

wbnH2 基因对北京欧文氏菌生物学特性及致病力的影响

常晓宁^{1,2}, 刘宇¹, 谷彤彤¹, 郭金英², 宋忠娟¹, 荣成博^{*1}

1 北京市农林科学院植物保护研究所 北京市食用菌工程技术研究中心, 北京 100097

2 河北工程大学园林与生态工程学院, 河北 邯郸 056038

常晓宁, 刘宇, 谷彤彤, 郭金英, 宋忠娟, 荣成博. *wbnH2* 基因对北京欧文氏菌生物学特性及致病力的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4713-4726

Chang Xiaoning, Liu Yu, Gu Tongtong, Guo Jinying, Song Zhongjuan, Rong Chengbo. Effects of *wbnH2* on biological characteristics and pathogenicity of *Erwinia beijingensis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4713-4726

摘要:【背景】北京欧文氏菌(*Erwinia beijingensis*)引起的刺芹侧耳细菌性软腐病(bacterial soft rot)给企业带来了严重的经济损失。*wbnH2* 糖基转移酶基因在北京欧文氏菌中的生物学功能尚不明确。【目的】构建 *wbnH2* 基因的缺失株 Δ -*wbnH2* 和回补株 C-*wbnH2*, 探究 *wbnH2* 基因对北京欧文氏菌致病性的影响。【方法】采用同源重组方法构建北京欧文氏菌 LMG 27579^T *wbnH2* 基因缺失突变株 Δ -*wbnH2*, 并对基因缺失菌株的致病性、生长速度、运动能力、生物膜形成能力、黏附能力等生物学特性与野生型菌株进行比较分析; 采用广宿主质粒 pBBR1MCS2 构建回补株 C-*wbnH2*, 排除了极性效应引起的突变株表型变化。【结果】与野生型菌株相比, 基因缺失株 Δ -*wbnH2* 的生长速度无明显差别。但是 *wbnH2* 基因的缺失导致多糖分泌、生物膜形成能力、黏附能力、致病能力明显下降。【结论】*wbnH2* 基因影响北京欧文氏菌多糖分泌、生物膜的形成能力、黏附能力及致病力, 表明该基因在北京欧文氏菌致病过程中起重要作用, 本研究为软腐病的防控提供了理论基础。

关键词: 刺芹侧耳; 同源重组; 软腐病; 欧文氏菌

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(6202008); 北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20200105); 现代农业产业技术体系(CARS-20); 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(21422012325)

Supported by: General Project of Beijing Natural Science Foundation (6202008); Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science (KJCX20200105); China Agriculture Research System (CARS-20); Handan Science and Technology Research and Development Program (21422012325)

*Corresponding author: E-mail: woshiboer@163.com

Received: 2022-04-12; Accepted: 2022-05-12; Published online: 2022-06-17

Effects of *wbnH2* on biological characteristics and pathogenicity of *Erwinia beijingsensis*

CHANG Xiaoning^{1,2}, LIU Yu¹, GU Tongtong¹, GUO Jinying², SONG Zhongjuan¹, RONG Chengbo^{*1}

1 Beijing Engineering Research Center for Edible Mushroom, Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

2 School of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei, China

Abstract: [Background] Bacterial soft rot caused by *Erwinia beijingsensis* results in serious economic losses to enterprises. The biological function of the glycosyltransferase gene *wbnH2* in *E. beijingsensis* remains unclear. [Objective] To explore the effect of *wbnH2* gene on the pathogenicity of *E. beijingsensis*. [Methods] Homologous recombination was employed to construct the *E. beijingsensis* LMG 27579^T *wbnH2*-deleted mutant Δ -*wbnH2*. The biological characteristics such as pathogenicity, growth rate, motility, biofilm formation, and adhesion of Δ -*wbnH2* were studied. Further, we used the broad-host-range plasmid pBBR1MCS2 to construct the complementation strain C-*wbnH2* for excluding the polarity effect-caused phenotypic change of the mutant. [Results] Compared with that of the wild type, the growth rate of Δ -*wbnH2* had no significant change. However, the deletion of *wbnH2* resulted in significant decreases in polysaccharide secretion, biofilm formation, adhesion and pathogenicity. [Conclusion] The glycosyltransferase gene *wbnH2* affects the polysaccharide secretion, biofilm formation, adhesion, and pathogenicity of *E. beijingsensis*, playing a role in the pathogenic process. This study provides a theoretical basis for the prevention and control of bacterial soft rot.

Keywords: *Pleurotus eryngii*; homologous recombination; bacterial soft rot; *Erwinia*

欧文氏菌属(*Erwinia*)细菌是一种革兰氏阴性菌,属于植物病原菌、附生菌并有机会成为人类病原菌^[1],被列为经济上最重要的植物病原体之一^[2]。欧文氏菌属内一些菌株是植物病原细菌,如嗜气管埃希菌(*E. tracheiphila*)引起南瓜青枯病^[3];胡萝卜软腐菌(*E. carotovorum* pv. *carotovora*)引起兰花软腐病^[4];卡氏埃文氏菌(*E. carotovora* subsp. *carotovora*)引起马铃薯软腐病^[5]。其中,嗜淀粉欧文氏菌(*E. amylovora*, EA)在苹果、梨和其他蔷薇科植物中引起的火疫病给农业造成了严重的经济损失^[6-8]。近年来在国内外多地均暴发了刺芹侧耳(商品名杏鲍菇)细菌性软腐病(bacterial soft-rot disease)^[9-11],主要病原菌有泛菌(*Pantoea* sp.)^[12-13]、芽孢杆菌属

(*Bacillus*)细菌^[14]、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[10]及欧文氏菌属(*Erwinia*)细菌^[15]。感染该病害后,子实体上出现水渍状病斑,并逐渐扩大,子实体出现变形^[14-17],严重时可导致刺芹侧耳产量减少15%–20%^[18]。北京地区的刺芹侧耳细菌性软腐病病原菌经鉴定为北京欧文氏菌(*E. beijingsensis*)^[17]。阐明病原菌的致病机理可为软腐病的防控及抗病育种提供理论基础。北京欧文氏菌引起的刺芹侧耳软腐病是近年来的新兴病害,该病原菌的致病机理尚未可知。

胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是一些特殊生物体在生长代谢过程中分泌到细胞外的代谢产物,是一种水溶性多糖,与适应、生存等功能有关^[19]。在鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter*

baumannii)^[20]、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)^[21]和水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)^[22]等病原菌中均发现胞外多糖是重要的毒力因子。病原菌分泌的胞外多糖有助于病原菌对宿主的黏附并影响病原菌生物膜的形成能力^[23]。糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)是生物体多糖合成中的重要环节,GT催化一个糖基供体上的糖残基转移到一个受体上,糖基转移酶特性决定了多糖的结构^[24]。研究表明,糖基转移酶在多种病原菌中均与致病性相关。如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中存在4种糖基转移酶对于肺炎链球菌生物膜的形成等必不可少^[25];糖基转移酶 SMUS833 是变形链球菌(*Streptococcus mutans*)生物膜发育及毒力所必需的^[26];FvCpsA 糖基转移酶对轮状镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)的生长、生物合成和毒力至关重要^[27]。北京欧文氏菌存在一个糖基转移酶基因 *wbnH2*, 大小为 1 029 bp, 属于糖基转移酶 GTB 型超家族(glycosyl transferase_GTB-type superfamily), 病原菌感染宿主过程中表达量显著上调($\log_2(\text{FC})=2.58$, Q value<0.01), 暗示该基因与北京欧文氏菌的致病力具有重要关系。本研究以 *wbnH2* 基因为研究对象, 通过同源重组的方法构建基因缺失株, 与野生型菌株进行比较, 探究 *wbnH2* 基因在北京欧文氏菌中的生物学作用, 旨在明确北京欧文氏菌的关键致病基因, 为刺芹侧耳细菌性软腐病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

