

青枯雷尔氏菌噬菌体研究进展

苏靖芳^{1,2}, 于浩^{1,2}, 刘俊杰¹, 郭兆奎³, 孙宏伟³, 顾刚⁴, 王光华¹

- (1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所 黑土区农业生态重点实验室, 黑龙江 哈尔滨, 150081;
2. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆, 163319;
3. 中国烟草总公司 黑龙江省分公司 牡丹江烟草科学研究所, 黑龙江 牡丹江, 157011;
4. 福建省烟草专卖局 烟草农业科学研究所, 福建 福州, 350003)

摘要: 烟草等茄科植物青枯病的防治是世界性难题, 传统的化学方法、轮作及种植抗病品种等都不能有效控制该病害。探索一种新型、有效的生物防治方法——“噬菌体疗法”成为近年来研究的热点。噬菌体应用于细菌性疾病或病害的防治可以追溯到上世纪初, 然而伴随着抗生素的发现和广泛应用, 噬菌体疗法在相当长的时间里被忽略。近年来, 随着耐药性细菌和超级细菌的出现, 利用噬菌体防控细菌性疾病和病害的研究越来越受到人们的重视。本文简单阐述了噬菌体的早期研究与复苏的历史, 青枯雷尔氏菌噬菌体的获得方法、分类及潜在应用, 指出了噬菌体应用研究中存在的问题, 并对其以后的发展进行了展望。表 1, 参 53。

关键词: 青枯雷尔氏菌; 噬菌体; 噬菌体疗法; 生物防治

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

Research Progress of Bacteriophages Infecting *Ralstonia Solanacearum*

SU Jingfang^{1,2}, YU Hao^{1,2}, LIU Junjie¹, GUO Zhaokui³, SUN Hongwei³, GU Gang⁴, WANG Guanghua¹

- (1. Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, CAS, Harbin, 150081, China;
2. College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
3. Mudanjiang Tobacco Research Institute, Heilongjiang Branch of China National Tobacco Corporation, Mudanjiang, 157011, China;
4. Tobacco Agricultural Institute of Fujian Tobacco Monopoly Bureau, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Bacterial wilt is a destructive disease caused by *Ralstonia solanacearum* and it is distributed in many countries of the world. This disease commonly occurs in many plants, such as tobacco, eggplant and tomato, etc. Traditional methods, such as using chemicals, crop rotation, planting disease-resistant variety and regulating seedling transportation are not fully effective in controlling this plant disease. Therefore, to exploit an alternative newly and highly effective control method, the phage therapy was highlighted in recent years. Historically, the study of using bacteriophages to control bacterial diseases in human and plants can be dated back to the beginning of the last century; however, with the development and wide application of antibiotics, the phage therapy was neglected for a long time. Recently, with the appearance of drug-resistant bacteria and superbacteria, the study of using phage therapy to control bacterial diseases has been paid much attention. In this paper, we briefly reviewed the initial and revival research history of phages, the method of isolation, taxonomy and potential application of phages infecting *Ralstonia solanacearum*. Finally, several problems and future research tendencies of phage therapy were also pointed out.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; bacteriophage; phage therapy; biocontrol

0 引言

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的一种毁灭性的土传病害, 广泛分布于热带、亚热带和一些温暖地区^[1]。该病于 1880 年首次在美国北卡罗来纳州被发现^[2], 随后在世界各国均有发现, 我国广东省、湖南省及贵州省等地烟区该病危害严重, 产量损失高达 80% 左右, 已成为毁灭性病害^[3]。在烟草种植中, 综合采用生物防治^[4-5]、化学防治^[6]、种植抗病品种^[7]、调整烟苗移栽以及合

收稿日期: 2016-10-14; 修回日期: 2016-11-09.

基金项目: 中国烟草总公司科技重点项目 (110201402014)。

第一作者简介: 苏靖芳 (1990-), 女, 山东嘉祥人, 硕士研究生, 研究方向为植物病害防治。

通讯作者: 王光华 (1966-), 男, 黑龙江海林人, 博士, 研究员, 研究方向为微生物生态和植物病害生物防治。

理轮作等措施, 虽然在一定程度上能够减少该病引起的损失, 但仍无法从根本上有效控制该病的发生^[8]。鉴于引起该病的病原菌是细菌, 于是探寻一种新型的、有效的“噬菌体疗法”(利用噬菌体防治青枯病)引起人们的广泛关注。

