



主持人: 缪卫国

XppI 调控水稻白叶枯病菌致病力的潜在机制

于燕燕, 夏影影, 吴可建, 占昭宏, 陶均

(海南大学热带作物学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228)

摘要: 为了解肽基脯氨酰顺反异构酶 XppI (*Xanthomonas* peptidyl-prolyl isomerase) 在 *Xoo* (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 与水稻互作中的作用, 首先通过体外酶活实验分析了 XppI 的异构酶活性, 随后通过同源重组法构建了 *xppI* 的突变体及其互补菌株, 并分析了 XppI 对病原菌生长、致病力、胞外酶活性及抗氧化胁迫能力的调控作用。结果显示: XppI 具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性, 能够正调控 *Xoo* 的致病力和抗氧化胁迫的能力, 但不影响病原菌的生长和胞外酶活性。以上结果表明, XppI 可能通过调控与抗氧化相关途径蛋白的构型影响病原菌应对宿主氧胁迫的能力, 进而增强 *Xoo* 的致病力。

关键词: 稻属黄单胞菌; 肽基脯氨酰顺反异构酶; 致病力; 抗氧化胁迫

中图分类号: S432.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2023)06-0642-09

于燕燕, 夏影影, 吴可建, 等. XppI 调控水稻白叶枯病菌致病力的潜在机制 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(6): 642-650. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230024

稻属黄单胞菌水稻致病变种 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 是水稻白叶枯病病原菌, 通过水孔或气孔进入水稻维管束, 并在此大量繁殖、堵塞维管束, 严重影响了水稻 (*Oryza sativa*) 的产量^[1]。生命活动的进行依赖于蛋白质活性的精细调控, 在此过程中蛋白质空间构象不断改变从而实现蛋白质活性变化^[2]。蛋白构型变化直接改变蛋白质的空间构象和功能, 但蛋白质的刚性肽键不能自由旋转, 需要在肽基脯氨酰顺反异构酶 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase) 的作用下才能从反式构型转变为稳定性更高的顺式构型^[3]。PPIase 分为三类, 即 FK506 结合蛋白 (FK506 Binding Proteins, FKBP)、亲环蛋白和细蛋白^[4-5], 它们加速目标蛋白质的正确折叠, 是蛋白质折叠过程中的限速酶^[6-8]。由 PPIase 介导的蛋白折叠变构是生命活动的必需过程, 在动物、植物和微生物

的生命活动中均起到非常重要作用^[9-15]。例如, 在幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 中, PPIase 调控镍转运蛋白活性, 调节细胞的镍稳态^[16]; 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 亲环蛋白 AtCYP71 通过控制蛋白顺反异构调控器官形成过程中的染色质重构^[17]; 免疫亲和素 CYP28 可能通过其 PPIase 活性调控由光系统 II (PSII) 复合体与光捕获复合体 II (LHCII) 组成的 PSII-LHCII 超复合体 (SCs) 的组装和积累^[18]。在柑橘黄单胞菌 (*Xanthomonas citri*) 与柑橘 (*Citrus reticulata*) 的互作中, 柑橘黄单胞菌 TAL 效应蛋白 PthAs 通过抑制柑橘亲环素 CsCyp 对 RNA 聚合酶 II 的异构化, 激活宿主的转录, 增强柑橘的溃疡病变^[19]。这些结果表明, PPIase 在生物体生长发育和应对外界环境中发挥重要作用。但 *Xoo* PPIase 的功能及其在致病过程中的作用尚无报道。因此, 笔者通过体外酶活测

收稿日期: 2023-03-01

修回日期: 2023-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960567)

