



# 鸭疫里默氏杆菌自然转化的发现及机制研究进展

刘思齐<sup>1,2,3</sup>, 时春风<sup>1,2,3</sup>, 刘马峰<sup>1,2,3\*</sup>

1 四川农业大学动物医学院 禽病防治中心, 四川 成都 611130

2 四川农业大学动物医学院 预防兽医研究所, 四川 成都 611130

3 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

刘思齐, 时春风, 刘马峰. 鸭疫里默氏杆菌自然转化的发现及机制研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 483-493.

LIU Siqi, SHI Chunfeng, LIU Mafeng. Advances in discovery and mechanism of natural transformation in *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 483-493.

**摘要:** 自然转化(natural transformation)是微生物水平基因转移的一种重要机制, 其在遗传多样性的产生或修复 DNA 损伤等方面发挥着重要作用, 并且与耐药基因、毒力因子的扩散息息相关。鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是威克斯菌科中第一个被发现可以发生自然转化的细菌, 本文作者利用此特点建立了多种基因编辑的方法, 促进了对其遗传多样性和致病机理的研究进程。通过系统性地研究影响鸭疫里默氏杆菌自然转化的因素, 鉴定出了参与该菌自然转化的营养物质; 通过筛选转座子插入突变体文库, 鉴定出了参与该过程的必需基因; 最终, 在该菌发现了一种新型的自然转化系统。本文结合其他细菌自然转化研究进展, 针对以上研究结果进行综述, 以期对该菌的自然转化机制有更深入的理解, 也为更进一步探明该菌的耐药和毒力基因获得机制提供参考。

**关键词:** 鸭疫里默氏杆菌; 自然转化; 水平基因转移; 生物学功能

资助项目: 国家自然科学基金(32172851); 四川省科技厅项目(2020YJ0344)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172851) and the Sichuan Science and Technology Program (2020YJ0344).

\*Corresponding author. E-mail: liumafengra@163.com

Received: 2022-06-01; Accepted: 2022-08-30; Published online: 2022-09-14

# Advances in discovery and mechanism of natural transformation in *Riemerella anatipestifer*

LIU Siqui<sup>1,2,3</sup>, SHI Chunfeng<sup>1,2,3</sup>, LIU Mafeng<sup>1,2,3\*</sup>

1 Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Institute of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

3 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan, China

**Abstract:** Natural transformation, a mechanism of horizontal gene transfer, plays an important role in the generation of genetic diversity, the repair of DNA damage, and the spread of drug resistance genes and virulence genes. *Riemerella anatipestifer* (RA) is the first bacterium of *Weeksellaceae* found to be able to undergo natural transformation. We established a variety of gene editing methods based on this property, which accelerated the research on the genetic diversity and pathogenic mechanism of RA. In addition, we identified the essential nutrients for natural transformation of RA through systematically screening the factors affecting the natural transformation. Subsequently, we identified the essential genes involved in natural transformation by screening the mutant library. Finally, we discovered a unique system of natural transformation in RA. Reviewing the studies of natural transformation in other bacteria, we introduced the research progress in the natural transformation of RA, aiming to deeply understand the natural transformation mechanism of this bacterium and provide references for further deciphering the mechanisms of drug resistance and virulence gene acquisition of this bacterium.

**Keywords:** *Riemerella anatipestifer*; natural transformation; horizontal gene transfer; biological function

水平基因转移 (horizontal gene transfer, HGT) 在细菌的遗传多样性中起到了重要的作用, 它参与了多种生理过程, 包括抗生素耐药基因的传播<sup>[1]</sup>、毒素编码噬菌体的分布<sup>[2]</sup>和致病岛的转移等<sup>[3-4]</sup>。HGT 主要包括 3 种方式: 接合转移、转导以及自然转化。自然转化是一种重要的水平基因转移的机制, 其依赖于细菌染色体上多个基因的功能<sup>[5]</sup>, 允许细菌从环境中获取胞外 DNA, 并通过同源重组的方式将其整合到基因组中<sup>[6]</sup>。自然转化在许多病原菌对环境的适应中发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>, 是广泛存在于细

菌和古细菌中的遗传特征, 据报道, 迄今已有至少 83 种原核物种被发现可以发生自然转化<sup>[6]</sup>, 其中包括鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA)<sup>[9]</sup>。

鸭疫里默氏杆菌最新被归类于威克斯菌科 (*Weeksellaceae*), 可以感染鸭、鹅和火鸡等禽类<sup>[10]</sup>, 感染鸭后会导致大量死亡, 给养鸭业带来了巨大的经济损失<sup>[11]</sup>。目前临床分离到的 RA 对多种抗生素均天然耐药, 同时由于其血清型众多且没有交叉保护, 因此在生产实际中对 RA 的防控依然是一大难题<sup>[12]</sup>。本团队首次发现鸭疫