北京欧文氏菌(*E. beijingensis*) LMG 27579^T、自杀质粒 pRE112、大肠杆菌(*E. coli*) WM3064、大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、广宿主载体质粒 pBBR1MCS-2 均为本实验室所保存。

1.2 主要试剂和仪器

卡那霉素、氯霉素, 上海碧云天生物技术有限公司; 二氨基庚二酸, 北京沃凯生物科技有限公司; 蔗糖, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 琼脂糖, 赛默飞世尔科技公司; 琼脂粉, 北京跨世远洋科技有限责任公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 无缝克隆试剂盒, 中美泰和生物技术(北京)有限公司; 乙醇, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 结晶紫, 北京酷来搏科技有限公司。

食用菌智能出菇箱, 北京智态康兴生物科技有限公司; 全温度振荡培养箱, 太仓华大实验仪器科技有限公司; 移液枪、微量离心机, Eppendorf 公司; 生物安全柜、生化培养箱、立式超低温冰箱, Thermo Fisher Scientific 公司; 多功能酶标仪, 珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司; 照相机, 索尼(中国)有限公司; 多功能成像系统、PCR 热循环仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 培养基

LB MILLER 肉汤培养基, BD 公司; TSB 胰蛋白胨大豆肉汤培养基, Oxoid 公司。

LB 液体培养基: 2 g LB 粉溶于 100 mL 去离子水中; LB 固体培养基: 2 g LB 粉, 2 g 琼脂粉溶于 100 mL 去离子水中; TSB 培养基: 3 g TSB 粉溶于 100 mL 去离子水中; 杏鲍菇汁培养基: 新鲜杏鲍菇去掉头部, 切块, 每 200 g 菇加入 300 mL 去离子水, 榨汁, 4 层纱布过滤, 滤纸过滤, 分装灭菌, 取出离心, 弃沉淀, 上清液即杏鲍菇汁原液; 30%杏鲍菇汁液体培养基: 30 mL 杏鲍菇汁原液, 70 mL 去离子水; 30%杏鲍菇汁固体培养基: 2 g 琼脂粉, 30 mL 杏鲍菇汁原液, 70 mL 去离子水; 0.4%琼脂糖 LB 培养基: 2 g LB 粉, 0.4 g 琼脂糖溶于 100 mL

去离子水中；0.4%琼脂糖杏鲍菇汁培养基：0.4 g 琼脂糖，30 mL 杏鲍菇汁原液，70 mL 去离子水；所有培养基配好后分装， 1×10^5 Pa 灭菌 30 min，备用。

1.4 引物的设计与合成

本实验涉及引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，样品测序由北京诺赛基因公司提供，所涉及引物信息如表 1 所示。

1.5 *wbnH2* 基因缺失株的构建

1.5.1 *wbnH2* 基因上下游同源臂片段扩增

以提取的北京欧文氏菌基因组 DNA 为模板，利用 A1 引物对扩增目的基因 *wbnH2* 的上游同源臂片段，A2 引物对扩增下游同源臂片段。PCR 反应体系(50 μ L)：5 \times GC Buffer 10 μ L，dNTPs Mix (2.5 mmol/L) 4 μ L，正向引物(10 mmol/L) 2.5 μ L，反向引物(10 mmol/L)

2.5 μ L，野生型菌株 DNA (60 ng/ μ L) 1 μ L，DMSO (10 U/ μ L) 1.5 μ L，Phusion 酶(2 U/ μ L) 0.5 μ L，ddH₂O 28 μ L。PCR 反应条件：98 $^{\circ}$ C 5 min；98 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 1 min；35 个循环，72 $^{\circ}$ C 10 min；12 $^{\circ}$ C 保存。10%琼脂糖凝胶电泳验证，使用琼脂糖凝胶回收试剂盒将所获得的 *wbnH2* 基因的上下游同源臂片段纯化回收，将回收产物置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.5.2 pRE112-*wbnH2*-WM3064 自杀质粒的构建

使用 *Kpn* I 和 *Sac* I 对 pRE112 自杀质粒双酶切。将酶切后的片段与 *wbnH2* 基因的上、下游同源臂片段采用无缝克隆试剂盒进行连接(10 μ L)：pRE112 (20 ng/ μ L) 0.5 μ L，*wbnH2* 上游同源臂 (60 ng/ μ L) 3 μ L，*wbnH2* 下游同源臂(60 ng/ μ L) 1.5 μ L，Mix 酶 5 μ L。将连接产物于 50 $^{\circ}$ C 连接

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
A1/F	GTGTAAGTGAAGTGCATGAATTCCCGGGAGAGCTCATGAAACCAACAAAAATAAAGGTA ACTTTAACAAA	1 158
A1/R	TCCAGAATAACATCCGTGTTATCACTAATTCAGTGCCTGAATATCAGCTCTCTCCCTCAAC CATGTTGTG	
A2/F	CACAACATGGTTGAGGGAGAGAGCTGATATTCAGGCACTGAATTAGTGATAACACGGAT GTTATTCTGGA	1 121
A2/R	GATAGGGCCCGATCCCAAGCTTCTTCTAGAGGTACCACATTAAAGAACTGTGGTAATTCA TCAAGTGATGTT	
B1/F	ATGAAACAAATTATTGCGGCACAAA	1 029
B1/R	CTACCGAAGAAATATTTCTGATAC	
B2/F	ACGCAAAATATTTAATGTAAGGC	3 409
B2/R	GCCGAATTATAGCTTCTACT	
C1/F	CTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCTATCCTATTCATGCTCTGGGTATTAT ATTGAGTTGTT	279
C1/R	TGTCTCAGCGCAGTGTAATATCTTCATTTTCATCATTAAATTATCATCGCTATGTAATAATTTT TTTTAATC	
C2/F	GATTAATAAAATTTTACATAGCGATGATAATTAATGATGAAAATGAAGATATTACACTG CGCTGAGACA	1 029
C2/R	GGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGCTACCGAAGAAATATTTCTGATAC AATTATTCGT	

5 min。将 pRE112-*wbnH2* 自杀质粒载体转化至营养缺陷型大肠杆菌 WM3064 中,将转化后的感受态细胞涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 二氨基庚二酸(2,6-diaminopimelic acid, DAP)的抗性平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,PCR 验证筛选阳性克隆子,并进一步通过测序验证。