第一作者: 于燕燕 (1996-), 女, 海南大学热带作物学院 2020 级硕士研究生. E-mail: 515407869@qq.com

通信作者: 陶均 (1976-), 男, 博士, 教授. 研究方向: 植物与病原微生物互作. E-mail: taoj@hainanu.edu.cn

定分析了 XppI 是否具有 PPIase 活性, 通过构建 *xppI* 突变体及其互补菌株分析了 XppI 是否调控 *Xoo* 的致病力, 还分析了 *xppI* 突变是否影响 *Xoo* 的胞外酶含量、运动性及抗氧化能力, 期望解析 XppI 调控病原菌致病力的机制, 为白叶枯病害的防治提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 植物、菌株及质粒 供试植物是水稻(*Oryza sativa*) ‘TP309’, 本实验所使用的菌株和质粒如表 1 所示。

1.2 引物 实验所用引物见表 2。

表 1 菌株和质粒来源

名称	相关特性	来源
Strains		
PXO99 ^A	Philippine race 6 (PR6) strain, wild type	文献[20]
DH5 α	Genetically engineered recipient bacteria.	北京博迈德公司
BL21 (DE3)	Bacteria for protein expression	北京博迈德公司
Plasmids		
pK18 <i>mobSacB</i>	<i>Xanthomonas</i> suicide vector, Kan ^R	文献[21]
pHM I	Broad host vector, Sp ^R	文献[22]
pQE80L	Protein expression vector, Amp ^R	德国凯杰公司

注: Kan、Sp 和 Amp 分别表示卡拉霉素、壮观霉素和氨苄青霉素。

表 2 实验引物

引物	序列(5'→3')	用途
<i>xppI</i> ddFF	GCTCAAGCTTACACCAGATCGCCGGTGGCA	<i>xppI</i> deletion
<i>xppI</i> ddFR	GCTAGGATCCGATCTTCATGCGTAGCTCTG	
<i>xppI</i> ddRF	GCTAGGATCCAGTCATCACTACTAAGATCG	
<i>xppI</i> ddRR	GCTCGAATTC CC ATCACCGCAAAGCCCATC	
<i>xppI</i> hmF	GCTCAAGCTTACACCAGATCGCCGGTGGCA	Δ <i>xppI</i> complementation
<i>xppI</i> hmR	GCTCGAATTC CA AAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATG GGTAGTAGTAGTAGCTGCCATCGC	
<i>xppI</i> qeF	GACAGGATCCAAGATCGAAAAAGACAGCGTC	XppI expression
<i>xppI</i> qeR	GACGAAGCTT CG ATCTTAGTAGTGATGACTG	

注: 下划线表示酶切位点。

1.3 XppI 蛋白的体外表达与纯化 以 *Xoo* 野生型菌株 PXO99^A 基因组为模板, 以 *xppI*qeF/*xppI*qeR 为引物, 扩增 *xppI* 基因片段, *Bam*HI/*Hind*III 酶切后连接到相同酶切的 pQE80L 载体上, 测序验证正确后获得 XppI-His 融合表达载体 pQE80L-*xppI*, 然后将 pQE80L-*xppI* 转化 BL21 (DE3) 细胞^[23]。菌株 37 °C 过夜培养后, 按 1 : 100 体积比转接到

500 mL 的新鲜溶菌肉汤 (Luria Bertani, LB) 液体培养基继续培养至 OD_{600} 达 0.6 ~ 0.8 后, 加入 250 μ L 1 mol·L⁻¹ 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 并于 25 °C、90 r·min⁻¹ 条件下诱导培养 5 ~ 6 h。4 °C 离心收集菌体后进行超声破碎 (超声功率比 40%、超声 5 s、间隙 5 s、总时间 10 min), 取上清, SDS-PAGE 电

泳观察蛋白诱导表达情况。将目的蛋白按照 BEAVER 公司的 BeaverBeads™ IDA-Nickel Kit 试剂盒 (Cat. No. 70501-K10) 进行纯化, SDS-PAGE 检测纯化效果。

1.4 XppI 蛋白的异构酶活性检测 通过糜蛋白酶消化法测定 XppI 蛋白的异构酶活性。将 25 μL XppI-His 蛋白 ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、25 μL 糜蛋白酶 ($5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、145 μL $50 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 和 10 μL $1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的底物 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide 混匀加入 96 孔板中, 以 BSA 蛋白作为对照, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下测量反应液在 390 nm 处的吸光值变化^[24]。