里默氏杆菌可以发生自然转化, 利用该特性开发了多种基因编辑技术, 并对影响自然转化的决定因素和机制进行了深入探究。本文主要就鸭疫里默氏杆菌自然转化的发现、影响因素及相关基因鉴定等研究进行综述。

## 1 自然转化概述

90多年前, 基于 Frederick Griffith 的开创性工作, 发现肺炎链球菌的有毒力和无毒力菌株可以相互转化<sup>[13]</sup>。随后, 细菌可以进行“自然转化”的现象被发现, 并创造了“自然遗传转化”一词, 以区别于其他用于将 DNA 分子导入细菌的人工体外程序。能够进行自然转化的细菌被称为“天然感受态(natural competent)”。有些细菌, 如淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*)等在生长的各个阶段都能进行自然转化<sup>[14-15]</sup>, 而有些细菌, 如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)等的自然转化只发生在特定的时间点, 其摄取 DNA 的能力是短暂的<sup>[16]</sup>。

虽然自然转化在不同的细菌中的机制有所不同, 但总体来说分为 4 个步骤: DNA 招募、DNA 结合与摄取、DNA 处理以及同源重组<sup>[17]</sup>。在这一过程中, DNA 的摄取与同源重组至关重要。迄今为止, 包括革兰氏阴性菌在内的所有研究系统中, 从环境中转化的双链 DNA (dsDNA) 均通过细菌外膜导入并加工成单链 DNA (ssDNA)。一些革兰氏阴性菌, 如奈瑟氏菌、流感嗜血杆菌、嗜热细菌(*Thermus thermophilus*)等, 使用IV型菌毛(type IV pilus, T4P)吸收外源双链 DNA (dsDNA)<sup>[18-19]</sup>。蛋白质相互作用研究及其他分析表明, 嗜热细菌的 DNA 转运蛋白和

IV型菌毛 T4P 的内膜和外膜蛋白形成了一个从细胞质延伸到外膜的完整结构, DNA 通过与 PilQ 复合体结合, 再通过分泌素通道转移<sup>[20]</sup>。而在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)中, DNA 摄取不是由基于IV型菌毛的装置介导的, 而是依赖于与IV型分泌系统(T4SS)相关的运输系统, 称为 comB 系统<sup>[21]</sup>。幽门螺杆菌 ComB 蛋白以其来自根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) VirB/D4 系统的直系同源物命名。到目前为止, 它们由 5 个开放阅读框(ORF)组成: ComB4、ComB7、ComB8、ComB9 和 ComB10<sup>[22-24]</sup>。此外, 空肠弯曲杆菌则是使用II型分泌系统(T2SS)吸收外源 dsDNA<sup>[25]</sup>。

当 DNA 被摄取进入周质/假周质后, 就会通过第二个广泛保守的机制进一步将其转运穿过细胞质膜<sup>[26]</sup>。这种机制由另一个名为 ComE/ComEA<sup>[27-28]</sup>的 DNA 受体组成, 该受体将 DNA 传递到通透酶 ComEC<sup>[29]</sup>, 再由 ATP 水解提供动力的过程中将其转运到细胞质<sup>[30]</sup>。在那里, ssDNA 被同源重组(homologous recombination)机制识别并整合到宿主染色体中<sup>[31]</sup>。自然转化具体过程及机制可参见文献<sup>[26]</sup>。

## 2 鸭疫里默氏杆菌自然转化的发现及基于该现象的基因编辑方法

### 2.1 鸭疫里默氏杆菌自然转化现象的发现

对 RA 标准株 ATCC 11845 以及 CH-1、CH-2 株的基因组进行测序, 发现其广泛存在基因多样性、基因含量差异等现象。首先是基因组的大小不同, 其次是各菌株中含有的耐药基因也不同。例如在 CH-1 中存在的单加氧酶基因(*tetX*)、红霉素甲基化转移酶基因(*ermF*)、A 类  $\beta$ -内酰胺酶基因(*bla*)等耐药基因, 而在 ATCC

11845 基因组中却并未找到相关基因<sup>[32]</sup>。这种多样性一般是由于突变、基因组重排和来自环境的外源 DNA 造成的,表明 RA 具有可以接受外源 DNA 的能力<sup>[33-34]</sup>。

DNA 可以通过接合转移<sup>[35]</sup>、噬菌体转导<sup>[36]</sup>及自然转化<sup>[37]</sup> 3 种典型的方式从一种细菌转移到另一种细菌。其中,接合转移一般由质粒介导<sup>[38]</sup>。现有已测序的多数 RA 分离株中,只有极少数的菌株中能够分离到质粒,可排除接合转移是 RA 获得外源基因的主要方式。为了研究 RA 是否为一种天然感受态,Liu 等以对红霉素敏感的 RA 标准株 ATCC 11845 为研究对象,将其培养至对数期后与 RA CH-1 染色体 DNA (含红霉素抗性基因 *Erm*<sup>[39-40]</sup>)共同孵育后涂布于红霉素抗性板上,结果从板上分离到含有红霉素抗性的菌落,对其进行 PCR 鉴定及测序发现红霉素抗性基因被插入到了 ATCC 11845 的基因组中,表明 RA ATCC 11845 具有天然感受态活性<sup>[9]</sup>。为了进一步研究自然转化是否发生在 RA 的整个生长期,Liu 等检测了 ATCC 11845 在迟滞期、指数期、静止期和衰亡期的自然转化频率,发现 RA ATCC 11845 在所有生长阶段都具有自然转化活性,在对数生长期的自然转化频率最高<sup>[9]</sup>。检测 RA ATCC 11845 发生自然转化这一过程所需要的时间,发现此过程可以在 1 min 之内完成,远快于青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)的自然转化过程<sup>[41]</sup>,与霍乱弧菌自然转化发生速度一致<sup>[42]</sup>。

