前人研究中可以得知，王忠肃等（1992）、承河元等（1995）、梁英梅等（2000）分别对四川省、安徽省、陕西省的猕猴桃溃疡病进行病原细菌鉴定，都分别确认该致病菌为 Psa。有少数植物病都含有复合侵染的情况发生。因此，此研究尝试对发病枝条进行再次分离，并成功地在猕猴桃溃疡病中分离出一株新致病菌，并经鉴定后确认其为霍氏肠杆菌（*E. hormaechei*）。同时经过致病性实验得知，Psa 和霍氏肠杆菌分别可以对猕猴桃进行单独感染，导致溃疡症状的产生，而两种细菌的复合侵染会明显加重病变。因此在猕猴桃溃疡病重症的防治工作中，不能仅关注解决 Psa 单独感染的问题，同时也需要关注由其他致病菌参与的复合侵染。

3 噬菌体的分离以及生物学特性研究

3.1 材料以及方法

3.1.1 主要试剂

胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB 培养基）（Oxiod, 英国）

TSA 半固体培养基

TSA 固体培养基

琼脂粉（奥博星，北京）

75%乙醇

30%甘油

DP315 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒（天根，北京）

KR106-02cDNA 第一链合成试剂盒（天根，北京）

Agarose（全式金，北京）

Marker 8K（全式金，北京）

50xTAE（拜尔迪，北京）

Golden View（拜尔迪，北京）

2xTaq PCR Mix（博迈德，北京）

3.1.2 主要仪器

3-30k 高速离心机（Sigma, 美国）

Legend Micro 17R 型离心机（Thermo Fisher, 美国）

YT-CJ-1ND 标准型净化超净工作台（亚泰科隆，北京）

HZQ-F160 数显全温振荡培养箱（培英，苏州）

电子分析天平（Sartorius, 德国）

HH 系列数显恒温水浴锅（朗越，常州）

凝胶成像仪（Tanon, 上海）

DYY-III-11 型三恒电泳仪（六一，北京）
灭菌锅（博讯，上海）
-80°C超低温冰箱（Thermo Fisher，美国）
BCD-610WMBW 对开门冰箱（惠而浦，美国）
WP750 型机械微波炉（格兰仕，广东）
移液器（Thermo Fisher，美国）
DELTA320 型 pH 计（梅特勒-托利多，上海）
TL 20 W/12 RS UV-B 灯（飞利浦，荷兰）
JEM 1200EX 透射电子显微镜（JEOL，日本）
30KD 超滤离心管（millipore，美国）。

3.1.3 主要用具

解剖刀、接种环、锥形瓶、培养皿、研磨棒、各种规格大小的离心管、PCR 管、各种规格的一次性细菌过滤、滤头适配器。

3.1.4 实验方法

（1）猕猴桃溃疡病菌噬菌体的分离纯化与效价测定

噬菌体效价指的是每毫升样品含有的噬菌体的个数。用双层平板法培养 8-12h 后若观察到清晰的噬菌斑，则挑取单个噬菌斑加入 200 μL 对数期宿主菌液中，在 20mL 液体培养基里培养并置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱，150 rpm/min 振荡培养。12 小时后取出，将其置入 12,000 rpm 离心机离心 3 min，获得上清液，即为分离一个噬菌体得到的纯培养液。将使用 0.22 μm 孔径一次性过滤器过滤后的噬菌体纯培养液用 TSB 培养液作 10 倍梯度稀释，每个稀释度吸取 100 μL 与 200 μL 霍氏肠杆菌菌液混合加入到 20 mL TSB 培养液中，采用双层平板法计数测定效价。噬菌体效价的计算公式为：

噬菌体效价=噬斑数 \times 稀释倍数 \times 100 PFU / mL（PFU：噬菌斑形成单位）。

(2) 噬菌体的核酸性质

a. 噬菌体的浓缩

挑取单个噬菌体噬斑，加入到 200 μL 对数期宿主菌液中，在 25 $^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm/min 的环境下振荡培养 12 小时以上。培养完成后，使用 0.22 μm 孔径的一次性滤器过滤，取 15 mL 滤液加入 30 KD 的超滤离心管，8,000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 20 min，吸取滤膜上的培养液即为浓缩噬菌体纯培养液。

b. 噬菌体核酸的提取和判断核酸类型

噬菌体浓缩后浓度提高，导致制备的核酸含量增加，提取浓缩噬菌体纯培养液核酸需要使用北京天根生物技术有限公司的 TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒，提取步骤见如下：

- ①在 1.5 mL 离心管中加入 20 μL Proteinase K 和 200 μL 噬菌体浓缩培养液。
- ②将 200 μL 缓冲液 GB 加入到 Carrier RNA 溶液的混合液中，混匀。
- ③在 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后加入 250 μL 冰上预冷的无水乙醇，此时出现絮状沉淀，室温（15-25 $^{\circ}\text{C}$ ）下放置 5 min。
- ④简短离心后将离心管中的溶液全部转移至 RNase-Free 吸附柱 CR2，8,000 rpm 离心 1 min，弃废液。
- ⑤在吸附柱加入 500 μL 提前加好无水乙醇的缓冲液 GD，8,000 rpm 离心 1 min，弃废液。
- ⑥加入 600 μL 提前加好无水乙醇的漂洗液 PW，静置 2 min，8,000 rpm 离心 1 min，弃废液后再重复该步骤。
- ⑦在吸附柱加入 500 μL 无水乙醇，8,000 rpm 离心 1 min，弃废液。再将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 离心 3 min，使吸附膜完全变干，弃废液。
- ⑧将吸附柱放入一个 1.5 mL RNase-Free 离心管中，室温放置 3 min，使吸附膜完全变干。向吸附膜的中间部位悬空滴加 20-150 μL RNase-Free ddH₂O，盖上盖子，室温放置 5 min。12,000 rpm 离心 1 min。

将提取的核酸于 1 \times TAE 电泳缓冲液加入琼脂糖制备成 1% 琼脂糖溶液中电泳，100V 电压条件下电泳 20 min，观察结果。在提取得到的噬菌体核酸分为两组，分别中加入 DNase I 酶至最终浓度 5 g/mL，RNase A 酶至 1 g/mL，然后