1.5.3 细菌接合转移与敲除验证

将北京欧文氏菌野生型菌株(以下简称 WT)和含有 pRE112-*wbnH2* 质粒的大肠杆菌 WM3064 分别于 LB 培养液和含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAP 的 LB 培养液中培养过夜。次日分别活化 5 h,取 1 mL WT 加入 500 μL pRE112-*wbnH2*-WM3064,12 000 r/min 离心 1 min,加入 1 mL LB 培养液洗涤 2 次,离心后将混合的菌液置于 0.45 μm 滤膜上,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。将滤膜取出,用 1 mL LB 培养液冲洗,28 $^{\circ}\text{C}$ 复性 90 min,取 100 μL 涂布含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm 的 LB 平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。挑取上述平板上长出的单菌落扩大培养后,涂布 120、160、240 及 320 g/L 的蔗糖平板,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,长出的单菌落于 30%杏鲍菇汁平板上划线,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑选与野生型形态相异的菌株,置于液体 LB 培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜,并划线至 Cm 平板,选取 LB 平板上能生长且 Cm 平板不生长的菌株进行下一步验证。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,利用 B1/B2 引物 PCR 验证接合子,将验证正确的菌株命名为 Δ -*wbnH2*。

1.6 *wbnH2* 基因回补株的构建

设计引物,利用 C1 引物对扩增 *wbnH2* 基因启动子片段,利用 C2 引物对扩增 *wbnH2* 基因片段,PCR 反应体系(50 μL): Phusion 酶(2 U/ μL) 0.5 μL , GC Buffer 10 μL , dNTPs Mix (2.5 mmol/L) 4 μL , ddH₂O 28 μL , 模板 DNA (30 ng/ μL) 1 μL , 正、反向引物(10 mmol/L)各

2.5 μL , DMSO (10 U/ μL) 1.5 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环,; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 12 $^{\circ}\text{C}$ 保存,PCR 验证。利用 *Xho* I/*Eco*R I 对质粒 pBBR1MCS-2 进行双酶切。将启动子片段与 *wbnH2* 基因片段及 pBBR1MCS-2 质粒进行无缝连接,连接体系(10 μL): Mix 酶 5 μL , 启动子片段 31 ng/ μL 1 μL , *wbnH2* 基因片段 37 ng/ μL 1 μL , pBBR1MCS-2 质粒 44 ng/ μL 3 μL 。连接后转化至大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。PCR 验证并测序,筛选阳性克隆子,将验证正确的菌株与 Δ -*wbnH2* 进行接合转移,PCR 验证筛选阳性接合子,最终成功构建回补株,命名为 C-*wbnH2*。

1.7 生长曲线测定

前期试验中发现 30%杏鲍菇汁培养基与 LB 培养基相比能够促进北京欧文氏菌的多糖生成,因此分别在不同培养基中测定 2 株菌株的生长速度。具体操作为:挑取北京欧文氏菌野生型菌株 WT 和突变株 Δ -*wbnH2* 菌株的单菌落,分别接种到 LB 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜,按照 1:100 (体积比)接种于 10 mL LB 液体培养基中,活化 5 h,稀释 OD_{600} 为 1.0,分别转接至 100 mL 液体 LB 培养基及 30%杏鲍菇汁培养基中,自 6 h 起,每 2 h 取样一次,共取样 10 次,使用酶标仪测量 OD_{600} 值,统计数据,并绘制生长曲线,比较不同培养基中野生型菌株和突变株的生长速度差异。每组实验设置 3 个生物学重复。

1.8 致病力测定

为了验证 WT、 Δ -*wbnH2*、C-*wbnH2* 这 3 株菌株的致病力情况,分别从以下 2 个实验验证。

1.8.1 离体接种验证

分别挑取 WT、 Δ -*wbnH2*、C-*wbnH2* 单菌

落至 3 mL LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜, 按照 1:100 比例再次活化 5 h。稀释菌液浓度至 OD_{600} 为 1.0, 取 60 μ L 接种于事先打孔的杏鲍菇片上, 28 °C 静置培养 24 h, 以未接菌的杏鲍菇片为阴性对照。使用索尼相机拍照, 每组实验设置 5 个生物学重复。

1.8.2 子实体接种验证

挑取 WT、 Δ -*wbnH2*、*C-wbnH2* 单菌落, 分别接种到 LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜, 按照 1:100 比例接种于 100 mL TSB 培养基中, 活化 5 h, 用无菌水稀释 OD_{600} 为 1.0, 杏鲍菇子实体培养大小约 2 cm, 每个菌袋喷菌液 1 mL, 温度设置为 16 °C, 湿度为 80%, 在食用菌智能出菇箱培养, 72 h 后用索尼相机记录拍照, 同时用 ImageJ 软件测量单个子实体的病变面积, 每组实验设置 5 个生物学重复。

1.9 多糖含量测定

参照王静等^[28]的醇沉法并稍作改进测定菌株的多糖产生能力。菌株培养方式同 1.7。稀释菌液浓度至 OD_{600} 为 1.0, 将 WT 和 Δ -*wbnH2* 菌株分别接种于 100 mL 30% 杏鲍菇汁培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 21 h, 6 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 上清加入 4 倍体积的乙醇, 4 °C 静置过夜。取出 6 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用无菌水悬起, 6 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 即得粗多糖溶液。利用苯酚硫酸法测定多糖浓度, 苯酚:样品:硫酸的比例为 1:2:5, 混合均匀后静置 30 min, 使用酶标仪于 490 nm 处测量吸光度。参照 Wang 等^[29]的方法在 30% 杏鲍菇汁培养基平板上评估 2 菌株的多糖产生能力。具体操作为: 用无菌牙签蘸取菌液, 画“十字”至平板上, 28 °C 静置培养 24 h, 使用索尼相机拍照记录。每组实验设置 3 个生物学重复。

1.10 生物膜形成能力测定

参照 Zhang 等^[30]的方法并稍作改进对菌株的生物膜形成能力进行测定。菌株培养方式同 1.7。将菌株在 30% 杏鲍菇汁培养基中活化, 稀释 WT 和 Δ -*wbnH2* 菌液浓度至 OD_{600} 为 0.02, 分别取 200 μ L 菌液接种于 96 孔板中, 以未接菌的 30% 杏鲍菇汁液体培养基作为空白对照。28 °C 静置培养 2 d。吸出菌液, 用无菌 PBS 缓冲液冲洗。自然风干 30 min, 加入 200 μ L 结晶紫染色液, 染色 30 min。用无菌水冲洗残留的染色液, 直至清澈为止。将 96 孔板放置于 37 °C 培养箱中, 彻底烘干。加入 200 μ L 33% 冰醋酸溶液, 37 °C 放置 30 min, 使用酶标仪测量 570 nm 处的吸光度。每组实验设置 5 个生物学重复。

1.11 运动性测定

参照 Raterman 等^[31]的方法并稍作改进对菌株运动性进行测定。菌株培养方式同 1.7。稀释 WT、 Δ -*wbnH2* 和 *C-wbnH2* 菌液浓度至 OD_{600} 为 1.0, 分别取 3 μ L 菌液接种于 0.4% LB 琼脂糖平板和 0.4% 杏鲍菇汁琼脂糖平板, 28 °C 培养过夜。利用索尼相机拍照, 使用 ImageJ 软件测量运动圈的面积。每组实验设置 5 个生物学重复。