## 2.2 基因编辑方法的建立

由于缺乏方便快捷的基因编辑方法,鸭疫里默氏杆菌基础研究进展缓慢。为突破此技术瓶颈问题,Liu 等将 RA ATCC 11845 菌株中待缺失基因上下游同源序列与红霉素抗性基因序列通过重叠 PCR 相连,将该重组片段与亲本株孵育并通过红霉素抗性平板筛选后进行鉴定,

由此得到了含有红霉素抗性基因的“有痕”缺失菌株,这一方法的建立极大地加快了 RA 基因缺失的效率<sup>[9]</sup>。但由于 RA 对多种抗生素天然耐药会导致抗性基因选择范围狭窄,且“有痕”缺失存在潜在“极效应”等不利影响,本团队随后依次建立了以 *pheS* 基因突变体<sup>[43]</sup>、*rpsL*<sup>[44]</sup>、*SacB*<sup>[45]</sup>为反向筛选标记的“无痕”缺失、点突变、基因插入等基因编辑的方法。以“无痕”缺失为例,具体缺失流程如图 1 所示。通过建立的方法已对多个鸭疫里默氏杆菌基因的功能进行了鉴定<sup>[43-45]</sup>。

鸭疫里默氏杆菌基于自然转化的“无痕”缺失过程。(1) 扩增并纯化含有目的基因上游、抗性片段、反向筛选标记及目的基因下游的融合片段。(2) 将其与目的菌株进行第一次自然转化,转化后的细菌用含有抗生素的血琼脂平板进行筛选,通过 PCR 鉴定正确的阳性菌落。(3) 扩增目的基因上下游,使用重叠 PCR 将上下游片段进行融合,与整合子进行第二次自然转化,进行反向筛选。通过 PCR 鉴定,最终得到“无痕”缺失菌株。

## 3 影响鸭疫里默氏杆菌自然转化的因素

细菌自然转化效率受生长期、细胞密度、代谢活性、营养压力和 DNA 损伤等多种因素的影响<sup>[46-48]</sup>。一些细菌,如枯草芽孢杆菌和流感嗜血杆菌,对营养信号有反应<sup>[49-50]</sup>;一些细菌,如肺炎链球菌和嗜肺军团菌,会感知不同的压力条件以触发进入可转化状态<sup>[51-52]</sup>。另外,Moreno-Gómez 等使用数学模型证明了细胞密度、pH 和抗生素压力调节肺炎链球菌的自然转化<sup>[53]</sup>。但由于 RA 在所有生长阶段都具有自然转化活性且细胞密度在 RA 的自然转化发展中