1 噬菌体早期研究与复苏

噬菌体(Bacteriophage 或 phage)是感染细菌的病毒, 是自然界中病毒的主要存在形式, 保守估计全球噬菌体数量超过 10^{31} 个。最早噬菌体的发现可追溯到上世纪初期, 英国微生物学家 Twort (1915 年) 和加拿大细菌学家 d' Herelle (1917 年) 均在各自研究中发现病原细菌的培养物可以被某种无菌滤液溶解至澄清, 将澄清液过滤后加到同样新鲜的病原菌培养液中还能观察到相同的现象^[9]。于是, 他们将这种能使浑浊细菌培养液变澄清的无菌滤液称为细菌病毒, 即噬菌体^[9-11]。在抗生素尚未被发现的那个年代里, 噬菌体的发现无疑激起科学家探索研究利用噬菌体治疗疾病的热情。例如在 1919 年, d' Herelle 第一次尝试应用噬菌体治疗细菌性痢疾; 1921 年, Bruynoghe R 和 Maisin J 发现利用噬菌体治疗金黄色葡萄球菌引起的皮肤病, 细菌感染可在 24 h ~ 48 h 之内消退^[12]。我国在噬菌体治疗上也进行了尝试, 1958 年细菌学博士余贺教授利用噬菌体成功治疗绿脓杆菌对烧伤病人的感染, 这件事后来被拍成电影《春满人间》。

虽然早期的研究成果让人们认识到噬菌体疗法在治疗人类疾病上的重要性, 但利用噬菌体防治植物细菌性病害仍然没有被确定为是一种可靠、有效的防病措施。1963 年, Okabe 指出“一般来讲, 噬菌体在控制植物细菌性病害上没有显著的效果”^[13]。30 年后, Goto 报道称“在田间条件下应用噬菌体控制植物病害还没有成功”^[14]。此外, 由于噬菌体的寄主范围相对于抗生素来说较窄, 在医疗领域一般认为在病原体没有被确定时使用噬菌体治病的盲目性大, 导致失败的几率高^[15]。对噬菌体的研究兴趣由于种种限制和大量有效抗生素的发现而被减弱。

近年来, 随着耐药菌种的不断出现, 抗生素的治疗效果日趋下降, 特别是“超级细菌”的出现, 表明新型抗生素的研发速度远远低于细菌克服抗生素产生抗性的速度, 因此在医疗领域“噬菌体疗法”再度引起人们的兴趣^[16]。基于理论知识的丰富和研究技术手段的进步, “噬菌体疗法”在波兰已成功治疗几种由细菌引起的人类疾病^[17]; 同时, 基于“噬菌体疗法”的医疗产品, 包括喷雾、针剂和治疗多种肠道疾病的片剂在格鲁吉亚和俄罗斯得到应用, 并已进行商品化生产^[18]。针对不同种类的病原菌, 人们利用噬菌体“鸡尾酒疗法”制备了具有不同受体特异性的噬菌体合剂, 它被普遍认为是一种行之有效的制剂产品。例如格鲁吉亚 Eliava 研究所研制的噬菌体合剂配方 IntestiPhage 中包含了 23 种不同的噬菌体, 可以抑制大范围的肠道细菌^[18]。噬菌体疗法不仅成功地用于疾病的治疗, 也可以用于疾病的预防^[19], 达到治疗和保健的目的。

应用噬菌体控制疾病或病害具有以下几个潜在的优势: (1) 特异性强: 只针对目标病原菌群, 不会对环境中其他微生物产生影响, 具有较好的生态安全性^[11]; (2) 指数增殖: 在适宜条件下, 噬菌体一个裂解周期可产生 200 个子代, 噬菌体将以 200^n 的速度进行增殖, 利用噬菌体进行治疗时只需少量即可^[20-22]; (3) 噬菌体具有自我复制的局限性: 只要环境中存在寄主细菌时它们便通过感染寄主细胞启动自我复制模式, 而无寄主细菌存在时则快速降解^[18]; (4) 噬菌体是生物圈中的自然组成成分: 噬菌体可以很容易地从任何生存细菌的地方被分离出来, 包括土壤、水、植物、动物和人体^[23]; (5) 噬菌体对真核细胞无毒。因此, 当法律规定不允许采用化学防控时就可以采用这种方法, 例如果蔬收获前处理^[24]和果蔬产品采摘后的病害防控^[25-26]; (6) 不受细菌多重耐药性的影响, 可有效地治疗耐药性细菌引起的疾病和病害^[11]; (7) 细菌很难对噬菌体产生抗性: Carlton^[27]指出细菌对抗生素产生的抗性突变率为 10^{-6} , 而对噬菌体的抗性突变率为 10^{-7} , 抗生素和噬菌体联合用药的突变率为 10^{-13} , 且噬菌体会产生适当的变异以适应宿主菌的变异; (8) 研制开发的周期短, 成本低: 可以在 4°C 下保存数月, 效价也无显著降