1.12 黏附能力测定

根据 Kutschera 等^[32]的方法并稍作改进对各菌株的黏附能力进行测定。菌株培养方式同 1.7。稀释 WT 和 Δ -*wbnH2* 菌液浓度至 OD_{600} 为 0.2, 取 10 μ L 菌液接种到先前消毒过的 2 cm 杏鲍菇片上。28 °C 静置培养 24 h。用 1 mL 无菌 0.85% NaCl 冲洗表面, 以除去未黏附细胞, 在 5 mL 无菌 0.85% NaCl 溶液中剧烈旋转 30 s 以释放黏附的细胞, 梯度稀释并在 LB 固体平板上测定细菌数量。每组实验设置 5 个生物学重复。

1.13 数据分析

所有试验均进行了 3 次, 使用 DPS V7.05

软件进行显著性分析,数据使用平均值 \pm 标准差表示。差异显著性分别用 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 表示。

2 结果与分析

2.1 *wbnH2* 基因缺失株和回补株的鉴定

采用同源重组的方法构建 *wbnH2* 的缺失突变株。如图 1A 所示,利用 C2 引物对对 Δ -*wbnH2*

进行 PCR 验证,以野生型菌株 WT 基因组 DNA 作为阳性对照,WT 扩增出 1 029 bp (*wbnH2* 基因大小)的片段,突变株 Δ -*wbnH2* 未扩增出条带。利用验证 B2 引物对再次进行验证,验证结果如图 1B 所示,WT 可扩增出 3 409 bp 大小的片段,突变株 Δ -*wbnH2* 扩增出 2 380 bp 大小的片段,表明 *wbnH2* 基因丢失,突变株 Δ -*wbnH2* 构建成功。

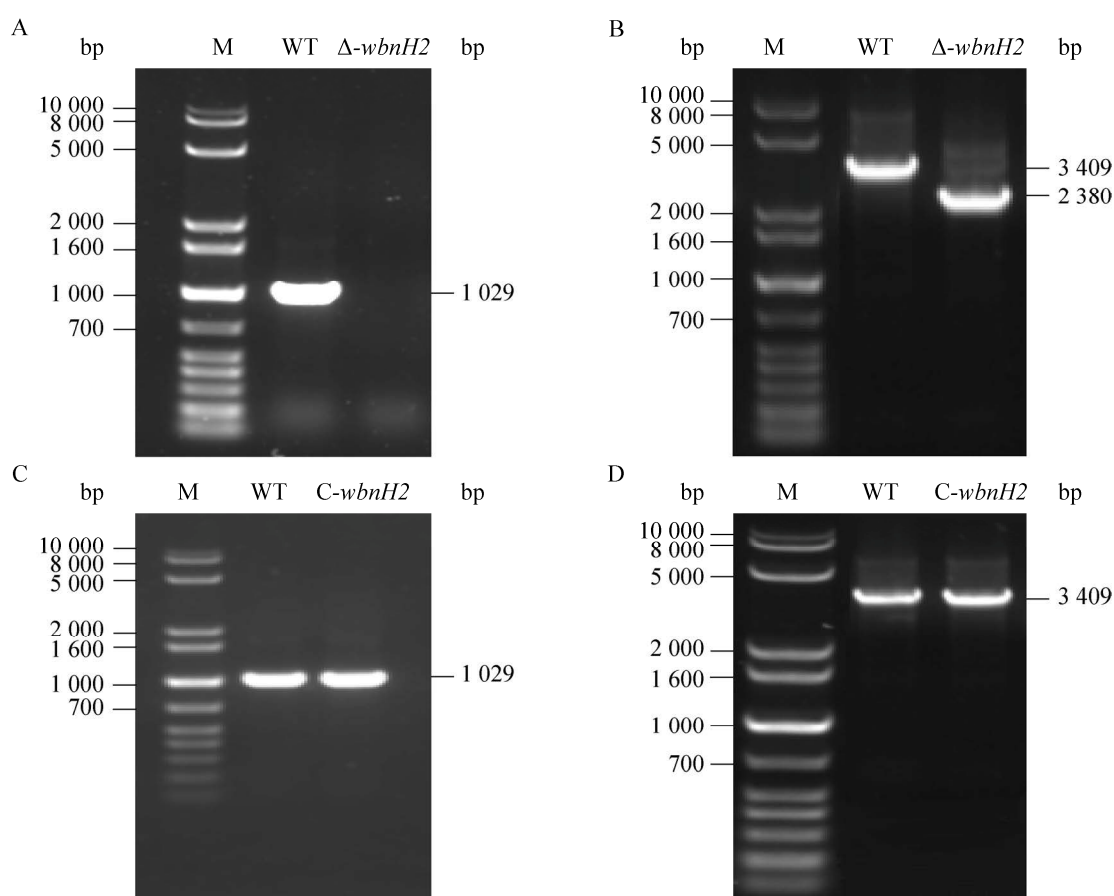


图 1 突变株及回补株构建结果 A: 内部引物验证突变株结果; B: 验证引物对突变株验证结果; C: 内部引物验证回补株结果; D: 验证引物对回补株验证结果。M: 1 kb plus DNA Ladder Marker; WT: 野生型菌株基因组 DNA; Δ -*wbnH2*: 突变株基因组 DNA; C-*wbnH2*: 回补株基因组 DNA

Figure 1 Construction results of mutant and complementary strains. A: Internal primers were used to verify the mutant results; B: Verify the verification results of primer pair mutant; C: Internal primers were used to verify the results of complementary strains; D: Verify the verification results of primer pairs. M: 1 kb plus DNA Ladder Marker; WT: Genomic DNA of wild-type strain; Δ -*wbnH2*: Genomic DNA of mutant; C-*wbnH2*: complement genomic DNA of the strain.

回补株验证结果如图 1C 所示, 利用 C2 引物对回补株 *C-wbnH2* 进行 PCR 验证, 野生型菌株 WT 扩增出 1 029 bp 产物, 回补株 *C-wbnH2* 扩增出相同条带。使用 B2 引物对回补株再次验证, 验证结果如图 1D 所示, 野生型扩增出 3 409 bp 产物, 回补株 *C-wbnH2* 扩增出相同条带, 表明回补株 *C-wbnH2* 构建成功。

2.2 生长曲线测定

为了分析 *wbnH2* 基因敲除后是否会对菌株的生长状况有影响, 分别在 LB 培养基和 30% 杏鲍菇汁培养基中比较北京欧文氏菌野生型菌株 WT 和 Δ -*wbnH2* 的生长情况。生长曲线测定结果如图 2 所示, 在不同培养基中, 2 株菌株生长能力无明显差异; 但在 30% 杏鲍菇汁培养基中 2 株菌株的生长能力均低于在 LB 培养基中的生长能力。该研究结果表明, *wbnH2* 基因敲除不影响北京欧文氏菌的生长能力。

2.3 致病力测定

为了验证 WT、 Δ -*wbnH2* 及 *C-wbnH2* 对杏鲍菇的致病能力, 对 3 株菌分别采用离体接种及活孢子实体接种验证菌株致病性, 结果如图 3 所示。图 3A 为离体接种图, 可见接种点位置处