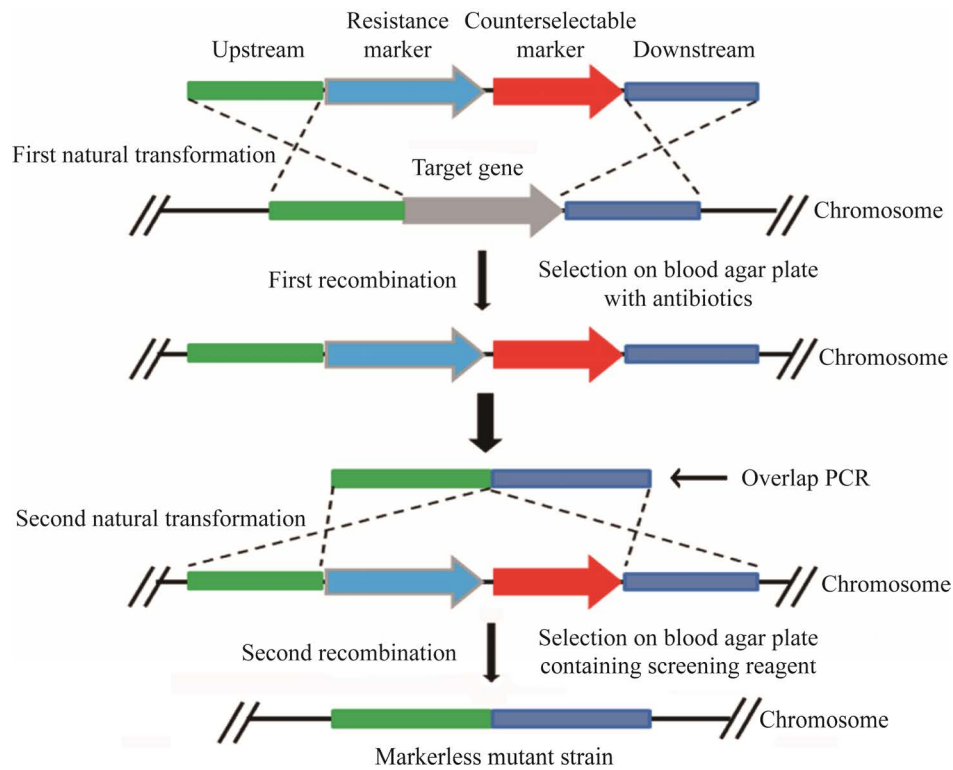


图 1 鸭疫里默氏杆菌基于自然转化的“无痕”缺失流程图

Figure 1 Schematic diagram of markerless mutant using natural transformation in *Riemerella anatipestifer*.

不起重要作用，因此，营养环境被认为是影响 RA 自然转化的主要因素<sup>[9,34]</sup>。

由于 GCB 培养基促进了 RA 最佳的自然转化能力和 DNA 吸收<sup>[9,44]</sup>，Zhang 等评估了 GCB 培养基的各种营养成分[葡萄糖、L-谷氨酰胺、维生素 B<sub>1</sub>、Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、NaCl、磷酸盐和蛋白胨]对 RA ATCC 11845 自然转化的影响<sup>[34]</sup>。将 RA ATCC 11845 培养至对数期，然后分别将其在缺失单一营养物质的 GCB 或是在无菌水中仅添加该单一营养物质中培养一段时间后，分别在这些培养基中测定菌株的自然转化频率。结果表明，当从 GCB 培养基中去除磷酸盐或蛋白胨后，转化频率显著降低。推测这可能是由于蛋白胨为需要转化的细菌提供蛋白质合成所必需的氨基酸，而磷酸盐中的阳离子则可能中和了

待转化 DNA 的磷酸骨架的负电荷<sup>[34]</sup>。

铁是大多数细菌生长和生存的必要元素，因为它在呼吸、抗氧化应激和 DNA 合成等过程中发挥重要作用。研究表明，铁对于 RA 的生长至关重要<sup>[11,54-55]</sup>。为进一步检测铁对于 RA 自然转化的影响，Zhang 等在铁限制性环境检测自然转化频率，发现限铁环境抑制自然转化，而在加入 Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 后自然转化频率逐渐恢复。进一步研究表明，在限铁条件下，参与 RA 自然转化的基因 *dprA*、*comEC* 转录下调<sup>[34]</sup>。由于鸭疫里默氏杆菌 TonB 系统参与了铁离子的转运<sup>[39]</sup>，Zhang 等进一步检测了 3 个 TonB 蛋白对自然转化频率的影响。结果表明，与亲本株相比，*tonBA* 和 *tonBB* 缺失株的自然转化频率显著降低，而 *tbfA* 缺失株对自然转化没有任何影

响; 并且 *tonBB* 的缺失比 *tonBA* 更严重地抑制自然转化, 其原因在于 *tonBB* 缺失株比 *tonBA* 缺失株更加抑制了铁的摄取<sup>[34]</sup>。

## 4 参与鸭疫里默氏杆菌自然转化必需基因的鉴定

大多数可自然转化的细菌都依赖于类似的 DNA 摄取机制<sup>[8,56]</sup>。研究表明, 参与该过程的某些核心基因在系统发育上是保守的<sup>[26]</sup>。例如, 所有可转化细菌几乎都含有促进遗传交换的基因 *dprA*、*recA* 和 *ssbB*, 跨膜通道 ComEC 和胞质外 DNA 结合蛋白<sup>[8,57]</sup>。其中, DprA 和 RecA 都是保护肺炎链球菌中转入 ssDNA 所必需的, DprA 在体外结合 ssDNA 招募 RecA<sup>[31]</sup>, 促进同源重组的发生, 它们的缺失会导致内化的 DNA 立即被降解<sup>[58]</sup>。SsbB 则在转化中扮演着 3 个重要角色。首先, 它可以保护 ssDNA 免受内源性核酸酶的伤害<sup>[59]</sup>; 其次, SsbB 在同源重组中起直接作用, 当每个细菌转化进入一个 DNA 分子时, *ssbB* 突变体的转化效率会降低 3 倍<sup>[60]</sup>; 最后, 当转化 DNA 充足时, SsbB 会创建一个 ssDNA 储存库, 允许连续的重组事件发生<sup>[60]</sup>。而 ComEC 和胞质外 DNA 结合蛋白对于 DNA 转运至关重要, 例如枯草芽孢杆菌中的 ComEA<sup>[27,46]</sup>, 它可以作为受体将 dsDNA 传递到高度保守的 ComEC<sup>[61]</sup>。