低^[24]。另外，由于噬菌体活性不受大部分农药影响，噬菌体可以与多种农药在罐中混合使用，不会损失效价^[28-29]，因此采用标准的农机具即可施用。

2 青枯雷尔氏菌噬菌体的获得与分类

青枯雷尔氏菌噬菌体一般从青枯病发病植株根际土壤中筛选获得。采用通过 30 目筛 (0.6 mm) 的新鲜土壤样品，加入琼脂营养 (NA) 液体培养基活化土壤细菌和病毒，然后离心，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后即可得到土壤病毒悬浮液。取土壤病毒悬浮液与对数生长期的青枯雷尔氏菌共培养、离心、取上清液再过 0.22 μm 微孔滤膜后即可得到青枯雷尔氏菌噬菌体液。取青枯雷尔氏菌噬菌体液与对数生长期的青枯雷尔氏菌液进行双层平板培养，即可得到感染青枯雷尔氏菌的噬菌斑。挑取噬菌斑，溶于 SM 缓冲液中释放噬菌体，然后再用同样的方法循环感染青枯雷尔氏菌 4~5 次，即分离得到纯化的噬菌体。

噬菌体根据核酸类型可分为四类：ssDNA 类 (单链 DNA 类)、dsDNA 类 (双链 DNA 类)、ssRNA 类 (单链 RNA 类) 和 dsRNA 类 (双链 RNA 类)。据不完全统计，依据核酸类型，已知的青枯雷尔氏菌噬菌体存在双链 DNA 类型和单链 DNA 类型；这些双链 DNA 类型的青枯雷尔氏菌噬菌体依据形态多数归属为有尾噬菌体目的肌尾噬菌体科 (Myoviridae, T4、P1、P2 等噬菌体属)、短尾噬菌体科 (Podoviridae, T7、N4 等噬菌体属) 和长尾噬菌体科 (Siphoviridae, λ、T1、T5 等噬菌体属)；而单链 DNA 类型的青枯雷尔氏菌噬菌体以丝状噬菌体科 (Inovirus 丝状噬菌体属) 最为常见^[30]。表 1 列举了近年来分离得到的青枯雷尔氏菌噬菌体的主要类型。我们以烟草青枯雷尔氏菌为寄主分离得到 6 株噬菌体，经透射电镜观测都属于有尾噬菌体目，短尾噬菌体科 (未发表资料)。

表 1 近年来报道的部分青枯雷尔氏菌噬菌体

Tab. 1 Several phages infecting *Ralstonia solanacearum* reported in recent years

噬菌体名称 Phage name	分类 Classification	类型 Type	参考文献 References
ε RS - 1	肌尾噬菌体科 Myoviridae	P2	[31]
ΦRS603	丝状噬菌体 Inovirus	ssDNA	[32]
ΦRS138	长尾噬菌体科 Siphoviridae	λ 噬菌体 λPhage	[33]
ΦRS611	丝状噬菌体 Inovirus	Ff, ssDNA	[34]
ΦRSA1	肌尾噬菌体科 Myoviridae	P2, dsDNA	[35]
ΦRSB1	短尾噬菌体科 Podoviridae	T7	[36]
J2	短尾噬菌体科 Podoviridae	dsDNA	[37]
ΦRSF1	肌尾噬菌体科 Myoviridae	巨型噬菌体 Jumbo phage	[38]
ΦRSL2	肌尾噬菌体科 Myoviridae	巨型噬菌体 Jumbo phage	[38]
ΦRSL1	肌尾噬菌体科 Myoviridae	巨型噬菌体 Jumbo phage	[39]
ΦRSM1	丝状噬菌体 Inovirus	ssDNA	[40]
ΦRSS1	丝状噬菌体 Inovirus	ssDNA	[40]
ΦRSM3	丝状噬菌体 Inovirus	N	[41]
ΦHMPM - 12	N	N	[42]
ΦRSX	N	N	[35, 43]
M_ DS1	N	N	[44]
S6 - S1	N	N	[44]

注：N 代表未知。

Note: N means unknown.

