

余成鹏, 胡蓉花, 林培炯, 等. 4 种噬菌体对寄主青枯菌的敏感性及其作用受体分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 82-87.
YU Chengpeng, HU Ronghua, LIN Peijiong, et al. Sensitivity of four phages to host bacterium *Ralstonia solanacearum* and analysis of their receptors[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 82-87.

4 种噬菌体对寄主青枯菌的敏感性及其作用受体分析

余成鹏¹, 胡蓉花², 林培炯¹, 李杏蔚¹, 钟 敏¹, 刘琼光^{1,3}
(1 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642; 2 吉安市烟草公司, 江西 吉安 343000;
3 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】明确不同噬菌体混合对茄劳尔氏菌(青枯菌)*Ralstonia solanacearum* 裂解能力和对噬菌体抗性产生的影响, 了解 4 种噬菌体的作用受体。【方法】将 4 种噬菌体 P1556-1、P1556-2、P7-1 和 P1521 两两混合后, 比较其在青枯菌平板上产生的噬菌斑大小; 噬菌体与青枯菌混合培养测定青枯菌对噬菌体的抗性; 通过噬菌体与脂多糖和膜蛋白的吸附试验测定噬菌体的作用受体。【结果】噬菌体 P1556-1 产生的噬菌斑最大, 裂解青枯菌的能力强。4 种噬菌体两两混合产生的噬菌斑与单一噬菌体产生的噬菌斑大小没有显著差异, 但可延缓抗噬菌体的青枯菌产生。噬菌体 P1556-2 可被青枯菌的脂多糖吸附, P1521 能被脂多糖和膜蛋白吸附, 而 P1556-1 和 P7-1 均不能与脂多糖和膜蛋白作用。【结论】不同噬菌体混合不能提高其裂解青枯菌的能力, 但可以延缓抗性青枯菌的产生; 不同噬菌体作用受体不同。

关键词: 青枯菌; 裂解性噬菌体; 寄主抗性; 受体; 噬菌斑
中图分类号: S432.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)02-0082-06

Sensitivity of four phages to host bacterium *Ralstonia solanacearum* and analysis of their receptors

YU Chengpeng¹, HU Ronghua², LIN Peijiong¹, LI Xingwei¹, ZHONG Min¹, LIU Qiongguang^{1,3}
(1 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Ji'an Tobacco Company, Ji'an 343000, China; 3 Key Laboratory of Microbial Signals
and Disease Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the lysis abilities of different phages mixtures against *Ralstonia solanacearum*, study their effects on the generation of phage-resistant strains, and clarify the receptors of four types of phages. 【Method】Four types of phages, including P1556-1, P1556-2, P7-1 and P1521, were mixed in pairs. The sizes of plaques on *R. solanacearum* plates were determined. The resistance of *R. solanacearum* to phages was measured by co-culture of *R. solanacearum* and phages. Adsorption tests using phages, lipopolysaccharide (LPS) and membrane protein were conducted to determine the receptors of phages. 【Result】Phage P1556-1 produced the largest plaque, indicating a strong lytic ability against *R. solanacearum*. The plaque sizes from the mixtures of two types of phages did not significantly differ from those of individual phages, while mixing two types of phages could slow down the generation of phage-resistant strains. Phage P1556-2 could be adsorbed by LPS of *R.*

solanacearum, phage P1521 could be adsorbed by both LPS and membrane protein, while phage P1556-1 and P7-1 could be adsorbed by neither LPS nor membrane protein. 【Conclusion】 Mixing different phages can not improve the lysis ability against *R. solanacearum*, but can delay the generation of resistant host strain. The receptors of different phages are different.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; lytic phage; host resistance; receptor; plaque

茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum*, 俗称青枯菌, 引起的烟叶青枯病是烟草生产中的重要细菌病害, 该病在我国大多数烟叶种植区普遍发生且为害严重, 已造成巨大的经济损失。目前烟草青枯病的防治主要以轮作和化学防治为主, 但效果不理想。噬菌体是侵染细菌的病毒, 具有高度的特异性及快速裂解宿主 (寄主) 的能力, 可用于动物和人体细菌疾病的治疗^[1-4]。由于细菌对抗生素的抗性日趋增强, “超级细菌” 对细菌病害防治具有严重的潜在威胁, 利用噬菌体来防治植物细菌病害受到广泛关注, 已有较多的相关研究^[5-13]。例如, 利用噬菌体防治番茄和辣椒细菌性疮痂病 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*^[6]、天竺葵细菌性枯萎病 *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*^[7]、柑橘溃疡病 *Xanthomonas citri* pv. *citri*^[8]、梨火疫病 *Erwinia amylovora*^[9] 和大白菜软腐病 *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*^[10] 等植物细菌病害, 已取得了一定的成效。在作物青枯病防治方面, Addy 等^[11] 发现感染噬菌体 ϕ RSM1 和 ϕ RSM3 后, 青枯菌毒性明显减弱, 丝状噬菌体 ϕ RSM3 的施用可明显减轻番茄青枯病的发病率; 施用裂解性噬菌体可以有效防治作物青枯病^[13]。

对于寄主范围广、遗传多样性丰富的青枯菌来说, 噬菌体具有高度的特异性, 因此利用噬菌体来防治青枯病受到寄主范围的限制。这也是噬菌体未能广泛地实际应用的原因。此外, 有关青枯菌噬菌体的抗性机制及作用受体尚不完全清楚, 本文探究噬菌体与青枯菌的互作, 分析青枯菌对噬菌体的敏感性与抗性, 研究噬菌体的作用受体, 以期利用噬菌体防治作物青枯病提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与噬菌体

供试的 4 种青枯菌噬菌体 P1556-1、P1556-2、P7-1 和 P1521 分离自江西省吉安市烟叶种植区土壤, 以烟草青枯菌 Tb1556 作为噬菌体寄主, 所有噬菌体和青枯菌均由华南农业大学农学院细菌研究室保存和提供。

1.2 培养基及试剂

LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, LB 固体培养基加 15 g 琼脂。

普通细菌固体培养基: 牛肉膏 3 g, 酵母膏 3 g, 蛋白胨 3 g, 硫酸镁 0.25 g, 磷酸氢二钾 2 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 蔗糖 15 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。

普通细菌半固体培养基: 牛肉膏 3 g, 酵母膏 3 g, 蛋白胨 3 g, 硫酸镁 0.25 g, 磷酸氢二钾 2 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 蔗糖 15 g, 琼脂 8 g, 蒸馏水 1 000 mL。

TTC 培养基: 水解干酪素 1 g, 蛋白胨 10 g, 甘油 5 mL, 琼脂 32 g, 蒸馏水 1 000 mL, 使用前加入 10 g/L 三苯基四氮唑 (TTC) 10 mL。

8.5 g/L 的氯化钠溶液。

1.3 青枯菌及噬菌体的培养

青枯菌 Tb1556 在 TTC 平板上划线, 培养 24~48 h 后, 挑取典型单菌落于 LB 液体培养基中, 30 ℃ 条件下, 200 r/min 培养 24 h, 获得青枯菌悬液。-80 ℃ 活化噬菌体并制成含单个噬菌斑的双层平板。取单个噬菌斑与 100 μ L 青枯菌悬液接种到 10 mL LB 培养基中, 30 ℃ 条件下培养 24 h, 得到纯化的单一噬菌体。

1.4 噬菌体双层平板制备及效价测定

将噬菌体与青枯菌共培养 24 h 后, 10 000 r/min 10 min, 取上清进行 10 倍梯度稀释。取 100 μ L 噬菌体稀释液、100 μ L 青枯菌悬液和 15 mL 普通细菌半固体培养基充分混合, 随即倒入预先制备好的普通细菌培养基平板上, 30 ℃ 条件下培养 24 h, 根据平板上的噬菌斑个数, 计算噬菌体效价。