### 4.1 鸭疫里默氏杆菌 DprA 的鉴定

Liu 等对鸭疫里默氏杆菌的序列比对分析并未在 RA ATCC 11845 株基因组上找到编码 T4SS 或 T4P 的所有同源物, 仅在基因组上找到一些淋病奈瑟菌的 ComE、ComM、DprA 和 Ssb 的疑似同源物<sup>[9]</sup>。序列分析在 RA ATCC 11845 中发现一个编码与其他细菌的 DprA 序列具有低一致性(30%–37%)假定 DprA。由于 DprA 在

自然转化系统中高度保守, Huang 等探索了该基因是否参与 RA 的自然转化<sup>[62]</sup>。结果表明, 当在 RA ATCC 11845 中缺失 *dprA* 后, 无法检测到自然转化的发生, 这表明 DprA 对于 RA ATCC 11845 的自然转化是必需的。通过生物信息学分析发现鸭疫里默氏杆菌的 DprA 具有 3 个结构域:  $\alpha$  基序结构域(sterile alpha motif, SAM)、Rossmann 折叠结构域(RF)和 Z-DNA 结合结构域(Z $\alpha$ ), 而肺炎链球菌和幽门螺杆菌的 DprA 分别只含有 SAM、RF 结构域和 RF、Z $\alpha$  结构域<sup>[58,63]</sup>。

为了研究 DprA 的每个结构域的功能, Huang 等首先用表达肺炎链球菌的 SAM-RF 结构域或幽门螺旋杆菌的 RF-Z $\alpha$  结构域的质粒对鸭疫里默氏杆菌 *dprA* 缺失菌株进行了回补, 并测定了其自然转化频率, 发现 SAM 结构域的作用比 Z $\alpha$  结构域更重要<sup>[62]</sup>。由于序列比较分析表明位于 RF 结构域中的第 123 位精氨酸是 DprA 该结构域中最保守的氨基酸残基之一, Huang 等将 DprA 的第 123 位精氨酸突变为谷氨酸, 再将其克隆至穿梭载体 pLMF03 上, 并用该质粒对 *dprA* 缺失菌株进行了回补, 发现缺失株的自然转化能力不能被恢复, 表明 RA ATCC 11845 的 RF 结构域是其自然转化所必需的, 且该氨基酸在该结构域中起着关键作用<sup>[62]</sup>。另外, 由于已有研究表明 DprA 可以结合和保护通过自然转化进入胞内的 DNA<sup>[31]</sup>, Huang 等进一步通过凝胶牵引试验(EMSA)验证鸭疫里默氏杆菌中的 DprA 是否可以与 DNA 结合。结果表明, DprA 不仅能够结合单链 DNA (ssDNA), 也能结合双链 DNA (dsDNA), 且没有序列的特异性<sup>[62]</sup>。Huang 等同时也对突变了 RF 结构域中第 123 位精氨酸的 DprA 进行了验证, 发现其丧失了结合 DNA 的能力, 这表明 RF 结构域通过与 DNA 的结合作用而发挥功能<sup>[62]</sup>。

## 4.2 一种新型自然转化系统的发现与鉴定

为了进一步探究 RA 中的自然转化机制, 找到参与自然转化的所有必需基因, Huang 等在 ATCC 11845 中构建了一个包含 3 000 个转座子插入突变体的文库, 并测定了文库中所有菌株的自然转化频率。与亲本株 ATCC 11845 相比, 9 个突变体丧失了自然转化能力, 14 个突变体的自然转化频率显著降低。随后, 通过基因组步移的方法对失活基因进行鉴定, 分析转座子的插入位点, 最终鉴定出了 8 个 ATCC 11845 发生自然转化所必需的基因以及 12 个影响其自然转化频率的基因。生物信息学分析表明, 必需基因中的 *RA0C\_RS04895*、*RA0C\_RS05130* 和 *RA0C\_RS04870* 分别编码假定的 ComEC、DprA 和 RecA 蛋白, *RA0C\_RS05105* 编码一个假定的 ComF 蛋白(可以产生驱动 DNA 通过内膜移位到细胞质所需的能量<sup>[46]</sup>), 这些都已在其他天然感受态细菌中被鉴定, 在 RA 的自然转化中, 它们可能起着相类似的作用。而剩余的 4 个必需基因与已鉴定出的参与自然转化的基因没有任何相似之处。对其进行进一步分析, 推测 *RA0C\_RS04920* 可能位于菌毛中, 吸收胞外 dsDNA; *RA0C\_RS04915* 被预测位于外膜, 含有一个羧肽酶调节样结构域, 该结构域普遍存在于 TonB 依赖的受体分子中, 可能在外膜转运 DNA 中发挥作用; *RA0C\_RS02645* 含有一个非特异性结合 DNA 的螺旋-发夹-螺旋结构域, 推测它位于周质中, 可能在促进 dsDNA 进入周质中发挥作用; 而 *RA0C\_RS04920* 与牙龈卟啉假单胞菌中位于细菌表面的赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶具有高度相似性, 推测其可能于外膜上结合 dsDNA; 这些均表明 RA 编码了一种新型的自然转化系统<sup>[64]</sup>。