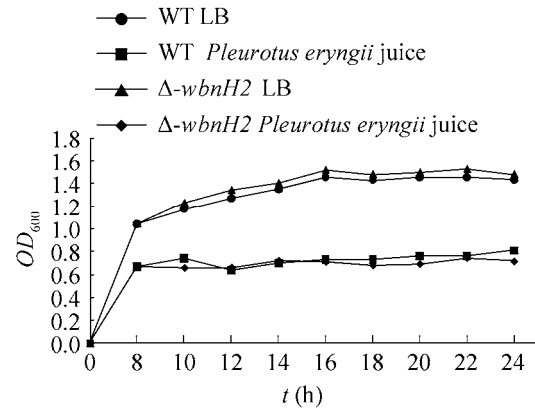


图 2 不同培养基中 WT 和 Δ -*wbnH2* 菌株生长曲线测定 WT LB: 野生型菌株在 LB 液体培养基中的生长曲线; WT 杏鲍菇汁: 野生型菌株在 30% 杏鲍菇汁液体培养基中的生长曲线; Δ -*wbnH2* LB: 突变株在 LB 液体培养基中的生长曲线; Δ -*wbnH2* 杏鲍菇汁: 突变株在 30% 杏鲍菇汁液体培养基中的生长曲线

Figure 2 Growth curves of WT and Δ -*wbnH2* strains in different media. WT LB: Growth curve of wild-type strain in LB liquid medium; WT *Pleurotus eryngii* juice: Growth curve of wild-type strain in 30% *Pleurotus eryngii* juice liquid medium; Δ -*wbnH2* LB: Growth curve of mutant in LB liquid medium; Δ -*wbnH2* *Pleurotus eryngii* juice: Growth curve of mutant in 30% *Pleurotus eryngii* juice liquid medium.

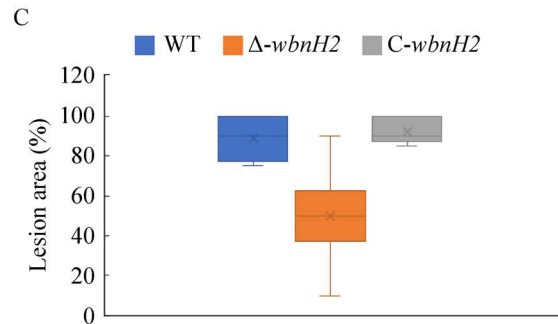
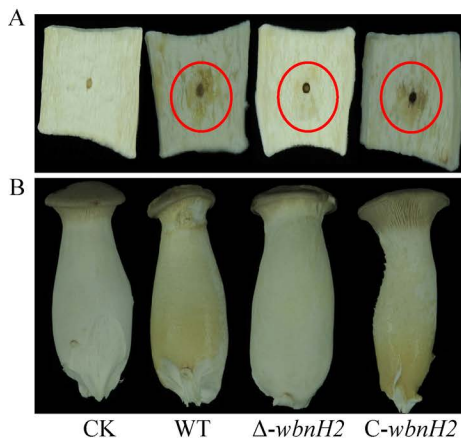


图 3 致病力测定结果 A: 离体病原菌接种图; B: 子实体病原菌接种图; C: 病变面积图

Figure 3 Pathogenicity test result. A: Inoculation diagram of isolated pathogenic bacteria; B: Inoculation diagram of pathogen in fruiting body; C: Lesion area map.

突变株发病较轻,与 WT 及回补株有明显差异。图 3B 为子实体接种图,从图 3 可见突变株 Δ -*wbnH2* 表面有轻微淡黄色病斑,无黏液分泌,致病力显著低于野生型菌株及回补株,且该基因回补后,致病能力恢复到野生型状态,说明基因突变未引起极性效应。图 3C 为各菌株病变面积,野生型菌株侵染刺芹侧耳后平均病变面积为 88.89%,突变株侵染刺芹侧耳后平均病变面积为 50.00%,与野生型具有极显著差异 ($P<0.001$),*wbnH2* 基因回补后,回补株侵染刺芹侧耳的病变面积平均值为 92.20%,恢复了致病能力。表明该基因对北京欧文氏菌的致病性

有重要作用。

2.4 突变株多糖含量测定

采用苯酚硫酸法测定北京欧文氏菌野生型菌株 WT 和突变株 Δ -*wbnH2* 的多糖含量。结果如图 4A 所示,WT 和 Δ -*wbnH2* 的多糖含量具有极显著差异 ($P<0.001$)。野生型菌株的多糖含量为 1.02 mg/mL,而突变株 Δ -*wbnH2* 的多糖含量为 0.19 mg/mL,野生型菌株的多糖含量是突变株的 5.36 倍。同时平板划线测定结果也可以看出突变株 Δ -*wbnH2* 的多糖含量减少(图 4B)。表明 *wbnH2* 基因对北京欧文氏菌的多糖形成具有促进作用,缺失该基因导致多糖含量下降。

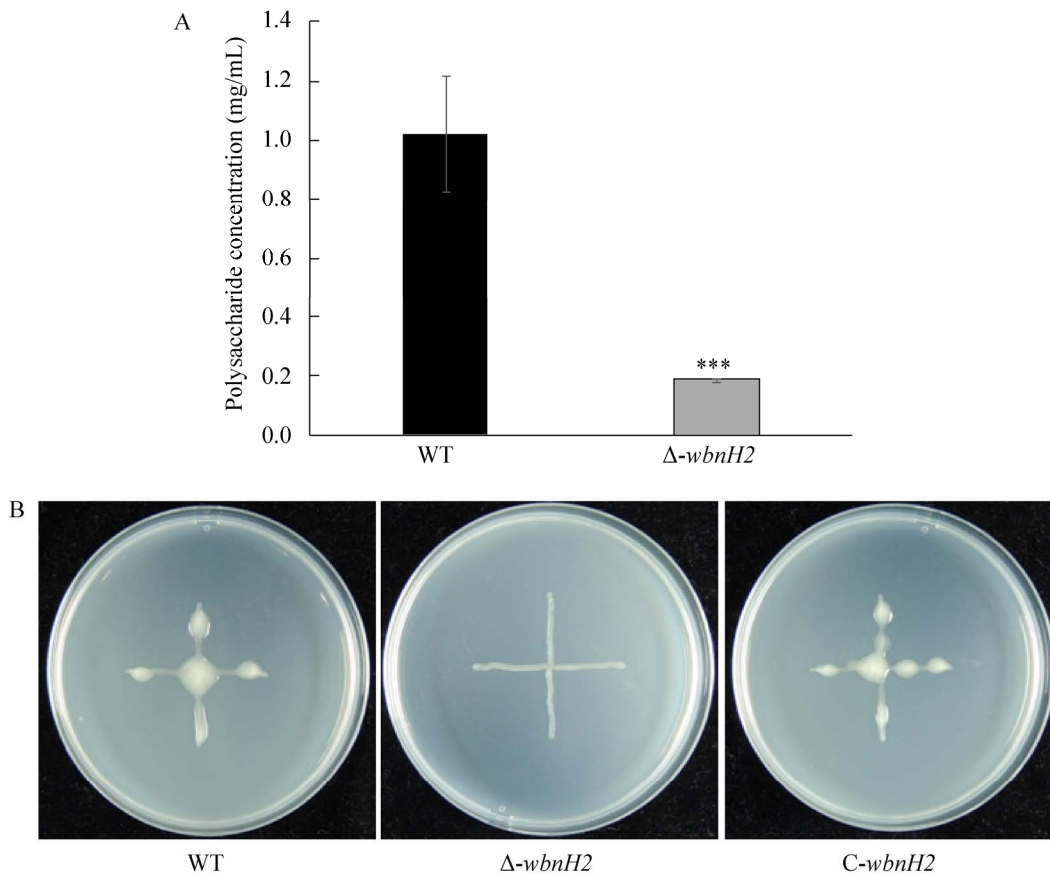


图 4 多糖含量测定结果 A: 苯酚硫酸法测定多糖含量结果; B: 平板划线法测定多糖含量。***: $P<0.001$

Figure 4 The results of the determination of polysaccharide content. A: The content of polysaccharide was determined by phenol sulfuric acid method; B: The content of polysaccharide was determined by plate scribing method. ***: $P<0.001$.