3 青枯雷尔氏菌噬菌体的应用

按照生活周期,噬菌体可分为烈性噬菌体和温和噬菌体两大类。侵入宿主细胞后,引起宿主细菌裂解的噬菌体称作烈性噬菌体;反之,在侵入宿主细胞后,不引起细菌裂解,而将自身基因组与宿主菌基因组整合,并随细菌分裂传至子代细菌基因组的噬菌体称作温和性噬菌体。噬菌体治疗中应用的一般为烈性噬菌体,烈性噬菌体是细菌的天然“杀手”,也称毒性噬菌体,在宿主菌内可快速增殖并使之裂解。因此,筛选有针对性的毒性噬菌体是防控植物细菌性病害噬菌体疗法的主要目标^[8]。1990年日本烟草株式会社的Tanaka等^[45]报道了利用无毒的*Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* M4S菌株和感染该菌株的噬菌体对烟草青枯病的防治效果,他们发现没用M4S和噬菌体的青枯病发病率95.8%,只用M4S的发病率39.5%(交叉保护作用),而同时施用M4S和噬菌体的发病率只有14.5%,表现出较好的防治效果。

Fujiwara等^[46]采用三株烈性噬菌体 Φ RSL1、 Φ RSA1和 Φ RSB1处理青枯雷尔氏菌。他们发现用 Φ RSA1和 Φ RSB1单独或与其它噬菌体组合处理,都能快速降低宿主菌细胞的密度;在分批培养中单独用 Φ RSL1处理,青枯雷尔氏菌的细胞密度只有对照的1/3;用 Φ RSL1预处理番茄幼苗,可明显抑制根部细菌细胞的生长和运动。所有用 Φ RSL1处理过的番茄苗在试验期间都没有出现萎蔫症,而未用 Φ RSL1处理的番茄苗在18d时出现萎蔫症状。即使在37℃~50℃的高温下, Φ RSL1在土壤中仍能保持稳定,而且还能从处理过的植物根部和感染4个月的土壤中回收到有活性的 Φ RSL1颗粒。基于这些观察,Fujiwara等建议把 Φ RSL1用于生物防治,虽然只能杀死部分细菌细胞,但防治番茄青枯病的作用是有有效的^[8,46]。同样,Bhunchoth等^[37-38]采用盆栽和田间试验也发现短尾噬菌体J2和肌尾噬菌体 Φ RSF1能够有效地减少土壤中青枯菌的数量,从而起到防治番茄青枯病的作用。

高苗等^[31]从烟田土壤中分离得到一株裂解性的青枯病菌噬菌体 ϵ RS-1,属于肌尾噬菌体科,他们发现该噬菌体具有潜伏期较短,裂解能力较强和裂解活性持续时间长的特点,该噬菌体能在不同温度、不同酸碱性的环境内有较强的适应能力,具有开发为抗青枯雷尔氏菌菌剂的潜力。

4 噬菌体应用研究中存在的问题和展望

虽然噬菌体在防治烟草等茄科植物青枯病病害上具有一定的作用,但是在某些方面噬菌体应用还存在局限性:一是噬菌体宿主特异性强,治疗谱窄,自然分离的噬菌体都具有高度的专一性,往往只能感染一种细菌分离株,对同一种细菌的其它分离株的裂解效果很弱或无裂解作用^[47];二是噬菌体在田间应用还受到气候和田间环境因子的影响,例如土壤温度、干湿度、其它微生物以及pH值等因素的影响^[48];三是植物病原细菌生理小种众多,易变异,如青枯细菌种内具有复杂的遗传多样性,只要细菌受体在噬菌体-细菌结合位点发生一个单一变化,就能使细菌对噬菌体产生抵抗力,从而使噬菌体失去疗效^[49];四是噬菌体制剂的活性会受到消毒灭菌的影响^[50];五是噬菌体作为异源物质,具有很强的免疫原性,会刺激机体产生免疫反应,影响噬菌体的杀菌能力^[47];六是噬菌体疗法的最佳时间和剂量难以掌握等,这些局限性影响了噬菌体疗法的进一步应用^[51]。针对这些局限性,研究者尝试筛选具有较宽宿主谱的噬菌体,同时将多种噬菌体混合制成的“鸡尾酒”可以有效地预防寄主病原细菌产生抗噬菌体的突变^[52-53]。此外,噬菌体产生的裂解酶比噬菌体本身的寄主谱广,研制生产噬菌体裂解酶制剂应用于细菌病害或疾病的防治是噬菌体疗法的另一个重要的方向。需要指出,尽管噬菌体疗法具有很好的应用前景,但由于噬菌体产品是生物产品,目前国内还没有颁布具体的法规条例指导它的应用,噬菌体疗法在我国广泛应用不仅需要在产品技术研发上取得创新,在政策法规制定上还有很长一段路需要走。