## 5 展望

鸭疫里默氏杆菌是第一个在威克斯菌科中

被发现的天然感受态细菌, 对其参与自然转化基因及影响其自然转化因素的鉴定, 有助于揭示该菌乃至威克斯菌科的自然转化机制。最近研究表明在一些可发生自然转化的细菌中存在 CRISPR 系统或 argonaute proteins (Agos) 的“防御系统”会参与抑制自然转化的过程<sup>[19]</sup>。因此, 未来研究的重要挑战不仅是对鸭疫里默氏杆菌自然转化机制更详尽的阐释, 更需要找到可能存在于该菌中的抑制自然转化的线索和机制。如可通过筛选突变体文库中自然转化频率上调的突变体, 从而寻找抑制自然转化的基因。另一方面, 需要对鸭疫里默氏杆菌基因编辑的方法进一步改进, 如可尝试建立多个基因同时进行无痕缺失的方法。这有助于为鸭疫里默氏杆菌中多种耐药性和多种血清型的产生提供新的见解, 并可为自然转化导致抗性基因和毒力基因的传播提供更有力的证据。总之, 解决这些问题将会对鸭疫里默氏杆菌有更深入的了解, 并且也为更好地防控该菌的感染提供理论支撑。

## 参考文献

- [1] LEUNGTONGKAM U, THUMMEEPAK R, TASANAPAK K, SITTHISAK S. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208468.
- [2] McCARTHY AJ, WITNEY AA, LINDSAY JA. *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer is lineage associated[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012, 2: 6.
- [3] HACKER J, BLUM-OEHLER G, MÜHL DORFER I, TSCHÄPE H. Pathogenicity Islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution[J]. Molecular Microbiology, 1997, 23(6): 1089-1097.
- [4] DOBRINDT U, HOCHHUT B, HENTSCHEL U, HACKER J. Genomic Islands in pathogenic and environmental microorganisms[J]. Nature Reviews

- Microbiology, 2004, 2(5): 414-424.
- [5] LORENZ MG, WACKERNAGEL W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment[J]. *Microbiological Reviews*, 1994, 58(3): 563-602.
- [6] SIMPSON CA, PODICHETI R, RUSCH DB, DALIA AB, van KESSEL JC. Diversity in natural transformation frequencies and regulation across *Vibrio* species[J]. *mBio*, 2019, 10(6): e02788-e02719.
- [7] CLAVERYS JP, MARTIN B, POLARD P. The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(3): 643-656.
- [8] JOHNSTON C, MARTIN B, FICHANT G, POLARD P, CLAVERYS JP. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(3): 181-196.
- [9] LIU MF, ZHANG L, HUANG L, BIVILLE F, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, CHENG AC. Use of natural transformation to establish an easy knockout method in *Riemerella anatipestifer*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(9): e00127-e00117.
- [10] RUBBENSTROTH D, RYLL M, HOTZEL H, CHRISTENSEN H, KNOBLOCH JKM, RAUTENSCHLEIN S, BISGAARD M. Description of *Riemerella columbipharyngis* sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*), and emended descriptions of the genus *Riemerella*, *Riemerella anatipestifer* and *Riemerella columbina*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt 1): 280-287.
- [11] WANG MY, ZHANG PY, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, BIVILLE F, CHENG AC, LIU MF. Identification of the ferric iron utilization gene B739\_1208 and its role in the virulence of *R. anatipestifer* CH-1[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 201: 162-169.
- [12] KANG M. Immunogenicity and safety of a live *Riemerella anatipestifer* vaccine and the contribution of IgA to protective efficacy in Pekin ducks[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 222: 132-138.
- [13] GRIFFITH F. The significance of pneumococcal types[J]. *The Journal of Hygiene*, 1928, 27(2): 113-159.
- [14] SPARLING PF. Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance[J]. *Journal of Bacteriology*, 1966, 92(5): 1364-1371.
- [15] VEGGE CS, BRØNDSTED L, LIGOWSKA-MARZĘTA M, INGMER H. Natural transformation of *Campylobacter jejuni* occurs beyond limits of growth[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45467.
- [16] MIROUZE N, BERGÉ MA, SOULET AL, MORTIER-BARRIÈRE I, QUENTIN Y, FICHANT G, GRANADEL C, NOIROT-GROS MF, NOIROT P, POLARD P, MARTIN B, CLAVERYS JP. Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(11): E1035-E1044.
- [17] HAMILTON HL, DILLARD JP. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2): 376-385.
- [18] BERRY JL, CEHOVIN A, McDOWELL MA, LEA SM, PELICIC V. Functional analysis of the interdependence between DNA uptake sequence and its cognate ComP receptor during natural transformation in *Neisseria* species[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(12): e1004014.
- [19] LIU MF, HUANG M, WANG MS, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHANG L, PAN LC, CHENG AC. The clustered regularly interspaced short palindromic repeat system and argonaute: an emerging bacterial immunity system for defense against natural transformation?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 593301.
- [20] AVERHOFF B, KIRCHNER L, PFEFFERLE K, YAMAN D. Natural transformation in Gram-negative bacteria thriving in extreme environments: from genes and genomes to proteins, structures and regulation[J]. *Extremophiles*, 2021, 25(5): 425-436.
- [21] KARNHOLZ A, HOEFLER C, ODENBREIT S, FISCHER W, HOFREUTER D, HAAS R. Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(3): 882-893.
- [22] HOFREUTER D, ODENBREIT S, HAAS R. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system[J]. *Molecular Microbiology*, 2001,