1.5 敲除突变体和互补菌株构建 基因敲除: 以 PXO99^A 基因组为模板, 扩增 *xppI* 基因上下游片段, 分别用 *HindIII/BamHI*, *BamHI/EcoRI* 酶切上下游片段, 然后再连接到 *HindIII/EcoRI* 酶切的 pK18*mobSacB* 上, 获得敲除载体 pK18-*xppI*。电击转化 pK18-*xppI* 至 PXO99^A 中, 经过 2 步同源重组方法获得突变体菌株 $\Delta xppI$ ^[23]。

基因互补: 以 PXO99^A 基因组为模板, 扩增 *xppI* 基因片段, *HindIII/EcoRI* 酶切后克隆到相同酶切的广宿主载体 pHM I, 获得互补载体 pHM I -*xppI*。电击转化 pHM I 和 pHM I -*xppI* 进 $\Delta xppI$ 感受态细胞, 获得 $\Delta xppI$ -pHM I 及互补菌株 C- $\Delta xppI$ 菌株^[23]。

1.6 黄单胞菌的生长表型测定 马铃薯蔗糖琼脂 (Potato Saccharose Agar, PSA) 培养基中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养野生型、突变体和互补菌株 36 h, 稀释菌液 OD_{600} 至 0.5 ± 0.005 。(1)按 1:1000(体积比)的比例转接到 50 mL 新鲜 PSA 液体培养基中, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养, 每隔 2.5 h 测 OD_{600} 值直至稳定期;(2)将菌液进行 10 倍梯度稀释, 点接 PSA(蛋白胨 $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蔗糖 $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 谷氨酸钠 $1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)与 M4M($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $7.52 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $3 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 柠檬酸钠 $0.5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酶水解干酪素 $2 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $2 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)固体培养基, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 静止培养 48~72 h, 观察 3 种菌株之间生长是否有差异。

1.7 致病力分析 野生型、突变体和互补菌株在 PSA 培养基中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 36 h, 将菌液 OD_{600} 调至 1.0, 剪叶法接种 60 d 龄的‘TP309’

水稻叶片, 每种菌株至少接种 10 片叶片, 14 d 后观察并测量病斑长度^[25]。

1.8 胞外纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶活性检测

PSA 培养基中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养野生型、突变体和互补菌株 36 h, 调 OD_{600} 至 1.0, 分别取 2 μL 不同菌液接种到含 0.5% 羧甲基纤维素、0.1% 可溶性淀粉或 2% 脱脂奶粉的 PSA 固体培养基上, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中倒置培养 3 d。用 0.1% 刚果红染色含纤维素的平板 30 min, 再用 $1 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的溶液洗 2 次, 每次 10 min, 观察水解圈直径(cm); 用 1:100 的 I_2/KI ($0.08 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ I_2 , $3.2 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI) 溶液染色含淀粉的平板 10 min, 观察水解圈直径 (cm); 直接观察脱脂奶粉的水解圈 (cm)^[26]。

1.9 游动性检测 PSA 培养基中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养野生型、突变体和互补菌株 36 h, 调 OD_{600} 至 1.0, 用无菌牙签分别蘸取菌液 10 s 后, 垂直接种于游动培养基 (0.03% 蛋白胨, 0.03% 酵母提取物, 0.25% 琼脂) 中并立即拔出。在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中正置培养 4 d, 测量菌体游动圈的直径 (cm)^[27]。

1.10 蠕动性检测 取上述稀释菌液 2 μL 等间距接种到蠕动性培养基 (1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 2% 葡萄糖, 0.6% 琼脂) 表面上, 在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中正置培养 4 d, 测量菌圈的直径 (cm)^[27]。