1.5 噬菌体混合对青枯菌裂解能力的影响

取 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 的青枯菌液 100 μ L 与普通细菌半固体培养基混合, 倒入空白培养皿中, 吹干备用。分别将过滤后效价为 1.0×10^{10} PFU/mL 的噬菌体 (单一噬菌体及 1:1 两两混合) 各 3 μ L, 点接至含青枯菌的普通细菌半固体培养基, 30 ℃ 条件下培养 24 h 后, 测量噬菌斑直径, 试验重复 3 次。

1.6 抗噬菌体菌株分析

取 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 的青枯菌液 100 μ L 分别与 4 个

噬菌体 (效价为 1.0×10^{10} PFU/mL) 及以体积比 1:1 混合的噬菌体各 100 μ L 接种于 10 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 条件下, 200 r/min 振荡培养, 并于 24、48 和 72 h 测定青枯菌的 $D_{600\text{ nm}}$, 若青枯菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 越大, 说明青枯菌对噬菌体产生抗性的菌株数量越多, 以不加噬菌体的青枯菌培养为对照。每个处理重复 3 次。

1.7 噬菌体受体分析

1.7.1 青枯菌脂多糖提取 采用热酚法提取青枯菌脂多糖, 参考康洁^[14]的方法进行。将培养至 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 的青枯菌悬液, 5 000 r/min 10 min, 弃上清, 菌体用 8.5 g/L NaCl 溶液 20 mL 洗涤 2 次, 离心, 沉淀悬浮于 20 mL 8.5 g/L 的 NaCl 溶液中。66 $^{\circ}$ C 水浴, 并加入等量的预热的 ϕ 为 90% 的苯酚溶液, 搅拌 25 min, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 2 000 r/min 15 min, 取上层水相, 按此方法重复 1 次。取 2 次水相混合、透析, 直至氯化铁检测不到酚为止, 即得到粗制脂多糖。

1.7.2 噬菌体作用于青枯菌的受体 为明确噬菌体的作用受体, 选择青枯菌的脂多糖和菌体表面膜蛋白进行分析。将青枯菌 Tb1556 加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 mg/mL, 37 $^{\circ}$ C 条件下处理 30 min, 以消化青枯菌细胞表面蛋白。

将 100 μ L 噬菌体分别与 900 μ L 无菌水、青枯菌、蛋白酶 K 处理后的青枯菌及脂多糖提取液混合, 30 $^{\circ}$ C 条件下静置 30 min 后, 10 000 r/min 10 min, 取上清, 按 1.4 的方法, 测定噬菌体效价, 每个处理重复 3 次, 并计算噬菌体吸附率。

1.8 数据处理

测定噬菌体双层平板各处理组的噬菌体效价 (PFU/mL), 分别计算脂多糖吸附率及表面蛋白吸附率, 公式如下:

噬菌体效价=平板噬菌斑个数 $\times 10\times$ 稀释倍数,
脂多糖吸附量=空白组效价-脂多糖处理组效价,
表面蛋白吸附量=青枯菌处理组效价-蛋白酶 K 处理组效价,
青枯菌吸附量=空白组效价-青枯菌处理组效价,

脂多糖 (蛋白) 吸附率=脂多糖 (蛋白) 吸附量/青枯菌吸附量 $\times 100\%$ 。

研究数据使用 SPSS 18.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 噬菌体混合对青枯菌裂解能力的影响