2.5 生物膜形成能力测定

采用结晶紫染色法检测 WT 和 $\Delta\text{-}wbnH2$ 的生物膜形成能力, 以未接菌的 30%杏鲍菇汁液体培养基为空白对照, 经结晶紫染色洗脱、冰醋酸溶解等步骤后, 测定 OD_{570} 值。结果如图 5 所示, 与 WT 菌株相比, $\Delta\text{-}wbnH2$ 的生物膜形成能力显著降低, 二者具有极显著性差异 ($P<0.001$)。表明 $wbnH2$ 基因对北京欧文氏菌的生物膜形成能力具有促进作用, 缺失该基因, 生物膜形成能力下降。

2.6 运动性测定

在 LB 琼脂糖培养基和 30%杏鲍菇汁琼脂糖培养基上分别对 WT、 $\Delta\text{-}wbnH2$ 和 $C\text{-}wbnH2$ 的运动性进行测定, 评估各菌株在不同培养基上的运动能力。结果如图 6 所示, 在 LB 琼脂糖培养基中, 运动情况无明显差异。在 30%杏鲍菇汁培养基中, 突变株与野生型菌株运动能

力有极显著差异 ($P<0.001$)。野生型菌株的运动能力是突变株 $\Delta\text{-}wbnH2$ 的 8.9 倍。表明 $wbnH2$ 基因对北京欧文氏菌的运动能力具有促进作用。

2.7 黏附能力测定

对北京欧文氏菌 WT 和 $\Delta\text{-}wbnH2$ 的黏附能力进行了测定。结果如图 7 所示, 突变株 $\Delta\text{-}wbnH2$ 的菌落黏附数显著低于野生型菌株,

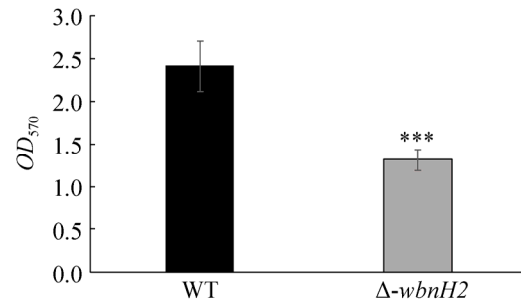


图 5 生物膜形成能力测定结果 ***: $P<0.001$
Figure 5 Biofilm formation ability assay results. ***: $P<0.001$.

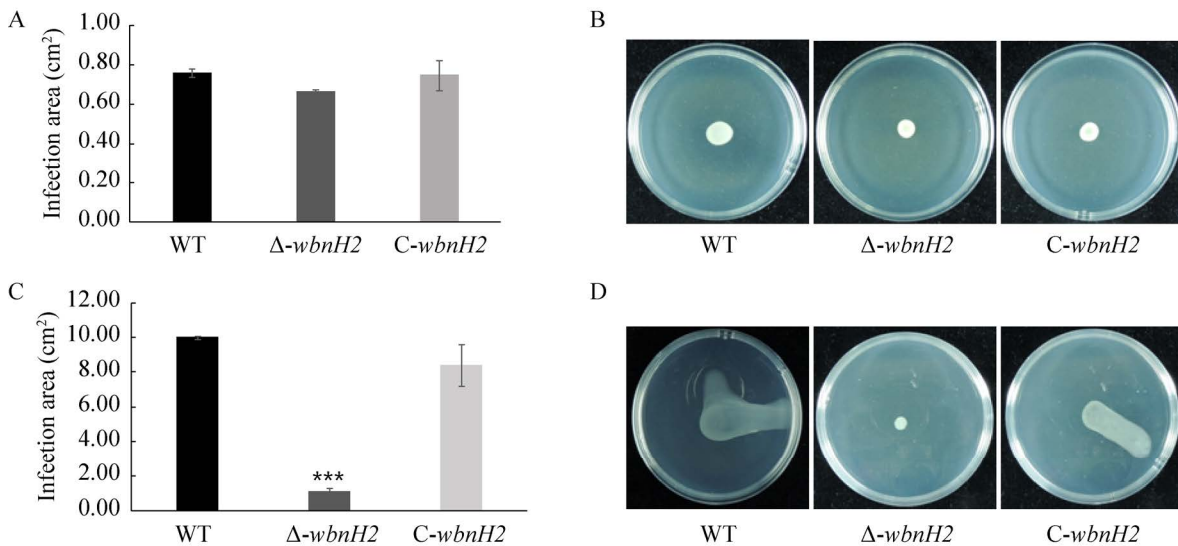


图 6 运动性测定结果 A: LB 琼脂糖培养基上各菌株移动性面积测定; B: LB 琼脂糖培养基上各菌株移动性平板图; C: 30%杏鲍菇汁培养基上各菌株移动性面积测定; D: 30%杏鲍菇汁培养基上各菌株移动性平板图。***: $P<0.001$

Figure 6 Motility assay results. A: Determination of the mobility area of each strain on LB agarose medium; B: Mobility plate map of each strain on LB agarose medium; C: Determination of the mobility area of each strain on 30% *Pleurotus eryngii* juice medium; D: Plate diagram of the mobility of each strain on 30% *Pleurotus eryngii* juice medium. ***: $P<0.001$.

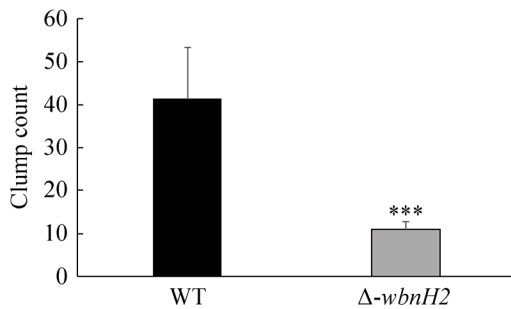


图 7 黏附能力测定结果 WT: 野生型菌株菌落黏附情况; Δ -*wbnH2*: 突变株菌落黏附情况。

***: $P < 0.001$

Figure 7 Adhesion determination results. WT: Colony adhesion of wild-type strains; Δ -*wbnH2*: Colony adhesion of mutant. ***: $P < 0.001$.