1.11 过氧化氢胁迫耐受性分析 PSA 培养基中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养野生型、突变体和互补菌株 36 h, 调 OD_{600} 至 0.5 ± 0.05 , 分别加入 $80 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $120 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (终浓度) 的 H_2O_2 , 混匀后静置处理 30 min。取 1 mL 处理好的菌液离心并用无菌 ddH₂O 洗 2 遍后进行梯度稀释点板。在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中倒置培养 3 d, 观察不同处理菌的生长情况并拍照^[28]。

2 结果与分析

2.1 体外分析 XppI 是否具有肽基脯氨酰顺反异构酶 (PPIase) 活性 为分析 *Xoo* 基因组是否编码 PPIase, 利用大肠杆菌 PPIase SlyD (NP_417808.1) 搜索 *Xoo* 蛋白组, 共获得了 2 个同源蛋白, XppI 和 XopAZ。XopAZ 为预测的 III 型效应蛋白, XppI 功能未知。为验证 XppI 是否为 PPIase, 首先在大肠杆菌中表达并纯化 XppI 蛋白 (图 1-A); 然后利用 α -糜蛋白酶耦联法^[25] 测定其 PPIase 活性。如图 1-B 所示, XppI 蛋白存在时, 反应产物的

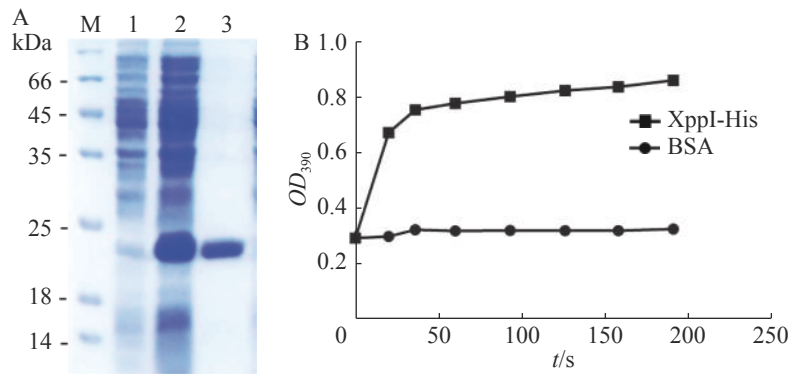


图 1 XppI 蛋白的 PPIase 活性

A: 考马斯亮蓝染色分析 XppI 蛋白的表达和纯化。M: 蛋白 Marker, 1: 未经诱导的细胞裂解物, 2: IPTG 诱导的细胞裂解物, 3: 纯化的 XppI 蛋白。B: 糜蛋白酶消化法分析 XppI 蛋白的 PPIase 活性。

吸光值(A_{390})显著升高;但 BSA 存在时,吸光值没有显著变化,这表明 XppI 具有 PPIase 活性。

2.2 XppI 对 Xoo 生长的调控作用 为了分析 XppI 是否调控 Xoo 的生长繁殖与致病力,首先构建了 *xppI* 的突变体 $\Delta xppI$ 及其互补菌株 C- $\Delta xppI$ 。为了更好地分析,野生型 PXO99^A 和 $\Delta xppI$ 也转入空载体 pHM I。比较 3 个菌株(PXO99^A-pHM I、 $\Delta xppI$ -pHM I 和 C- $\Delta xppI$) 在 PSA 液体培养基中生

长情况。结果显示,野生型、突变体及互补菌株生长没有显著差异(图 2-A)。由于细菌在不同类型培养基上的生长情况可能不同,将 3 种菌株梯度稀释后分别点在丰富性培养基 PSA 和基本培养基 M4M 上进行生长对比实验。结果如图 2-B 所示,这 3 个菌株在 PSA 和 M4M 固体培养基上的生长同样没有明显差异。因此,正常情况下 XppI 不调控 Xoo 生长。