图 1 为 4 种不同噬菌体及其两两混合后对青枯菌 Tb1556 平板产生噬菌斑的示意图。单一噬菌体及噬菌体两两混合后在平板上产生噬菌斑的直径见图 2, 由图 2 可知, 单一噬菌体形成噬菌斑的直径由大到小分别为 P1556-1>P7-1>P1556-2>P1521, 且在统计上具有显著差异 ($P<0.05$); 除 P1556-2 与 P1521 混合后产生的噬菌斑略大于各自形成的噬菌斑外, 其他噬菌体混合后并不能形成更大的噬菌斑, 结果表明, 噬菌体的混合并不能显著提高其对青枯菌的裂解能力。

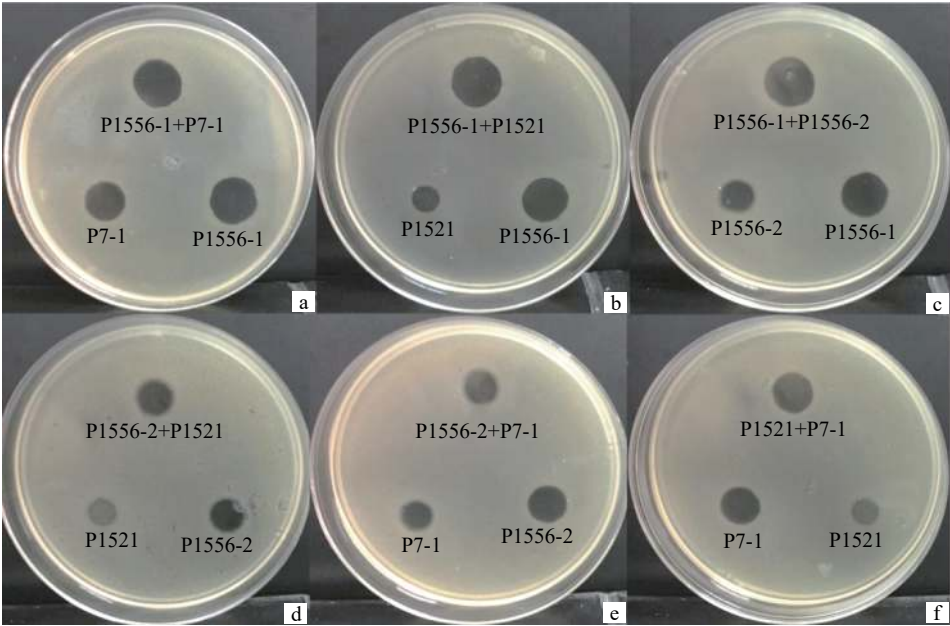


图 1 4 种不同噬菌体及两两混合对青枯菌 Tb1556 平板产生的噬菌斑

Fig. 1 The plaques of four types of phages and their mixtures in pairs on *Ralstonia solanacearum* Tb1556 plates