在 1% 琼脂糖凝胶中电泳以鉴定其核酸类型，可根据噬菌体核酸被消化降解酶的类型而确定其核酸性质，提取后鉴定为 DNA。使用干净的 0.5 mL 的 PCR 管内装入 DNA 核酸样品之后送往广东美格基因科技有限公司质量检测，并进行下一步的测序。

(3) 噬菌体的生物学特性研究

a. 电子显微镜下噬菌体的形态观察

将含有浓缩噬菌体的溶液放置在铜网上，并添加 2% 醋酸铀酰水溶液 (pH 4.0) 对噬菌体粒子负染 20s。用 JEM 1200EX 透射电子显微镜观察纯化的噬菌体，用设备照相机扫描图像。根据国际病毒分类委员会的指南对噬菌体进行分类。

b. 最佳感染复数的测定

感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 指的是感染开始时噬菌体颗粒数量与宿主细菌的颗粒数量比值，在不同的感染复数条件下培养后，得到的噬菌体子代数量不同。其中最佳感染复数条件下培养的噬菌体效价最高。因此，为了提高噬菌体的裂解量，确定其最佳感染复数是极为重要的。需要使用紫外分光光度计去测定对数期生长的宿主菌的 OD600 值，重复操作 3 次，取平均值。然后使用无菌 TSB 进行 10 倍梯度稀释，取一定倍数的稀释液 100 μ L 涂布于固体 TSA 平板上，放置进 25 $^{\circ}$ C 环境下培养。在 20 小时后计数平板上的菌落数，重复操作 3 次，取平均值。细菌浓度的计算方法为：平板上菌落数 \times 稀释倍数 \times 100 CFU/mL (CFU: 菌落形成单位)。建立菌液的 OD600 值与其对应浓度的关系，之后细菌的浓度按照对应的 OD600 值换算。

噬菌体浓度的测定：挑取单个噬菌斑，将其加入到对数生长早期的宿主菌液中，在 25 $^{\circ}$ C 的环境下，150 rpm/min 震荡培养。在 12 小时后取出，12,000 rpm 离心 3 min，过滤后得到噬菌体纯培养液。10 倍梯度稀释，通过双层平板法计数噬菌斑测得对应噬菌体浓度，然后将其浓度稀释为 1×10^{10} PFU / mL、 1×10^9 PFU / mL、 1×10^8 PFU / mL、 1×10^7 PFU / mL、 1×10^6 PFU / mL、 1×10^5 PFU / mL。按照感染复数分别为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 的比例分别加入噬菌

体纯培养液和宿主菌液，再加入 TSB 无菌液体培养基，定容至每个体系的总体积相同。在 25 °C 摇床中 150 rpm / min 振荡培养 12 h。培养液于 12,000 rpm 离心 10 min，取上清进行倍比稀释，通过双层平板法测定噬菌体效价，重复操作三次；同时以不加噬菌体的宿主霍氏肠杆菌和不加宿主菌的噬菌体为对照，产生最高效价的 MOI 即为最佳感染复数。

c. 一步生长曲线的测定

按照 MOI 为 1 的比例将 5 mL 噬菌体培养液（最终浓度为 10^8 PFU/mL）添加到 5 mL 宿主霍氏肠杆菌（细胞密度 10^8 CFU/mL）的细菌培养物中，然后置于 25 °C 培养箱不振荡温育 5 min，将混合物 8,000 rpm 离心 30 s，弃上清，这时噬菌体已吸附到菌体沉淀上。为了去除未吸附宿主菌的游离噬菌体，用 TSB 培养液洗涤沉淀 2 次。将菌体颗粒重新悬浮在 10 mL 的 TSB 中，并按照 150 rpm / min 转速在 25 °C 振荡培养；开始记时，分别于 0 时刻和每隔 15 min 取样 300 μ L，接双层平板测定噬菌体效价，直至培养 150 min，在各时间点均需要重复测定三次，取其平均值。同时，以无噬菌体的霍氏肠杆菌培养液和仅有噬菌体的液体分别作为对照。最后，为了得出噬菌体的潜伏期、爆发期和爆发量，以感染时间为横坐标，噬菌体的效价为纵坐标，绘制一步生长曲线。

d. 温度稳定性的测定

为了评估温度对噬菌体活性的影响，将水浴锅温度分别设置 4 °C，25 °C，37 °C 和 50 °C，实验在 pH 值为 7.0 的无菌 TSB 中进行，把待测噬菌体放入水浴锅处理，分别于 0 h，3 h，6 h，12 h，24 h 取样，处理后的样品立即置于冰浴中冷却，用 TSB 培养液进行梯度稀释，使用双层平板法测得噬菌体效价，随后置于 25 °C 培养箱培养 16 h，各时间点均需做三次重复，取其平均值。

e. pH 稳定性的测定

为了评估 pH 值对噬菌体活力的影响，以 TSB 培养液为基质，使用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值，来配置 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的梯度溶液，将调配好不同 pH 值的 TSB 培养液分别加 4.5 mL 到 EP

管内，置于 25 °C 恒温培养箱中，待温度完全平衡后加入 0.5 mL 噬菌体培养液。在处理 2 小时后用 TSB 培养液进行梯度稀释，用双层平板法测定噬菌体效价，置于 25 °C 培养箱培养 16 h，各组均做三个重复取平均值。

f. 紫外线稳定性的测定

噬菌体液离心后稀释至 10^9 PFU/mL，分装离心管，用 700 mw/m² 规，20 W，50 cm 的 UV-B 紫外灯放置于离心管上方约 30 cm 处直射，分别处理 0 min，5 min，15 min，25 min，50 min，收集处理后的噬菌体培养液，置暗处 30 min 平衡，用 TSB 培养液进行梯度稀释，通过双层平板法测定噬菌体效价，置于 25 °C 培养箱培养，在 16 小时后取出，各组均做三个重复取平均值。

注：Psa 噬菌体由本实验室前期实验中分离获得

3.2 结果

3.2.1 霍氏肠杆菌噬菌体的分离鉴定

以霍氏肠杆菌为宿主菌，从猕猴桃病株腐烂的枝条、土壤和污水中成功分离一株霍氏肠杆菌噬菌体，命名为 pEh2001。在 25 °C 培养箱培养噬菌体 8-12 小时，得到透明的空斑，即为噬菌斑。采集噬菌斑之后再重复两次纯化实验，在收集噬菌体滤液后，对其进行双层平板法测定其效价，确定噬菌体 pEh2001 效价约为 10^{10} - 10^{11} PFU/mL。