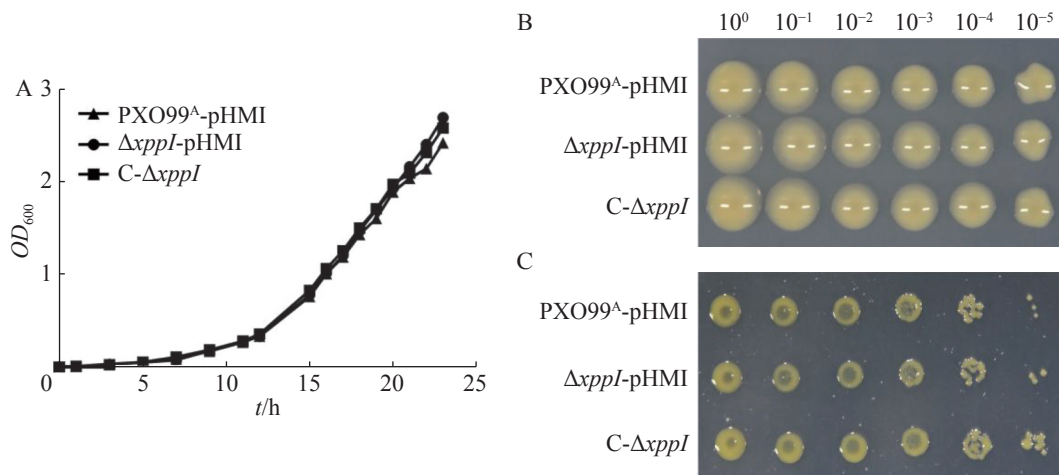


图 2 XppI 不调控 Xoo 的生长

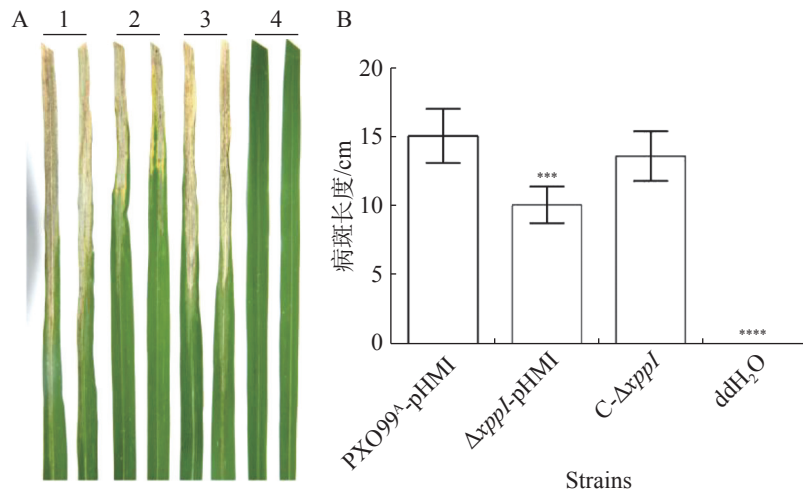
A: 3 种细菌在 PSA 液体培养基中的生长曲线; B: 3 种细菌在 PSA 固体培养基上的生长表型; C: 3 种细菌在 M4M 固体培养基上的生长表型。

2.3 xppI 突变对 Xoo 致病力的影响 PPIase 调控多种蛋白构型变化,可能影响病原菌的致病力。因此将野生型、突变体和互补菌株接种水稻叶片,14 d 后的病斑表型如图 3 所示。与野生型相比, *xppI* 突变菌株致病力显著降低,互补 *xppI* 后,部分恢复了致病力,说明 XppI 正调控 Xoo 的致病力。