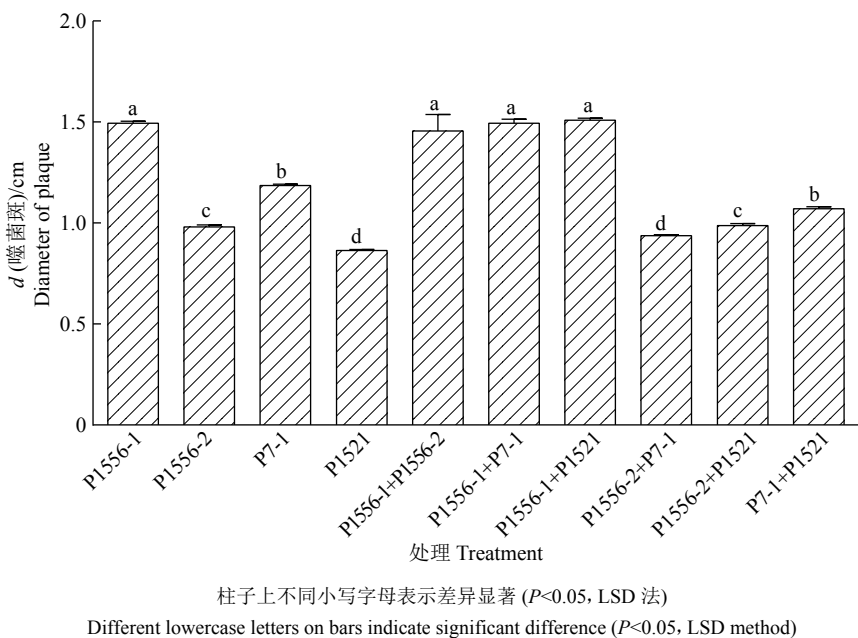


图 2 4 种不同噬菌体及其两两混合对青枯菌 Tb1556 生长的影响

Fig. 2 Effects of four types of phages and their mixtures in pairs on *Ralstonia solanacearum* Tb1556 growth

2.2 青枯菌对噬菌体的抗性

在与噬菌体斗争的过程中, 青枯菌进化出多种抵抗噬菌体的机制, 从而避免被噬菌体消灭殆尽。本试验通过单一噬菌体及噬菌体两两混合后与青枯菌共培养, 在不同时间段测定青枯菌的 $D_{600\text{ nm}}$, 来探究青枯菌对不同噬菌体产生抗性的时间和概率。

在培养 24 h 后, 含有噬菌体的处理组 $D_{600\text{ nm}}$ 均接近 0, 表明在该时间范围内, 各噬菌体处理组均没有产生抗性青枯菌, 或产生量极其少而未能检测出。当噬菌体与青枯菌共培养 48 和 72 h 后, 均发现有抗噬菌体的青枯菌产生。其中 P1556-1 在共培

养 48 h 后, $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.210, 72 h 达到 0.641, 表明青枯菌对 P1556-1 的抗性增长最快; 其次为 P1556-2 和 P1521, 在培养 48 h 后, $D_{600\text{ nm}}$ 分别为 0.104 和 0.106, 培养 72 h 后, $D_{600\text{ nm}}$ 分别为 0.396 和 0.492; 培养 48 h 内, 青枯菌抗 P1556-1、P1556-2 与 P1521 菌株便开始产生, 而 P7-1 在 72 h 后才开始大量产生抗性菌株, 其 $D_{600\text{ nm}}$ 在 48 h 为 0.023, 72 h 为 0.355(图 3)。

噬菌体混合测定结果 (图 3) 表明, 含有噬菌体 P7-1 能有效降低抗性菌的产生速度, 且比单一噬菌体效果更明显; 与单一噬菌体处理组相比, 含有噬菌体 P1556-2 和 P1521 的处理组在共培养 48 h 时,