- 41(2): 379-391.
- [23] HOFREUTER D. Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2003, 293(2/3): 153-165.
- [24] CORBINAIS C, MATHIEU A, DAMKE PP, KORTULEWSKI T, BUSSO D, PRADO-ACOSTA M, RADICELLA JP, MARSIN S. ComB proteins expression levels determine *Helicobacter pylori* competence capacity[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41495.
- [25] WIESNER RS, HENDRIXSON DR, DiRITA VJ. Natural transformation of *Campylobacter jejuni* requires components of a type II secretion system[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(18): 5408-5418.
- [26] CHEN I, DUBNAU D. DNA uptake during bacterial transformation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(3): 241-249.
- [27] INAMINE GS, DUBNAU D. ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(11): 3045-3051.
- [28] CHEN I, GOTSCHLICH EC. ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(10): 3160-3168.
- [29] DRASKOVIC I, DUBNAU D. Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(3): 881-896.
- [30] LONDOÑO-VALLEJO JA, DUBNAU D. Mutation of the putative nucleotide binding site of the *Bacillus subtilis* membrane protein ComFA abolishes the uptake of DNA during transformation[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(15): 4642-4645.
- [31] MORTIER-BARRIÈRE I, VELTEN M, DUPAIGNE P, MIROUZE N, PIÉTREMENT O, McGOVERN S, FICHANT G, MARTIN B, NOIROT P, le CAM E, POLARD P, CLAVERYS JP. A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA[J]. Cell, 2007, 130(5): 824-836.
- [32] WANG XJ, LIU WB, ZHU DK, YANG LF, LIU MF, YIN SJ, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, CHENG AC, CHEN XY. Comparative genomics of *Riemerella anatipestifer* reveals genetic diversity[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 479.
- [33] ELLEGREN H, GALTIER N. Determinants of genetic diversity[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(7): 422-433.
- [34] ZHANG L, HUANG L, HUANG M, WANG MY, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, TIAN B, CHENG AC, LIU MF. Effect of nutritional determinants and TonB on the natural transformation of *Riemerella anatipestifer*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 644868.
- [35] VIROLLE C, GOLDLUST K, DJERMOUN S, BIGOT S, LESTERLIN C. Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community level[J]. Genes, 2020, 11(11): 1239.
- [36] MENOUNI R, HUTINET G, PETIT MA, ANSALDI M. Bacterial genome remodeling through bacteriophage recombination[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(1): 1-10.
- [37] STEWART GJ, CARLSON CA. The biology of natural transformation[J]. Annual Review of Microbiology, 1986, 40: 211-231.
- [38] SANA TG, LAUBIER A, BLEVES S. Gene transfer: conjugation[A]//Methods in Molecular Biology[M]. New York, NY: Springer New York, 2014: 17-22.
- [39] LIAO HB, CHENG XJ, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, CHEN XY, BIVILLE F, LIU MF, CHENG AC. TonB energy transduction systems of *Riemerella anatipestifer* are required for iron and hemin utilization[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127506.
- [40] LUO HY, LIU MF, WANG LY, ZHOU WS, WANG MS, CHENG AC, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, CHEN XY, ZHU DK. Identification of ribosomal RNA methyltransferase gene *ermF* in *Riemerella anatipestifer*[J]. Avian Pathology, 2015, 44(3): 162-168.
- [41] BERTOLLA F, van GIJSEGEM F, NESME X, SIMONET P. Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4965-4968.
- [42] ELLISON CK, DALIA TN, VIDAL CEBALLOS A, WANG JCY, BIAIS N, BRUN YV, DALIA AB. Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in