3.2.2 霍氏肠杆菌噬菌体的核酸类型

用病毒 DNA/RNA 试剂盒提取的噬菌体核酸，经过琼脂糖凝胶电泳分离出条带，再根据条带分析噬菌体的核酸类型。实验分三组，第一组为对照组，第二组加入 DNase I 酶，第三组加入 RNase A 酶。实验后利用照胶仪获取结果为图 3.1，图中可见加入 RNase A 酶的结果为有条带，并且条带长度与对照组一致，而加入 DNase I 酶并无条带，说明该噬菌体核酸类型为 DNA。

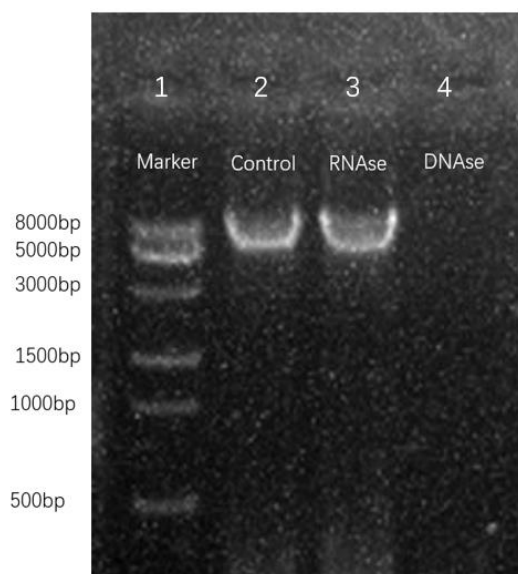


图 3.1 噬菌体 pEh2001 基因组电泳图 1: Marker 8K, 2: 对照, 3: 含有 RNase 酶, 4: 含有 DNase 酶。

3.2.3 霍氏肠杆菌噬菌体的生物学特性

(1) 电子显微镜下噬菌体的形态观察

噬菌体为一种病毒，并无细胞结构，因此只有通过透射电子显微镜技术可以对噬菌体进行形态学观察。将噬菌体颗粒经离心浓缩后，收集于铜网上，经 2% 醋酸铀酰水溶液负染法染色，放置其于透射电镜下观察，获取结果为图 3.2。图中可见霍氏肠杆菌噬菌体的结构为长尾病毒科，由不可伸缩的突起部分和二十面体头部组成，长度大约为 250nm。

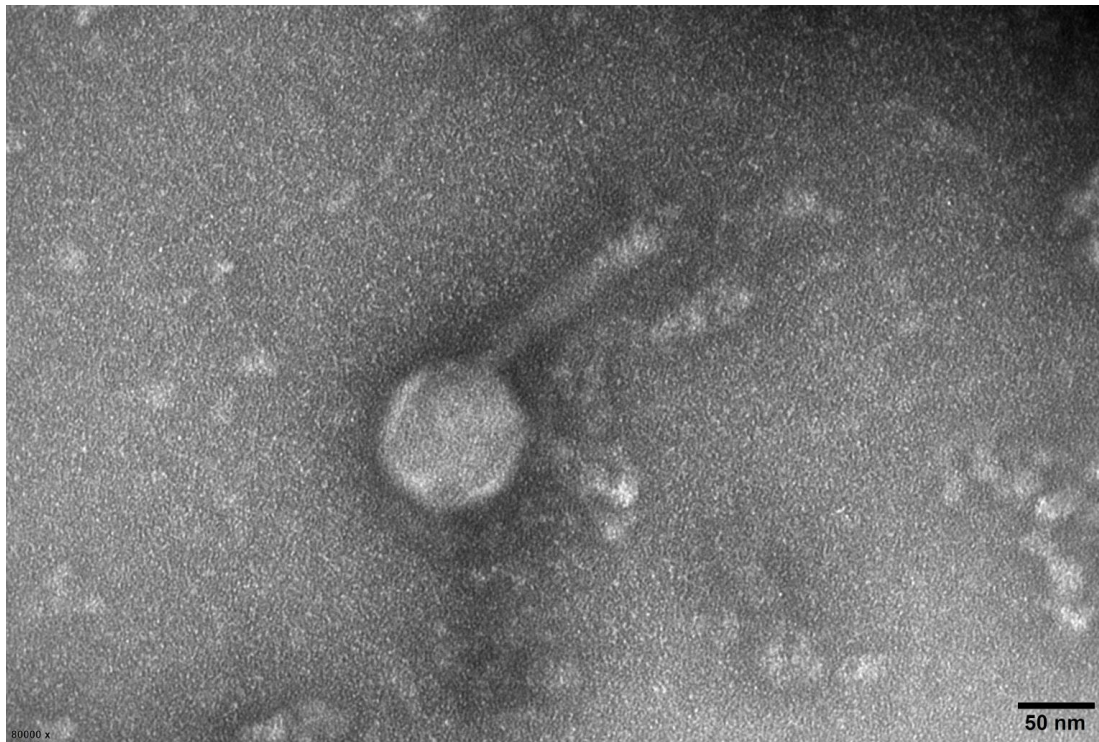


图 3.2 噬菌体 pEh2001 透射电镜图像

(2) 最佳感染复数测定

最佳 MOI 对噬菌体效价有着重要意义。最佳感染复数可以提高噬菌体子代裂解量从而提升噬菌体效价，使得噬菌体的治病效果增强。使用双层板法测定词噬菌体在不同 MOI 下的噬菌体效价，结果为表格 3.1。根据表格 3.1 显示，在噬菌体 MOI 为 1 时，噬菌体子代裂解量最高，为 $2.32 \pm 0.24 \times 10^{12}$ PFU/mL 左右因此该噬菌体的最佳 MOI 为 1。