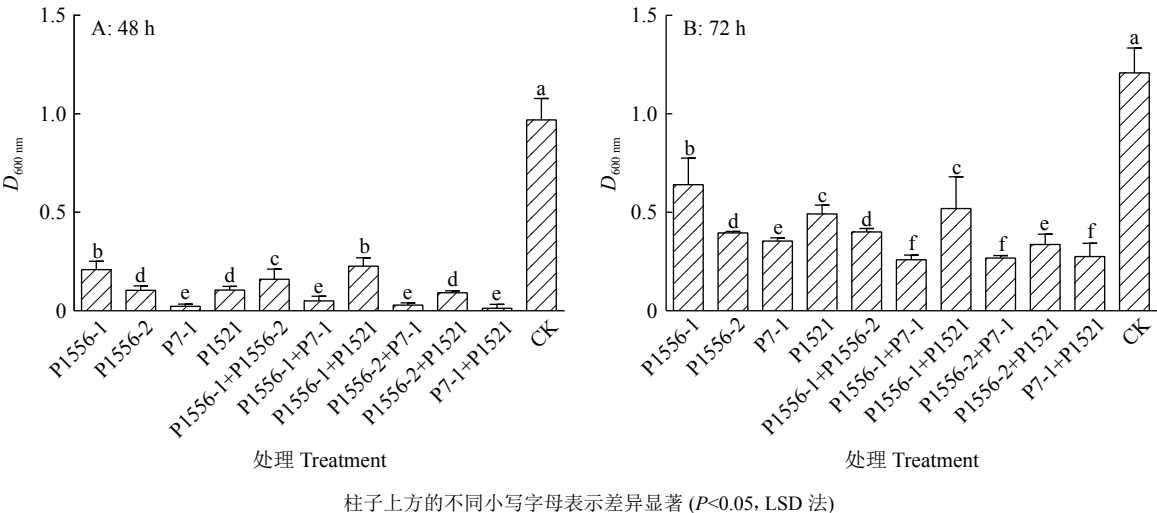


图 3 噬菌体与青枯菌 Tb1556 共培养下的青枯菌 $D_{600\text{ nm}}$

Fig. 3 $D_{600\text{ nm}}$ of *Ralstonia solanacearum* Tb1556 after co-culturing with phages

产生抗性菌株的差异不明显,但在共培养 72 h 后,却能减缓抗性菌的产生速度。

2.3 噬菌体作用受体分析

噬菌体吸附试验结果发现,噬菌体 P1556-2 能够被寄主菌的脂多糖吸附,而且吸附率高达 99.80%,但不吸附表面蛋白,表明脂多糖是该噬菌体的作用受体;P1521 既可以吸附脂多糖,也能吸附表面蛋白,或细菌鞭毛等其他受体,说明该噬菌体可能具有多种作用受体,侵染机制更为复杂;噬菌体 P1556-1 和 P7-1 对脂多糖和膜蛋白的吸附率较低,属于其他种类受体 (图 4)。

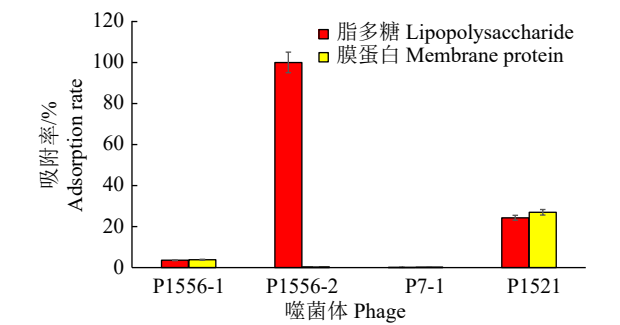


图 4 噬菌体对脂多糖和膜蛋白的吸附率
Fig. 4 Adsorption rates of lipopolysaccharide and membrane protein by phages

3 讨论与结论

随着噬菌体成功应用于治疗人类疾病,利用噬菌体防治植物细菌病害已经受到广泛关注。噬菌体的寄主范围以及抗噬菌体菌株的产生,在一定程度上影响噬菌体防治植物细菌病害的效果。筛选寄主范围广泛、裂解能力强、且不易使寄主产生抗性的噬菌体,对于应用噬菌体防治植物病害具有重要意义。

本研究选择的 P1556-1、P1521、P7-1 和 P1556-2 噬菌体寄主范围较广,前期研究表明,对来自不同地区的 75 个青枯菌菌株, P1556-1、P1521、P7-1 和 P1556-2 分别能侵染其中 86.7%、84.0%、81.3% 和 77.3% 的菌株^[15]。本研究结果发现,寄主范围最为广泛的噬菌体 P1556-1 在平板上产生的噬菌斑最大,说明它裂解青枯菌的能力强,表明噬菌体的裂解能力可能与寄主范围存在一定关系。

用噬菌体治疗疾病或防治植物细菌病害,可通过噬菌体间的混合及噬菌体与其他化学物质或生物的混配来实现,以达到更好的防治效果。噬菌体混合已被证明具有较好的预防青枯病的效果^[16],将噬菌体与表面活性剂混合后能够将噬菌体有效地吸附在番茄根部,从而加强噬菌体的预防作用^[17]。