参考文献:

[1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1991,

- 29 (1): 65-87.
- [2] Lucas G B. Diseases of tobacco [M]. Raleigh, North, Carol, USA: Biological Consulting Associates, 1975.
- [3] 霍沁建, 张 深, 王若焱. 烟草青枯病研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23 (8): 364-368.
- [4] 郭坚华, 孙平华, 吴云波, 等. 植物细菌性青枯病的生物防治机制和途径 [J]. 中国生物防治学报, 1997, 13 (1): 42-46.
- [5] 张竹青, 罗 宽, 高必达, 等. 七株抗青枯病菌生防菌的初步鉴定 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2002, 28 (6): 512-513.
- [6] 卢洪兴, 曾 军, 邱志丹, 等. 烟草青枯病发生与药剂防治研究 [J]. 福建农业学报, 1996, 11 (3): 41-45.
- [7] 纪成灿, 方树民, 顾 钢, 等. 烟草品种抗青枯病鉴定中的相关因素分析 [J]. 中国烟草科学, 2000, 21 (2): 1-4.
- [8] 蔡刘体, 汪汉成, 袁赛飞, 等. 青枯菌特异性噬菌体的研究进展与应用 [J]. 生物技术通讯, 2012, 23 (6): 887-890.
- [9] D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques [J]. Comptes Rendus de L 'Academie des Sciences de Paris, 1917, 165: 373-375.
- [10] Twort F W. An investigation on the nature of ultra - microscopic viruses [J]. The Lancet, 1915, 186 (4814): 1241-1243.
- [11] 王 盛, 童贻刚. 噬菌体治疗研究进展 [J]. 微生物学通报, 2009 36 (7): 1019-1024.
- [12] Bruynoghe R, Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage [J]. Comptes rendus hebdomadaires de Seances de la Societe de Biologie, 1921, 85: 1120-1121.
- [13] Okabe N, Goto M. Bacteriophages of plant pathogens [J]. Annual Review of Phytopathology, 1963, 1 (1): 397-418.
- [14] Goto M. Fundamentals of bacterial plant pathology [M]. New York: Academic Press, 1992.
- [15] Elizabeth K, Alexander S. Bacteriophages: Biology and Applications [M]. Boca Raton, Florida: Taylor and Francis Group Press, 2005.
- [16] 赵 勇. 噬菌体治疗研究进展 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2002, 18 (4): 14-16.
- [17] Slopek S, Weber - Dabrowska B, Dabrowski M, et al. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986 [J]. Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis, 1987, 35 (5): 569-583.
- [18] Kutter E. Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics [J]. <http://www.evergreen.edu/phage/phagetherapy/phagetherapy.html>, 1997.
- [19] Solodovnikov L, Pavlova L I, Emel' ianov P I, et al. The prophylactic use of dry polyvalent dysentery bacteriophage with pectin in preschool children's institutions. I. Results of a strictly controlled epidemiologic trial (Yaroslavl, 1968) [J]. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii, 1970, 47 (5): 131-137.
- [20] 陈晓春, 王继文, 曹永长, 等. 噬菌体在疾病治疗方面的应用及研究 [J]. 动物医学进展, 2005, 26 (1): 32-35.
- [21] 成伏波, 郑文旭, 李菁华, 等. 噬菌体疗法对烧伤合并铜绿假单胞菌感染小鼠的治疗作用 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9 (1): 18-21.
- [22] 张立丽, 李 宁, 赵秀英. 噬菌体治疗研究进展 [J]. 北京医学, 2011, 33 (3): 232-235.
- [23] Osawa S, Furuse K, Watanabe I. Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41 (1): 164-168.
- [24] Greer G G. Bacteriophage control of foodborne bacteria [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68 (5): 1102-1111.
- [25] Leverentz B, Conway W S, Alavidze Z, et al. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh - cut fruit: A model study [J]. Journal of Food Protection, 2001, 64 (8): 1116-1121.
- [26] Leverentz B, Conway W S, Camp M J, et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh - cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69 (8): 4519-4526.
- [27] Carlton R M. Phage therapy: past history and future prospects [J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1999, 47 (5): 267-274.
- [28] Zaccardelli M, Saccardi A, Gambin E, et al. *Xanthomonas campestris* pv. pruni bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control [J]. Phytopathologia Mediterranea, 1992, 31 (3) 133-140.
- [29] Balogh B, Jones J B, Momol M T, et al. Persistence of bacteriophages as biocontrol agents in the tomato canopy [J]. Acta Horticulturae, 2005, 695 (695): 299-302.
- [30] 冯 烨, 刘 军, 孙 洋, 等. 噬菌体最新分类与命名 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33 (12): 1954-1958.
- [31] 高 苗, 杨金广, 刘 旭, 等. 一株裂解性青枯雷尔氏菌噬菌体的分离及生物学特性分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (7): 1330-1338.
- [32] Van T T B, Yoshida S, Miki K, et al. Genomic characterization of ϕ RS603, a filamentous bacteriophage that is infectious to the phytopatho-