表格 3.1 pEh2001 最佳感染复数 (MOI) 测定

MOI	噬菌体效价(PFU/mL)
0.001	$2.50 \pm 0.21 \times 10^{10}$
0.01	$5.52 \pm 0.21 \times 10^{10}$
0.1	$5.44 \pm 0.14 \times 10^{11}$
1	$2.32 \pm 0.24 \times 10^{12}$
10	$3.20 \pm 1.13 \times 10^{11}$
100	$8.25 \pm 0.53 \times 10^{10}$

(3) 一步生长曲线的测定

通过一步生长曲线实验可以获得噬菌体的三个重要数据，分别是潜伏期,裂解阶段,以及有限度的裂解质量。其中最短的潜伏期是指从整个菌体开始进入细胞到从整个菌体中结束和释放的最短暂时间,裂解期是指整个菌体从开始裂解到结束裂解的持续时间,而裂解量则是指整个噬菌体在每一个菌体中都会在裂解期内释放出来的子代噬菌体的数量。以细菌感染宿主菌的持续时间作为横向坐标,噬菌体有效价的相应对数值作为纵向坐标,得到的一步细菌生长的曲线见图 3.3。从图 3.3 a 中我们可以清楚地看出霍氏大肠杆菌类似噬菌体的病毒潜伏期约持续 90 分钟,裂解期大概持续 20 分钟,裂解剂含量约持续 130 左右。由此得到的结论,在提高噬菌体的特性中具有实际意义。

(4) 温度稳定性的测定

对双层平板进行计数，计算每毫升的噬菌体数量。根据图 3.3 b，霍氏肠杆菌噬菌体在不同温度下的有数量变化。其中在 25℃ 培养的霍氏肠杆菌噬菌体最为稳定，噬菌体浓度保持在 10.28 左右，在 4℃ 培养中，噬菌体浓度稍有下降。随后在温度上升的 37℃ 以及 50℃ 中，噬菌体浓度下降幅度更大，对噬菌体的效价有一定程度的削弱。但是在 24 小时内在下降最大的 50℃ 中，噬菌体浓度下降小于 0.7lg PFU/mL。根据温度对噬菌体效价的影响，我们确定可以通过选择十一的温度来提高噬菌体活性，由此提高噬菌体在应用中的实际意义。

(5) pH 稳定性的测定

利用双层平板法计算每毫升的有效噬菌体数量。根据图 3.3 c，不同浓度的 pH 值对霍氏肠杆菌噬菌体活性稍有影响。在同样的 25℃ 条件下，测试噬菌体在 pH3-11 之间的状态。其中在偏酸以及偏碱的环境下噬菌体浓度都稍有下降。其中偏酸的 pH3 环境下，噬菌体浓度下降程度最大，达到了 0.8lg PFU/mL 左右。噬菌体在 pH7-8 时效果最好，噬菌体浓度最高，最稳定。而在偏碱的 pH11 的环境下，噬菌体的浓度下降幅度较少，只下降了 0.4lg PFU/mL。据 pH 对噬菌

体效价的影响，可以通过选择适宜的 pH 来提高噬菌体活性，由此提高噬菌体应用中的实际意义。

(6) 紫外线稳定性的测定

使用双层平板法计算每毫升的有效噬菌体数量。根据图 3.4 d，霍氏肠杆菌噬菌体在 UV-B 灯的照射下大体趋势是照射的时间越长，效价越低。在前 5 分钟时，效价下降明显迅速，下降了约 0.35lg PFU/mL。而在五分钟以后，效价下降速度明显变慢，说明经过一段时间的紫外照射后的噬菌体可能会产生一定的抗性，但是整体趋势依旧为效价减弱，在随后的 40 分钟中，效价一共降低了 0.15lg PFU/mL。而在整个 50 分钟时长中，效价仅下降 0.50g PFU/mL，总体表明霍氏肠杆菌噬菌体在自然紫外线条件下活性稳定。

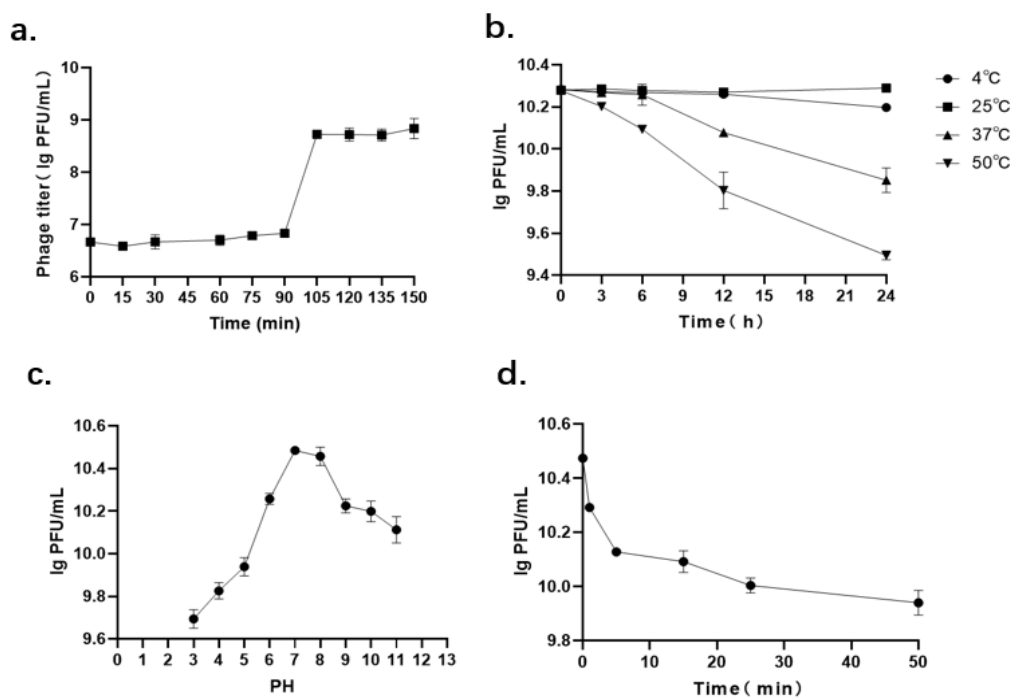


图 3.3 噬菌体 pEh2001 生物学特性测定 a. 一步生长曲线测定 b. 温度稳定性测定 c. pH 稳定性测定 d. UV-b 稳定性测定

3.3 讨论

猕猴桃溃疡病对中国产生了巨大的经济影响，急需控制方法来减少猕猴桃溃疡病的发生。而传统的控制方法不仅效率低下，同时还会严重地损害生态环境，所以目前还缺失对环境友好的控制方案。