然而,本研究结果发现,除 P1521 外,噬菌体两两混合后形成的噬菌斑大小与其单一噬菌体所能形成最大噬菌斑的噬菌体有关,尽管 P1556-2 与 P1521 混合后略高于 P1556-2 单独形成的噬菌斑,但效果不明显。因此,噬菌体的混合并不能明显提高其对青枯菌的裂解能力,但是否能够提高作物青枯病的防治效果,需要进一步的田间防治试验验证。

在噬菌体与青枯菌相互作用的过程中,往往会出现抗噬菌体菌株,这将极大影响噬菌体的防治效果。本研究发现,当噬菌体与青枯菌共培养 48 和 72 h 后,均发现抗噬菌体的青枯菌产生。其中青枯菌对 P1556-1 的抗性产生最快,其次是 P1556-2 和 P1521,而 P7-1 最慢。当噬菌体两两混合后发现,含有 P7-1 能有效降低抗性菌株的产生, P1556-2 和 P1521 混合 72 h 也能减少抗性菌株产生的数量。噬菌体与寄主受体结合后,寄主能够通过注入阻滞、CRISPR-Cas 系统、限制修饰系统 (Restriction-modification system, R-M system)、流产感染系统 (Abortive infection system, Abi system) 等抵抗噬菌体复制及繁殖。CRISPR 序列是一段高度保守的序列^[18],与 Cas 蛋白构成 CRISPR-Cas 系统,当发现外源核酸时,通过编辑将外源基因整合至 CRISPR 前端^[19],产生 crRNA 诱导细菌裂解外源核酸实现免疫^[20-21]。空肠弯曲杆菌 *Campylobacter jejuni* 11168R 菌株的 *cj1521* 基因从 9 个 G 突变为 10 个 G 后,对噬菌体 F336 表现出抗性^[22];流感嗜血杆菌 *Haemophilus influenzae* 能够改变 *lic2A* 基因的重复序列从而改变受体组成,对噬菌体 HP1c1 表现出抗性^[23];大肠埃希菌 *Escherichia coli* 的 *btuB* 基因在插入 IS2 序列后,噬菌体 SPC35 无法与之结合^[24]。本研究结果表明,将不同噬菌体两两混合,可以延缓抗性青枯菌的产生,这在实际应用中具有参考价值,但其抗性机理有待进一步研究。

噬菌体受体识别是噬菌体侵染细菌的第一步。噬菌体能够特异性识别寄主受体并与之结合,然后将自身遗传物质注入寄主体内进行侵染。细菌在与噬菌体长期斗争的进化过程中,会通过改变受体来应对噬菌体的侵染。革兰阴性菌的噬菌体受体包括脂多糖、膜蛋白、菌毛、鞭毛、荚膜等,其中以脂多糖和膜蛋白为主^[25],铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*^[26] 和青枯菌^[27] 噬菌体能够与细菌的鞭毛结合。本研究结果发现,噬菌体 P1556-2 的作用受体为青枯菌的脂多糖,噬菌体 P1521 能被脂多糖吸附,也能被膜蛋白吸附,表明它能与多种受体结合,侵染机制更为复杂,而噬菌体 P1556-1 和 P7-1 则不被

脂多糖和膜蛋白吸附, 其作用受体有待进一步研究。
本文关于 4 种青枯菌噬菌体及其两两混合后的裂解能力、抗噬菌体青枯菌菌株的产生, 以及噬菌体的作用受体等研究结果, 将为利用噬菌体防治作物青枯病的实际应用提供参考。

参考文献:

[1] RAHMANI R, ZARRINI G, SHEIKHZADEH F, et al. Effective phages as green antimicrobial agents against antibiotic-resistant hospital *Escherichia coli*[J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2015, 8(2): e17744.

[2] SARKER S A, SULTANA S, REUTELER G, et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: A randomized trial in children from Bangladesh[J]. *Ebiomedicine*, 2016, 4: 124-137.