- Vibrio cholerae*[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(7): 773-780.
- [43] LIU MF, HUANG Y, LIU JJ, BIVILLE F, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, CHEN XY, LIU YY, ZHANG L, YOU Y, YU YL, CHENG AC. Multiple genetic tools for editing the genome of *Riemerella anatipestifer* using a counterselectable marker[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(17): 7475-7488.
- [44] LIU MF, TIAN X, WANG MY, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, TIAN B, CHEN XY, LIU YY, ZHANG L, YU YL, BIVILLE F, PAN LC, REHMAN MU, CHENG AC. Development of a markerless gene deletion strategy using *rpsL* as a counterselectable marker and characterization of the function of RA0C<sub>1534</sub> in *Riemerella anatipestifer* ATCC11845 using this strategy[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218241.
- [45] TIAN X, HUANG L, WANG MS, BIVILLE F, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, ZHANG L, YU YL, CHENG AC, LIU MF. The functional identification of Dps in oxidative stress resistance and virulence of *Riemerella anatipestifer* CH-1 using a new unmarked gene deletion strategy[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247: 108730.
- [46] JOHNSBORG O. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function[J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(10): 767-778.
- [47] HUANG L, LIU MF, ZHU DK, XIE L, HUANG M, XIANG C, BIVILLE F, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, SUN D, TIAN B, WANG MS, CHENG AC. Natural transformation of *Riemerella columbina* and its determinants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 634895.
- [48] CORDERO M, GARCÍA-FERNÁNDEZ J, ACOSTA IC, YEPES A, AVENDANO-ORTIZ J, LISOWSKI C, OESTERREICHT B, OHLSEN K, LOPEZ-COLLAZO E, FÖRSTNER KU, EULALIO A, LOPEZ D. The induction of natural competence adapts staphylococcal metabolism to infection[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1525.
- [49] REDFIELD RJ. Sxy-1, a *Haemophilus influenzae* mutation causing greatly enhanced spontaneous competence[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(18): 5612-5618.
- [50] CLAVERYYS JP, PRUDHOMME M, MARTIN B. Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60: 451-475.
- [51] PRUDHOMME M, ATTAIECH L, SANCHEZ G, MARTIN B, CLAVERYYS JP. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Science*, 2006, 313(5783): 89-92.
- [52] CHARPENTIER X, KAY E, SCHNEIDER D, SHUMAN HA. Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(5): 1114-1121.
- [53] MORENO-GÁMEZ S, SORG RA, DOMENECH A, KJOS M, WEISSING FJ, van DOORN GS, VEENING JW. Quorum sensing integrates environmental cues, cell density and cell history to control bacterial competence[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 854.
- [54] ANDREWS SC, ROBINSON AK, RODRÍGUEZ-QUIÑONES F. Bacterial iron homeostasis[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(2/3): 215-237.
- [55] LIU MF, LIU SQ, HUANG M, WANG YL, WANG MY, TIAN X, LI L, YANG ZS, WANG MS, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, SUN D, YU YL, CHENG AC. An exposed outer membrane hemin-binding protein facilitates hemin transport by a TonB-dependent receptor in *Riemerella anatipestifer*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(15): e0036721.
- [56] ANGELOV A, BERGEN P, NADLER F, HORNBERG P, LICHEV A, ÜBELACKER M, PACHL F, KUSTER B, LIEBL W. Novel Flp pilus biogenesis-dependent natural transformation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 84.
- [57] TORASSO KASEM EJ, ANGELOV A, WERNER E, LICHEV A, VANDERHAEGHEN S, LIEBL W. Identification of new chromosomal loci involved in *com* genes expression and natural transformation in the actinobacterial model organism *Micrococcus luteus*[J]. *Genes*, 2021, 12(9): 1307.
- [58] BERGÉ M, MORTIER-BARRIÈRE I, MARTIN B, CLAVERYYS JP. Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands[J].

- Molecular Microbiology, 2003, 50(2): 527-536.
- [59] MORRISON DA, MORTIER-BARRIÈRE I, ATTAIECH L, CLAVERYYS JP. Identification of the major protein component of the pneumococcal eclipse complex[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(17): 6497-6500.
- [60] ATTAIECH L, OLIVIER A, MORTIER-BARRIÈRE I, SOULET AL, GRANADEL C, MARTIN B, POLARD P, CLAVERYYS JP. Role of the single-stranded DNA-binding protein SsbB in pneumococcal transformation: maintenance of a reservoir for genetic plasticity[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(6): e1002156.
- [61] PROVVEDI R, DUBNAU D. ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 1999, 31(1): 271-280.
- [62] HUANG L, TIAN X, LIU MF, WANG MS, BIVILLE F, CHENG AC, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, TIAN B, YU YL, LIU YY, ZHANG L, PAN LC, REHMAN MU, CHEN XY. DprA is essential for natural competence in *Riemerella anatipestifer* and has a conserved evolutionary mechanism[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 429.
- [63] WANG W, DING JJ, ZHANG Y, HU YL, WANG DC. Structural insights into the unique single-stranded DNA-binding mode of *Helicobacter pylori* DprA[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(5): 3478-3491.
- [64] HUANG L, LIU MF, AMMANATH AV, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, SUN D, TIAN B, GÖTZ F, WANG MS, CHENG AC. Identification of the natural transformation genes in *Riemerella anatipestifer* by random transposon mutagenesis[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 712198.