因为噬菌体只会裂解对应的单一宿主细菌，所以噬菌体对人类、动物、植物和环境都相对安全。同时，由于噬菌体的多样性，使得环境中的噬菌体种类和数量十分丰富，在生物圈中其数量达 10^{31} 之巨(Ji et al. 2021)。因此，噬菌体疗法是治疗猕猴桃溃疡病生态防治的一个新思路。此实验为了解决猕猴桃溃疡病当中的致病菌霍氏肠杆菌，采用了噬菌体富集分离法（王鹏等，2020），从猕猴桃发病枝条，污水以及土壤总分离出一株噬菌体 pEh2001，并对其进行纯化分析。

本实验的纯化分析分为以下几个步骤：首先，为了确定噬菌体本身的特点，需要提取噬菌体的核酸物质来确定核酸类型。噬菌体具有 DNA 或 RNA 两种核酸类型（雷庆等，2007）。提取核酸后，分别用 DNA 消化酶和 RNA 消化酶处理，再通过琼脂糖电泳分析条带。结果表明 pEh2001 基因组经 DNA 酶处理过后无条带，可判断其核酸类型为 DNA。并且，根据电镜图以及国际病毒委员会噬菌体 12 个科分类标准，此噬菌体符合长尾病毒科特征。

其次，为了更有效地运用噬菌体防止猕猴桃细菌病，了解噬菌体的生物学特性是十分必要的。每个噬菌体的适合生长的温度、pH 以及对紫外线的敏感性都有着或多或少的差异，这些生理特征都会直接影响噬菌体的活性。不同噬菌体的潜伏期、裂解量等也决定着噬菌体的裂解能力强弱以及噬菌体的选择。最佳感染复数，一步生长曲线，温度，pH 以及紫外线均为重要的噬菌体生物学特性。首先，噬菌体只有在最佳感染复数下才能对宿主菌达到最佳的感染效果。在本试验中，霍氏肠杆菌噬菌体 pEh2001 的最佳感染复数为 1。因此在后续使用噬菌体时和宿主菌用 MOI=1 的比例便可以使得噬菌体量最大化。其次，一步生长曲线展示了噬菌体的潜伏期时间，裂解期时间，以及爆发量。其中最为重要的是潜伏期与爆发量，潜伏期短的噬菌体可以保证噬菌体的裂解速度，从而在作物发病初期迅速发挥作用。而爆发量大则可以使得更多噬菌体在一个周期内产生，从而感染更多宿主菌。在本试验中，霍氏肠杆菌噬菌体 pEh2001

的潜伏期约为 90 分钟，时间稍长，而裂解量为 130。温度，pH，以及紫外线都是一些极有可能影响噬菌体稳定性的重要因素。其中，低温下，噬菌体的降解量较小，而高温则能延长噬菌体的周期（Tey et al., 2009）。而 pH 值影响噬菌体的粘附性、感染性、细胞内复制和扩增（Britta et al., 2001）。紫外线则会导致病毒蛋白的突变和（致命）光产物的形成（Mojica et al., 2014）。所以使用噬菌体控制猕猴桃溃疡病的同时需要注意周边环境。噬菌体 pEh2001 在 4 度，25 度时表现稳定，说明其在猕猴桃溃疡病的发病高峰期，即秋，冬，初春等时期可以表现稳定。pEh2001 在 pH 值为 7-8 时存活率与稳定性最高，因为猕猴桃培养土壤为中性，表明霍氏肠杆菌噬菌体 pEh2001 会在最佳 pH 值得范围内进行工作。同时，霍氏肠杆菌噬菌体 pEh2001 有着较强得抗紫外线能力，紫外线 B 灯照射 50 min 的实验噬菌体最大灭活时间仅为 0.5lg PFU/mL，并在短时间内表现出较好的抗性，因此适用于果园猕猴桃溃疡病的防治。

4 噬菌体疗法以及应用

4.1 材料以及方法

4.1.1 主要试剂

胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB 培养基）

TSA 半固体培养基

TSA 固体培养基

MS 培养基

4.1.2 主要仪器

Legend Micro 17R 型离心机（Thermo Fisher，美国）

YT-CJ-1ND 标准型净化超净工作台（亚泰科隆，北京）

HH 系列数显恒温水浴锅（朗越，常州）

ZRG-350C-L 型人工气候培养箱（丙林，上海）

BCD-610WMBW 对开门冰箱（惠而浦，美国）

移液器（Thermo Fisher，美国）

4.1.3 主要用具

剪刀、镊子、解剖刀、锥形瓶、培养皿、研磨棒、各种规格大小的离心管、纱布。

4.1.4 实验方法

(1) 噬菌体鸡尾酒的配制

将实验噬菌体经过 0.22 μ m 孔径的一次性滤器进行过滤后，使用 TSB 无菌培养基将滤液稀释 10⁸PFU/mL，各噬菌体按照体积 1:1 的比例混合均匀后加入半固体培养基接双层平板，在 25 $^{\circ}$ C 下培养，16 小时后测其效价。

(2) 噬菌体体外治疗实验

- a. 按照 MOI 为 1 的比例加入噬菌体于 25 $^{\circ}$ C 混合培养 12 小时，使用 Tecan Infinite M200 PRO 仪器在后测量 OD₆₀₀，以检测噬菌体的裂解活性。
- b. 将对数期的致病菌菌体培养液稀释至 10⁹ CFU/mL，然后和噬菌体或噬菌体鸡尾酒混合按照 MOI 为 1 的比例混合接种于 25 mL TSB 液体培养基中，置于 25 $^{\circ}$ C 培养箱，150rpm / min 振荡培养。
- c. 使用接种致病菌而不接种噬菌体的 TSB 培养基作为细菌阴性对照，对照样品和实验样品在相同的条件下培养。
- d. 分别在 0 和 2、4、6、8、10、12、14、18 和 24 h 时取出混合液样品，25 $^{\circ}$ C 下通过涂布在固体 TSA 平板上计数以测定细菌浓度，用双层平板法测定噬菌体效价。