[3] WALL S, ZHANG J, ROSTAGNO M, et al. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine[J]. *Appl Environ Microb*, 2010, 76(1): 48-53.

[4] WANG Y, BARTON M, ELLIOTT L, et al. Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevigata*)[J]. *Aquaculture*, 2017, 473: 251-258.

[5] SUSIANTO G, FARID M M, DHANY N R, et al. Host range for bacteriophages that infect bacterial blight pathogen on soybean[J]. *Proc Environ Sci*, 2014, 20: 760-766.

[6] FLAHERTY J E, JONES J B, HARBAUGH B K, et al. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages[J]. *Hortscience*, 2000, 35(5): 882-884.

[7] FLAHERTY J E, HARBAUGH B K, JONES J B, et al. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium[J]. *Hortscience*, 2001, 36(1): 98-100.

[8] BALOGH B, CANTEROS B I, STALL R E, et al. Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages[J]. *Plant Dis*, 2008, 92(7): 1048-1052.

[9] SCHNABEL E L, FERNANDO W G D, MEYER M P, et al. Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol[J]. *Acta Hort*, 1999, 489(489): 649-654.

[10] RAVENSDALE M, BLOM T J, GRACIAL-GARZA J A, et al. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*[J]. *Can J Plant Pathol*, 2007, 29(2): 121-130.

[11] ADDY H S, ASKORA A, KAWASAKI T, et al. Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by ϕ RSM filamentous phages[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(5): 469.

[12] ADDY H S, ASKORA A, KAWASAKI T, et al. Utilization of filamentous phage phi RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. *Plant Dis*, 2012, 96(8): 1204-1209.

[13] FUJIWARA A, FUJISAWA M, HAMASAKI R, et al. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages[J]. *Appl Environ Microb*, 2011, 77(12): 4155-4162.

[14] 康洁. 3 种方法提取大肠杆菌 *E.coli* 脂多糖的比较[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(21): 12-15.

[15] 余成鹏, 胡蓉花, 陈小强, 等. 江西和广东烟草青枯菌对噬菌体的敏感性及其聚类分析[J]. *江西农业大学学报*, 2018(4): 699-707.

[16] WEI C H, LIU J L, MAINA A N, et al. Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt[J]. *Virologica Sinica*, 2017, 32(6): 476-484.

[17] BAE J Y, WU J, LEE H J, et al. Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(12): 1613-1620.

[18] MARRAFFINI L A. CRISPR-Cas immunity against phages: Its effects on the evolution and survival of bacterial pathogens[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(12): e1003765.

[19] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709.

[20] HYNES A P, VILLION M, MOINEAU S. Adaptation in bacterial CRISPR-Cas immunity can be driven by defective phages[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4399.

[21] WEI Y, CHESNE M T, TERNES R M, et al. Sequences spanning the leader-repeat junction mediate CRISPR adaptation to phage in *Streptococcus thermophilus*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3): 1749-1758.

[22] SORENSEN M C H, van ALPHEN L B, HARBOE A, et al. Bacteriophage F336 recognizes the capsular phosphoramidate modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(23): 6742-6749.

[23] ZALESKI P. The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection[J]. *Microbiology*, 2005, 151(10): 3361-3369.

[24] KIM M, RYU S. Characterization of a T5-Like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* and *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microb*, 2011, 77(6): 2042-2050.

[25] 毛普加, 洪愉, 毛小萍, 等. 噬菌体受体及其鉴定方法[J]. *中国微生态学杂志*, 2014(6): 731-734.

[26] BAE H, CHO Y. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* podophage MPK7, which requires type IV pili for infection[J]. *Genome Announc*, 2013, 1(5): e00744-13.

[27] NARULITA E, ADDY H S, KAWASAKI T, et al. The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in phage infection in *Ralstonia solanacearum*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(4): 868-872.