野生型菌株黏附的菌落数是突变株的 3.8 倍。二者具有极显著性差异($P < 0.001$)。表明 *wbnH2* 基因对北京欧文氏菌的黏附能力具有促进作用。

3 讨论与结论

本研究利用同源重组方法^[33], 利用 pRE112 自杀质粒, 将 WM3064 营养缺失型大肠杆菌作为供体菌与北京欧文氏菌野生型菌株进行同源重组, 从而获得基因缺失株 Δ -*wbnH2*, 并研究了该基因与致病力、生物膜形成能力、黏附能力等的关系。欧文氏菌属细菌是常见的植物病原菌^[34-36], 其在刺芹侧耳中引发软腐病是国内首次报道^[17]。胞外多糖是众所周知的植物病原菌的重要毒力因子之一^[37], 胞外多糖的分泌是其对宿主入侵的重要条件, 糖基转移酶对多糖合成具有极大的促进作用。粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 中的糖基转移酶促进多糖分泌, 缺失糖基转移酶基因 (glycosyltransferase, GTF) 导致粪肠球菌多糖产量下降^[38]。柠檬黄单胞菌亚种 [*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac)] 中编码糖基转移酶的 *gpsX* 基因对多糖的产生十分重要, 缺失该基因时病原菌移动性减弱,

胞外多糖显著减少^[39]。比较野生型菌株和基因缺失株发现, 缺失 *wbnH2* 糖基转移酶基因使得多糖产量下降, 表明该基因是多糖合成关键基因。生物膜形成能力一直被认为是重要的毒力因素之一^[40], 它是附着在病原菌表面的单一物种或多物种微生物细胞群落, 成熟的生物膜会形成复合物, 包裹在由多糖、蛋白质、核酸和脂质组成的细菌产生的细胞外基质中, 使病原菌可以忍受恶劣的外界环境, 从而有利于入侵宿主^[41]。在铜绿假单胞菌中, 有多种胞外多糖有助于生物膜的形成^[42]。生物膜形成能力测定结果表明, *wbnH2* 基因缺失株生物膜形成能力下降, 表明该基因参与了生物膜的形成。菌株运动能力与生物膜形成能力有关, 这 2 个过程通常会相辅相成^[43-44]。运动性测定结果显示, 突变株在 LB 琼脂糖培养基中运动面积与野生型无明显差异。在 30% 杏鲍菇汁琼脂糖培养基中突变株 *wbnH2* 运动能力显著弱于野生型及回补株, 表明杏鲍菇汁培养基更有利于多糖的分泌, 从而运动范围扩大, 缺失该基因后, 多糖产量下降, 降低了病原菌的能力, 这种现象在铜绿假单胞菌中也有类似报道^[21]。病原菌对宿主的侵袭和定殖的关键步骤之一是黏附到宿主细胞上^[45], 黏附试验测定结果表明, 缺失 *wbnH2* 基因后显著降低了菌株的黏附能力。通过离体接种、子实体接种可以明显看出缺失 *wbnH2* 基因的菌株致病力减弱, 回补该基因后与野生型致病力相当, 证明该基因与致病性密切相关。

本研究中我们对北京欧文氏菌的 *wbnH2* 糖基转移酶基因进行了生物学特性分析。我们的研究表明, *wbnH2* 基因对胞外多糖的产生具有促进作用, 缺失该基因不影响北京欧文氏菌的生长能力。但是缺失该基因降低了病原菌多糖分泌能力、生物膜形成能力、黏附能力、运动

能力及致病能力，表明该基因是北京欧文氏菌的关键致病基因。

REFERENCES

- [1] Polsinelli I, Borruso L, Caliandro R, Triboli L, Esposito A, Benini S. A genome-wide analysis of desferrioxamine mediated iron uptake in *Erwinia* spp. reveals genes exclusive of the *Rosaceae* infecting strains[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 2818
- [2] Malnoy M, Martens S, Norelli JL, Barny MA, Sundin GW, Smits THM, Duffy B. Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host[J]. Annual Review of Phytopathology, 2012, 50: 475-494
- [3] Shapiro LR, Scully ED, Straub TJ, Park J, Stephenson AG, Beattie GA, Gleason ML, Kolter R, Coelho MC, De Moraes CM, et al. Horizontal gene acquisitions, mobile element proliferation, and genome decay in the host-restricted plant pathogen *Erwinia tracheiphila*[J]. Genome Biology and Evolution, 2016, 8(3): 649-664
- [4] Lin ZC, Ni SS, Wu QZ, Lai ZX. Physiological response of *Oncidium hybridum* ‘Gower Ramsey’ infected by *Erwinia carotovora*[J]. Plant Diseases and Pests, 2020, 11(S1): 1-7, 13
- [5] Amr K. Management of soft rot disease, caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in potato tubers[J]. African Journal of Biological Sciences, 2019, 15(1): 211-218
- [6] Singh J, Khan A. Distinct patterns of natural selection determine sub-population structure in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 14017
- [7] Gayder S, Parcey M, Castle AJ, Svircev AM. Host range of bacteriophages against a world-wide collection of *Erwinia amylovora* determined using a quantitative PCR assay[J]. Viruses, 2019, 11(10): 910
- [8] Puławska J, Kałużna M, Warabieda W, Mikiciński A. Comparative transcriptome analysis of a lowly virulent strain of *Erwinia amylovora* in shoots of two apple cultivars-susceptible and resistant to fire blight[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 868
- [9] Kim MK, Lee SM, Seuk SW, Ryu JS, Kim HD, Kwon JH, Choi YJ, Yun HD. Characterization of the *rcsA* gene from *Pantoea* sp. strain PPE7 and its influence on extracellular polysaccharide production and virulence on *Pleurotus eryngii*[J]. The Plant Pathology Journal, 2017, 33(3): 276-287
- [10] 赖亮民, 胡晶晶, 王艳, 莫宇丽, 姜子德, 王杰. 刺芹侧耳软腐病病原菌鉴定及其致病机制[J]. 食用菌学报, 2021, 28(2): 89-99
- [11] Lai LM, Hu JJ, Wang Y, Mo YL, Jiang ZD, Wang J. Identification and pathogenic mechanisms of pathogens causing soft rot disease in *Pleurotus eryngii*[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(2): 89-99 (in Chinese)
- [12] Kim MK, Ryu JS, Lee YH, Yun HD. First report of *Pantoea* sp. induced soft rot disease of *Pleurotus eryngii* in Korea[J]. Plant Disease, 2007, 91(1): 109
- [13] 马元伟, 马康, 王守现, 赵爽, 王兰青, 刘宇, 许峰. 一株刺芹侧耳软腐病致病菌新种的分离与鉴定[C]//第十届全国食用菌学术研讨会论文集汇编. 北京, 2014: 382-389
- [14] Ma YW, Ma K, Wang SX, Zhao S, Wang LQ, Liu Y, Xu F. Isolation and identification of a novel pathogenic bacteria, causing soft-rot disease of *Pleurotus eryngii*[A]//The 10th national symposium on edible fungi[C]. Beijing, 2014: 382-389 (in Chinese)
- [15] 药欣荣, 常明昌, 刘靖宇, 赵慧, 仝宗军, 常晏民. 杏鲍菇软腐病的病原菌及其生物学特性研究[J]. 中国食用菌, 2017, 36(4): 58-61, 65
- [16] Yao XR, Chang MC, Liu JY, Zhao H, Tong ZJ, Chang YM. Biological characteristics of soft-rot parasitic on *Pleurotus eryngii*[J]. Edible Fungi of China, 2017, 36(4): 58-61, 65 (in Chinese)
- [17] 张瑞颖, 胡丹丹, 顾金刚, 左雪梅, 胡清秀. 刺芹侧耳细菌性软腐病病原菌分离鉴定[J]. 食用菌学报, 2013, 20(3): 43-49
- [18] Zhang RY, Hu DD, Gu JG, Zuo XM, Hu QX. Identification and characterization of an *Erwinia* sp. causing bacterial soft-rot disease on *Pleurotus eryngii* cultivated in China[J]. Acta Edulis Fungi, 2013, 20(3): 43-49 (in Chinese)
- [19] 常晓宁, 郭纹余, 郑素月, 王春霞, 郭金英. 杏鲍菇软腐病研究进展[J]. 中国食用菌, 2021, 40(8): 5-8
- [20] Chang XN, Guo WY, Zheng SY, Wang CX, Guo JY. Research progress on soft rot disease of *Pleurotus eryngii*[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(8): 5-8 (in Chinese)
- [21] Xu F, Yan H, Liu Y, Zhao S, Song S, Gu TT, Song ZJ, Xie JB, Rong CB. A re-evaluation of the taxonomy and classification of the type III secretion system in a pathogenic bacterium causing soft rot disease of