(3) 噬菌体体内治疗实验

- a. 筛选出 MS 培养基上组织培养繁殖的约 5 cm 高的红肉猕猴桃‘红阳’品种苗子作为试材，使用 75 % 酒精擦拭后的剪刀剪去多余、杂乱的叶片后，放置气候箱两天。
- b. 在叶片上剪切 0.5 cm 左右的切口，用 0.5cm² (1 cm \times 0.5 cm) 无菌棉布覆盖叶片上的每个切割伤口。
- c. 分别取 50 μ L 浓度为 10⁸ CFU/mL 的混合菌液悬滴接种于用于治疗组试验的猕猴桃组培苗的健康叶片上。
- d. 1h 后，三组作为治疗组，按照 MOI=1 的比例用悬滴法滴加 50 μ L 噬菌体或噬菌体鸡尾酒在覆盖叶片的棉布上。其中一组为噬菌体鸡尾酒，另一组为 Psa 噬菌体，最后一组为霍氏肠杆菌噬菌体。
- e. 2h 后移去棉布，将接种好的组培苗置于 25 $^{\circ}$ C 恒温恒湿气候培养箱，分别于菌体感染后的第 0、6、12、24 和 60 h 采集一组叶片样品，在有病斑处剪取 0.5

mm²面积的叶组织置于 1 mL 无菌 TSB 培养基中，研碎后 12,000 rpm 离心 3min，收集上清液加无菌培养基配成菌悬液，稀释后将治疗实验组通过双层平板法在 25 °C 下培养 16 h 后测定噬菌体效价，涂布平板法培养 20 h 测细菌浓度。

4.2 结果

4.2.1 体外实验

体外实验通过在液体培养基内混合培育噬菌体与致病菌菌体，并将其涂布在固体培养基上来确定细菌浓度和噬菌体效价。各重复取平均值，以横坐标为时间，纵坐标为噬菌体效价和菌落浓度的对数值，绘制对应的浓度变化图 4.1。据图可见，菌落浓度在加了霍氏肠杆菌噬菌体 pEh2001 后仅增长了约 0.8lg CFU/mL，而在未增加噬菌体的对照组菌液当中，菌液的浓度在 24 小时内增长了约 2.47 lg CFU/mL，在 24 小时当中可以杀灭大约 1.67lg CFU/mL 的菌体，杀灭率达到百分之 67.6 左右。同时，在 24 小时期间噬菌体效价稳步上涨，浓度增加约 1.82lg PFU/mL。因此结果表明，噬菌体对宿主菌的灭杀效果较好，且噬菌体在灭杀菌体的过程中能够迅速增殖。

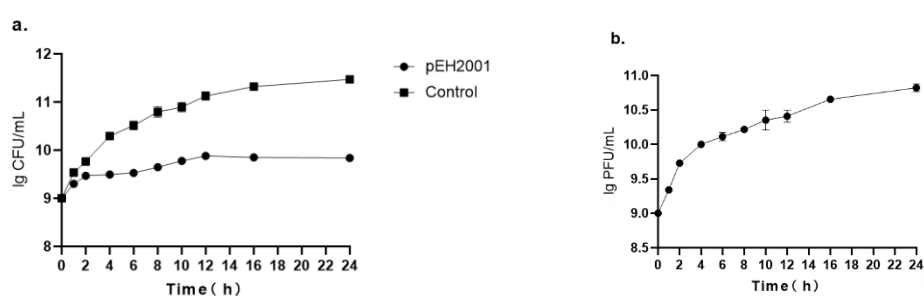


图 4.1 噬菌体 pEh2001 对霍氏肠杆菌的体外裂解效果。a.噬菌体裂解曲线，b.噬菌体效价检测。

4.2.2 噬菌体鸡尾酒对猕猴桃溃疡病复合侵染的防治效果

体内实验通过在猕猴桃叶片切口处加入混合菌体以及不同种类的噬菌体与噬菌体鸡尾酒来确定噬菌体的效价以及效果。混合菌体为 Psa 菌体和霍氏肠杆菌菌体，用来模拟真实的猕猴桃溃疡病复合侵染。三组治疗组分别为单独加入 Psa 噬菌体，单独加入霍氏肠杆菌噬菌体以及加入混合 Psa 噬菌体与霍氏肠杆菌噬菌体后的噬菌体鸡尾酒。根据图 4.2 与表格 4.1，使用噬菌体鸡尾酒治疗的叶片整体无感染症状，叶片无明显褐色部分，没有出现溃疡部分以及结痂流脓的情况。但是，单独使用 Psa 噬菌体或者霍氏肠杆菌噬菌体的治疗组分别有感染症状。感染后的叶片褐色部分明显，有溃疡部分以及结痂流脓的情况。当使用噬菌体鸡尾酒治疗复合侵染时，剩余的菌落计数保持在 1.5×10^4 ，而当 Psa 噬菌体单独使用时菌落计数为 3.6×10^7 ，当霍氏肠杆菌噬菌体单独使用时为 2.1×10^7 。由此可看出使用噬菌体鸡尾酒可以比单独使用 Psa 噬菌体或者霍氏肠杆菌噬菌体更有效地防止病变。此外，当使用噬菌体鸡尾酒治疗 Psa 以及霍氏肠杆菌时，噬菌斑计数保持在 2.4×10^9 ，而当 Psa 噬菌体单独使用时噬菌斑计数为 4.6×10^8 ，当霍氏肠杆菌噬菌体单独使用时为 5.1×10^8 。由此可以看出噬菌体鸡尾酒在使用时，两种噬菌体未互相影响生长，反而产出了更多的噬菌斑。由此表明，噬菌体鸡尾酒在体内对猕猴桃溃疡病的治疗效果优于单一噬菌体。



图 4.2 体内实验中噬菌体对霍氏肠杆菌的治疗效果：a) Psa 噬菌体单独，b) pEh2001 单独，c) 包括 Psa 噬菌体与 pEh2001 的噬菌体鸡尾酒