- gen *Ralstonia solanacearum* [J]. *Microbiology and Immunology*, 2014, 58 (12): 697–700.
- [33] Thi B V T, Khanh N H P, Namikawa R, et al. Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage ϕ RS138 of the family *Siphoviridae* [J]. *Archives of Virology*, 2016, 161 (2): 483–486.
- [34] Van T T B, Yoshida S, Miki K, et al. Complete genome sequence of a filamentous bacteriophage, RS611, that infects the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160 (4): 1143.
- [35] Fujiwara A, Kawasaki T, Usami S, et al. Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage ϕ RSA1 and its related prophage (ϕ RSX) in strain GM11000 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (1): 143–156.
- [36] Kawasaki T, Shimizu M, Satsuma H, et al. Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage ϕ RSB1, a T7-like wide-host-range phage [J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (1): 422–427.
- [37] Bhunchoth A, Phironrit N, Leksomboon C, et al. Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118 (4): 1023–1033.
- [38] Bhunchoth A, Blanc-Mathieu R, Mihara T, et al. Two asian jumbo phages, ϕ RSL2 and ϕ RSF1, infect *Ralstonia solanacearum* and show common features of ϕ KZ-related phages [J]. *Virology*, 2016, 494: 56–66.
- [39] Yamada T, Satoh S, Ishikawa H, et al. A jumbo phage infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* defines a new lineage of the Myoviridae family [J]. *Virology*, 2010, 398 (1): 135–147.
- [40] Kawasaki T, Nagata S, Fujiwara A, et al. Genomic characterization of the filamentous integrative bacteriophages ϕ RSS1 and ϕ RSM1, which infect *Ralstonia solanacearum* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (16): 5792–5802.
- [41] Askora A, Kawasaki T, Usami S, et al. Host recognition and integration of filamentous phage ϕ RSM in the phytopathogen, *Ralstonia solanacearum* [J]. *Virology*, 2009, 384 (1): 69–76.
- [42] Makari Hanumanthappa K, Palaniswamy M, Angayarkanni J. Isolation of lytic bacteriophage against *Ralstonia solanacearum* causing wilting symptoms in ginger (*Zingiber officinale*) and potato (*Solanum tuberosum*) plants [J]. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2013, 2 (11): 78–84.
- [43] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. *Nature*, 2002, 415 (6871): 497–502.
- [44] Kutin R K, Alvarez A, Jenkins D M. Detection of *Ralstonia solanacearum* in natural substrates using phage amplification integrated with real-time PCR assay [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76 (3): 241–246.
- [45] Tanaka H, Negishi H, Maeda H. Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage [J]. *Japanese Journal of Phytopathology*, 1990, 56 (2): 243–246.
- [46] Fujiwara A, Fujisawa M, Hamasaki R, et al. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (12): 4155–4162.
- [47] 朱育玮, 李玉保, 王守荣, 等. 噬菌体及其治疗细菌感染研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42 (3): 769–773.
- [48] Gill J, Abedon S T. Bacteriophage ecology and plants [J]. *The American Phytopathological Society Features*, 2003.
- [49] Fegan M, Prior P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex” [M]. In Allen C, Prior P, Hayward A C, edc. *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press, 2005.
- [50] 赵晨, 王轶. 噬菌体治疗——旧概念, 新阶段 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38 (11): 1698–1704.
- [51] Payne R J H, Jansen V A A. Phage therapy: The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals [J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 68 (3): 225–230.
- [52] 高成秀, 严亚贤. 噬菌体治疗制剂的研究进展 [J]. *中国兽医科学*, 2007, 37 (7): 641–644.
- [53] Carvalho C M, Gannon B W, Halfhide D E, et al. The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens [J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 232.