- Pleurotus eryngii*[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(1): 179-189
- [18] Ma Y, Liu Y, Wang S, Zhang D, Zhao S, Ma K. Occurrence of *Pantoea beijingensis* on *Pleurotus eryngii* in China[J]. *Journal of Plant*, 2014, 96(2): 96
- [19] Osemwegie OO, Adetunji CO, Ayeni EA, Adejobi OI, Arise RO, Nwonuma CO, Oghenekaro AO. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa[J]. *Heliyon*, 2020, 6(6): e04205
- [20] Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(2): e1004691
- [21] Heredia-Ponce Z, Gutiérrez-Barranquero JA, Purtschert-Montenegro G, Eberl L, Cazorla FM, De Vicente A. Biological role of EPS from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 extracellular matrix, focusing on a Psl-like polysaccharide[J]. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2020, 6: 37
- [22] Zhang YB, Wei C, Jiang WD, Wang L, Li CR, Wang YY, Dow JM, Sun WX. The HD-GYP domain protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59428
- [23] Yakovlieva L, Walvoort MTC. Processivity in bacterial glycosyltransferases[J]. *ACS Chemical Biology*, 2020, 15(1): 3-16
- [24] Schmid J, Heider D, Wendel NJ, Sperl N, Sieber V. Bacterial glycosyltransferases: challenges and opportunities of a highly diverse enzyme class toward tailoring natural products[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 182
- [25] Middleton DR, Aceil J, Mustafa S, Paschall AV, Avci FY. Glycosyltransferases within the *psrP* locus facilitate pneumococcal virulence[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(7): e00389-e00320
- [26] Rainey K, Michalek SM, Wen ZT, Wu H. Glycosyltransferase-mediated biofilm matrix dynamics and virulence of *Streptococcus mutans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(5): e02247-e02218
- [27] Deng Q, Wu HX, Gu Q, Tang GF, Liu WD. Glycosyltransferase FvCpsA regulates fumonisin biosynthesis and virulence in *Fusarium verticillioides*[J]. *Toxins*, 2021, 13(10): 718
- [28] 王静, 肖秋肖, 肖红琴, 康宁芳, 巩仔鹏, 郑林, 王爱民, 李勇军, 黄勇, 李月婷. 响应面法优化山慈菇多糖的水提醇沉法工艺[J]. *贵州农业科学*, 2021, 49(7): 134-141
- Wang J, Xiao QX, Xiao HQ, Kang NF, Gong ZP, Zheng L, Wang AM, Li YJ, Huang Y, Li YT. Optimization of water-extraction and alcohol-precipitation method for *Cremastra appendiculata* polysaccharide by response surface method[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2021, 49(7): 134-141 (in Chinese)
- [29] Wang XL, Yang F, Von Bodman SB. The genetic and structural basis of two distinct terminal side branch residues in stewartan and amylovan exopolysaccharides and their potential role in host adaptation[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(1): 195-207
- [30] Zhang L, Li MH, Li QQ, Chen CQ, Qu M, Li MY, Wang Y, Shen XH. The catabolite repressor/activator *cra* is a bridge connecting carbon metabolism and host colonization in the plant drought resistance-promoting bacterium *Pantoea alhagi* LTJR-11Z[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(13): e00054-e00018
- [31] Raterman EL, Shapiro DD, Stevens DJ, Schwartz KJ, Welch RA. Genetic analysis of the role of *yfiR* in the ability of *Escherichia coli* CFT073 to control cellular cyclic dimeric GMP levels and to persist in the urinary tract[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(9): 3089-3098
- [32] Kutschera A, Schombel U, Wröbel M, Gisch N, Ranf S. Loss of *wbpL* disrupts O-polysaccharide synthesis and impairs virulence of plant-associated *Pseudomonas* strains[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(11): 1535-1549
- [33] Niu TS, Guo LH, Luo QX, Zhou K, Yu W, Chen YB, Huang C, Xiao YH. *Wza* gene knockout decreases *Acinetobacter baumannii* virulence and affects Wzy-dependent capsular polysaccharide synthesis[J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 1-13
- [34] Emeriewen OF, Wöhner T, Flachowsky H, Peil A. *Malus* hosts-*Erwinia amylovora* interactions: strain pathogenicity and resistance mechanisms[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 551
- [35] Salomone-Stagni M, Bartho JD, Polsinelli I, Bellini D, Walsh MA, Demitri N, Benini S. A complete structural characterization of the desferrioxamine E biosynthetic pathway from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*[J]. *Journal of Structural Biology*, 2018, 202(3): 236-249
- [36] Moradi-Amirabad Y, Khodakaramian G, Aalimohammadi

- A. First report of pear blossom necrosis caused by *Erwinia piriflorinigrans* in Iran[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2020, 102(1): 219-220
- [37] Dow JM, Daniels MJ. Pathogenicity determinants and global regulation of pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1994, 192: 29-41
- [38] Dale JL, Cagnazzo J, Phan CQ, Barnes AMT, Dunny GM. Multiple roles for *Enterococcus faecalis* glycosyltransferases in biofilm-associated antibiotic resistance, cell envelope integrity, and conjugative transfer[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(7): 4094-4105
- [39] Li JY, Wang N. The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 31
- [40] Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action[J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 522-554
- [41] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633
- [42] Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(6): 644-648
- [43] Fünfhaus A, Göbel J, Ebeling J, Knispel H, Garcia-Gonzalez E, Genersch E. Swarming motility and biofilm formation of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*)[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8840
- [44] De La Fuente-Núñez C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EBM, Horsman S, Lewenza S, Burrows L, Hancock REW. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(5): 2696-2704
- [45] Ali A, Kolenda R, Khan MM, Weinreich J, Li GW, Wieler LH, Tedin K, Roggenbuck D, Schierack P. Novel avian pathogenic *Escherichia coli* genes responsible for adhesion to chicken and human cell lines[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(20): e01068-e01020