表格 4.1 体内实验中噬菌体对霍氏肠杆菌的治疗效果

Psa 噬菌体单独	pEh2001 单独	噬菌体鸡尾酒
-----------	------------	--------

菌落计数 (CFU/mL)	$3.6 \pm 1.8 \times 10^7$	$2.1 \pm 0.8 \times 10^7$	$1.5 \pm 0.74 \times 10^4$
噬菌体计数 (PFU/mL)	$4.6 \pm 0.21 \times 10^8$	$5.1 \pm 1.2 \times 10^8$	$5.1 \pm 1.2 \times 10^8$

4.3 讨论

在以往报道中，猕猴桃溃疡病的病原体通常为 Psa，而治疗方案也是针对 Psa 设计的。此报道在 Psa 的基础上成功分离另一株致病菌，即霍氏肠杆菌。霍氏肠杆菌作为一个在猕猴桃溃疡病中新发现的致病菌，在有关注猕猴桃溃疡病研究中并无报道应用霍氏肠杆菌噬菌体防治猕猴桃溃疡病的复合侵染。

霍氏肠杆菌噬菌体是防治霍氏肠杆菌的一种新型治疗方案。在其他关于应用霍氏肠杆菌噬菌体防治霍氏肠杆菌的研究当中，使用的噬菌体有着良好的治病效果。在 2021 年，Cao-wei Chen 等人发表了关于一株霍氏肠杆菌噬菌体 P.A-5 的研究报告。该研究报告结果表明此噬菌体可以在八小时内完全阻止霍氏肠杆菌在猪肉当中的生长 (Cao-wei Chen, 2021)。同时，在猕猴桃溃疡病的相关研究中同样发现噬菌体疗法的出现。雷庆等人在 2007 年发表的论文就首次介绍了以 Psa 为指示菌，分离出了一株噬菌体。并且使用其来防治猕猴桃溃疡病的可能性 (雷庆, 2007)。近期，Pinheiro 等人报道了噬菌体 phi 6，并且结果表明此噬菌体显著降低了 Psa 的体外活性，可作为治疗丁香假单胞菌的一种潜在有效的替代品 (Pinheiro et al., 2019)。因此，从之前报道可判断利用噬菌体或噬菌体鸡尾酒防治猕猴桃溃疡病具有较高的可行性。本研究分离鉴定的霍氏肠杆菌噬菌体 pEh2001 对宿主菌具有高效的裂解能力，可以应用于猕猴桃溃疡病复合侵染的防治。

本研究发现猕猴桃溃疡病的发病过程很可能伴随复合侵染。而复合侵染在植物性疾病当中的解决方法非常有限，因为植物细菌病当中的复合侵染的生长曲线并不能反应单个病菌感染的生长曲线，其中不同的病菌会对彼此发生干扰，导致有多个不同的侵染模型 (Alberto P, Macho 2007)。因此，为了尝试解决植物性疾病当中的复合侵染，本实验用不同的噬菌体以及噬菌体鸡尾酒测试

其灭杀率。为了模拟复合侵染情况，本实验在猕猴桃叶片中同时加入了 Psa 与霍氏肠杆菌两种致病菌。随后分成三组，分别测试单独加入 Psa 噬菌体，单独加入霍氏肠杆菌噬菌体以及加入混合 Psa 噬菌体与霍氏肠杆菌噬菌体后的噬菌体鸡尾酒后的效果。单独 Psa 噬菌体以及单独霍氏肠杆菌噬菌体的加入均没有很好的抑制病情，整体治病菌体数量减少并不明显。而在加入了混合 Psa 噬菌体与霍氏肠杆菌噬菌体后的噬菌体鸡尾酒到猕猴桃叶片中后，病情得到了很好的限制缓解作用，菌体数量下降明显并且噬菌体数量有更大幅度的上升。结果表明，在防治复合侵染中使用噬菌体鸡尾酒比单一噬菌体有更好的治疗效果。

5 结论以及展望

5.1 结论

本研究从猕猴桃溃疡病发病枝条中分离鉴定一株霍氏肠杆菌，感染实验表明该菌有可能参与溃疡病的复合侵染。将霍氏肠杆菌作为宿主菌株，成果分离1株高效烈性噬菌体并分析其生物学特性，将该噬菌体与 Psa 噬菌体一起应用于猕猴桃组培苗复合侵染模型，评估噬菌体鸡尾酒对猕猴桃溃疡病的治疗效果，为田间猕猴桃溃疡病复合侵染的生物防治提供重要资料。

(1) 在采摘自四川省苍溪县红心猕猴桃果园“红阳”品种患有溃疡病的枝条上分离到一株新的致病菌，通过鉴定发现为霍氏肠杆菌 (*E. hormaechei*)，致病性实验发现其可以单独感染猕猴桃叶片，与 Psa 复合侵染后能够加重症状。

(2) 从分离所得的霍氏肠杆菌为宿主菌，成功分立到一株霍氏肠杆菌噬菌体。经鉴定，其核酸成分为 DNA，属于尾病毒科长尾病毒科。潜伏期为 90 分钟左右，裂解期为 20 分钟左右，裂解量为 130 左右。潜伏期稍长，但是裂解量大。同时，在 37 摄氏度以下噬菌体较为稳定，pH 在 7-8 时存活率最高，并且有较好的紫外辐射抗性。

(3) 霍氏肠杆菌噬菌体在体外实验中表现良好，灭活率约达 67%。在猕猴桃组培苗复合侵染模型中，含有 Psa 噬菌体和霍氏肠杆菌噬菌体的噬菌体鸡尾酒防治效果出色，比使用单一噬菌体治疗效果更好。结果表明噬菌体鸡尾酒是控制复合侵染的可行选择。

5.2 展望

使用噬菌体作为猕猴桃溃疡病的防治手段还并不完善，但是利用噬菌体作为猕猴桃溃疡病的生物防治手段有着良好的发展前景。噬菌体疗法与传统抗生素疗法相比具有更多的优势，包括宿主特异性，自我复制能力，以及对环境友好等。因为噬菌体基因组序列小，所以噬菌体药剂所需的研发时间短，成本低

廉。并且，通过调整噬菌体制剂的实施时间，如：在适当的温度、pH、紫外线等环境因素下可以延长噬菌体存活时间，尽可能有着更好的防治效果。

在本实验中，发现猕猴桃溃疡病很可能伴随着细菌复合侵染。通过组培苗实验，霍氏肠杆菌与 Psa 噬菌体混合配制的鸡尾酒对解决 Psa 以及霍氏肠杆菌导致的复合侵染表现良好。因此可以预测，噬菌体鸡尾酒在复合侵染的生态防治中有着较好的发展前景。

本研究主要在实验室中进行，未能有效地开展田间试验，还需进一步探索并确定噬菌体疗法在实际应用中的可行性。另外，本实验仅分离到一株霍氏肠杆菌噬菌体，后续还需分离更多的不同类型噬菌体混合使用，以提高防治效率。

6 参考文献

- 田磊, 陈中举, 孙自镛. 2005—2014 年 CHINET 肠杆菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志. 2016.
- 王丹丹, 王清明. 丁香假单胞菌的分子生物学研究进展[J]. 西北农业学报, 2017.
- 康华军, 温智浩, 袁军海. 新疆加工番茄细菌性斑点病与溃疡病复合侵染鉴定及防治建议[J]. 中国蔬菜(第六期). 2018.
- Sule I, Agbabiaka T. Antibacterial Effect of some Plant Extracts on Selected Enterobacteriaceae[D]. 1515, Ilorin, Nigeria: Department of Microbiology, University of Ilorin. 2008.
- 吴小龙. 玉米青枯病菌的鉴定、生物学特性及生物防治研究[D]. 四川农业大学. 2010.
- DUGUID J P, OLD D. Adhesive Properties of Enterobacteriaceae[M]. 7. Chapman and Hall. 1980.
- FRIESEN M L, MATHIAS A. Mixed infections may promote diversification of mutualistic symbionts: why are there ineffective rhizobia?[J]. EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. 2009.
- Lenzi A, Marvasi M, Baldi A. Agronomic practices to limit pre- and post-harvest contamination and proliferation of human pathogenic Enterobacteriaceae in vegetable produce[D]. Department of Agriculture, Food, Environment and Forestry (DAGRI), University of Florence. Florence, Italy, Department of Biology, University of Florence. Florence, Italy. 2020.
- 朱海云, 李勃, 李燕, 等. 丁香假单胞菌猕猴桃致病变种的遗传多样性及进化关系[J]. 微生物学杂志. 2013.
- 池再香, 蒋仕华, 白慧. 冬春季低温高湿条件易引发贵州红心猕猴桃溃疡病[J]. 中国农业气象. 2019.
- 马超, 丛聪, 王丽丽. 噬菌体控制植物细菌性疾病的研究进展[J]. 中国抗生素杂志. 2017.
- 李莎莎. 猕猴桃溃疡病相关细菌鉴定及致病性研究[D]. 安徽农业大学植物保护学院. 2013.
- 雷庆. 猕猴桃溃疡病的病原分类、噬菌体及发生规律研究[D]. 四川农业大学. 2007.
- 王忠肃 唐显富 刘绍基. 猕猴桃细菌溃疡病 (Actinide bacterial canker) 病原细菌鉴定[J]. 西南农业大学学报. 1992.
- 吴水美. 红心猕猴桃种植与病虫害防治技术[J]. 农业工程技术. 2021.
- 李军德. 红阳猕猴桃有别于其他品种的突出特征[EB/OL]. 2021.
- 刘剑波. 谈猕猴桃病虫害的防治[J]. 农业开发与装备. 2017.
- 李璐瑶, 刘梦佳, 滕明明等. 霍氏肠杆菌生物学特性的研究[J]. 畜牧兽医杂志. 2017.
- Akbari M, Bita Bakhshi and Shahin Najar Peerayeh. Particular Distribution of Enterobacter cloacae Strains Isolated from Urinary Tract Infection within Clonal Complexes[D]. Tehran, Iran: Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences,

- Tarbiat Modares University. 2014.
- Frampton R A, Taylor C, Angela V. Holguín Moreno, etc. Identification of Bacteriophages for Biocontrol of the Kiwifruit Canker Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014.
- McCann H C, Y, Li L, et al. Origin and Evolution of the Kiwifruit Canker Pandemic[J]. *Genome Biol. Evol.* 2017.
- 承河元, 李瑶, 万嗣, 章健, 庞庆, 李果, 邢家华. 安徽省猕猴桃溃疡病菌鉴定[J]. *安徽农业大学学报*. 1995.
- 梁英梅, 张星耀, 田呈明, 高爱琴, 王培新. 陕西省猕猴桃枝干溃疡病病原菌鉴定[J]. *西北林学院学报*. 2000.
- Ji M, Liu Z, Sun K, et al. Bacteriophages in water pollution control: Advantages and limitations[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2021.
- 王鹏, 钟佑宏, 李伟. 一种富集噬菌体的方法: CN110791481A[P]. 2020.
- Tey et al. 猕猴桃溃疡病的病原分类、噬菌体及发生规律研究[D]. 四川农业大学. 2007.
- Mojica K, Brussaard C. Factor's affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *Fems Microbiology Ecology*. 2014.
- Cao-wei Chen, Lei Yuan, Wen-yuan Zhou, Isolation and genomic characterization of P.A-5, a novel virulent bacteriophage against *Enterobacter hormaechei*. *Microbial pathogenesis* vol. 152. 2021.
- 雷庆, 叶华智, 余中树. 猕猴桃溃疡病菌噬菌体的初步研究. *安徽农业科学, Journal of Anhui Agri.Sci.* 2007.
- Macho AP, Rufián JS, Ruiz-Albert J. Competitive Index: Mixed Infection-Based Virulence Assays for Genetic Analysis in *Pseudomonas syringae*-Plant Interactions. *Methods Mol Biol.* 2016.

7 致谢

感谢北京林业大学的金一老师的理论以及实验指导，林业大学资源微生物学实验室的无私资助，上海生工生物工程有限公司提供的测序支持，以及刘彦希和刘梦娇两位学姐在实验操作方面的帮助。此论文想法来源于 Richard 同学在疫情期间对猕猴桃溃疡病的了解以及探索。Richard 和 Devin 同学共同参与并且完成了实验，数据分析，以及后期的论文撰写，图片制作等全过程。在此，对金一老师的悉心指导以及无私帮助表示衷心的感谢。