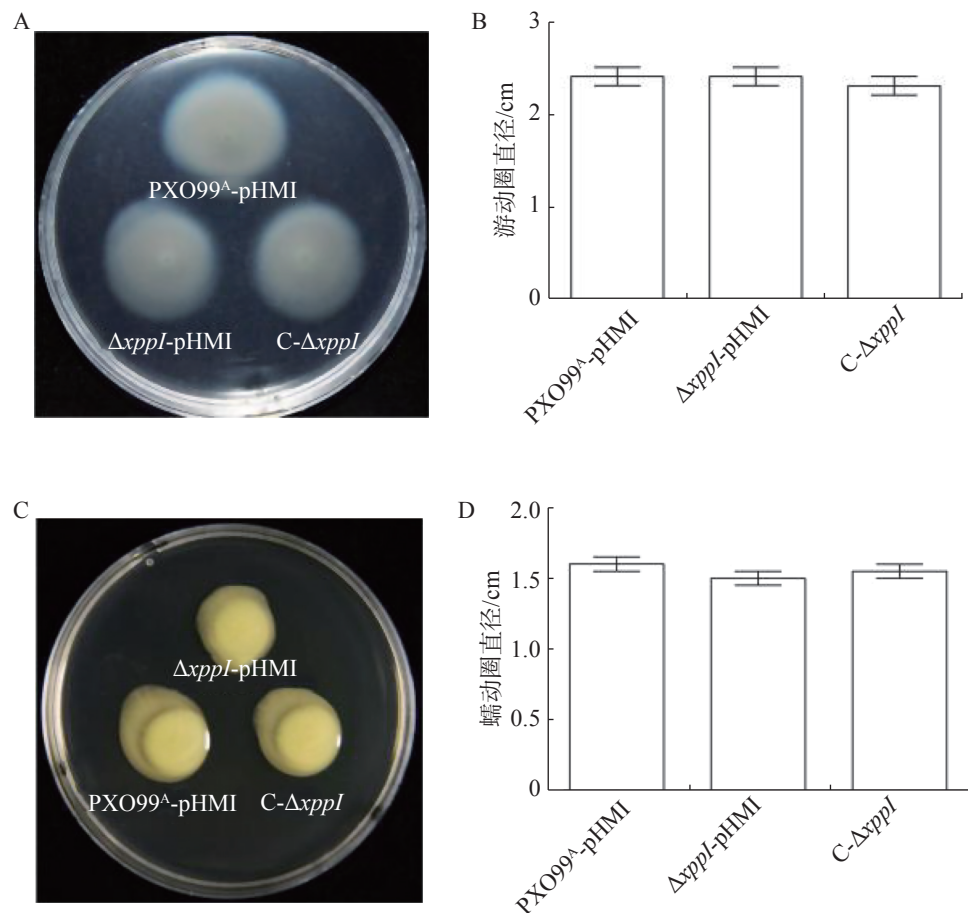
2.4 xppI 突变对 Xoo 运动能力的影响 病原菌的

运动能力是其致病的重要决定因素,在感染初期具有重要作用^[29-30]。通过细菌游动性和蠕动性实验分析,发现野生型、突变体和互补菌株的运动能力均无明显区别(图 4),说明 XppI 并不调控细菌鞭毛和菌毛的运动能力。

2.5 xppI 突变对 Xoo 胞外酶活性的影响 病原菌分泌的胞外酶可降解植物细胞壁,有利于病原菌

图3 XppI 调控 *Xoo* 致病性

A: 接种 14 d 后水稻叶片的病斑表型; 1. 野生型菌株 PXO99^Δ-pHMI, 2. Δ*xppI*-pHMI, 3. C-Δ*xppI*, 4. ddH₂O; B: 感染叶的病斑长度; 误差线, 标准差, ***, $P < 0.01$, ****, $P < 0.001$ (t 测验, 与野生型比较, 下同)。

图4 *xppI* 突变不影响 *Xoo* 的运动能力

A: 游动性表型; B: 游动直径; C: 趋动性表型; D: 趋动直径。

的成功入侵^[31]。通过比较 *xppI* 突变体菌株、互补菌株及野生型菌株各种胞外酶活性发现, *xppI* 突变并没有引起这些胞外蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性变化(图 5), 由此推测 XppI 并不通过调控

胞外酶的活性或分泌来影响 *Xoo* 的致病力。

2.6 *xppI* 突变对 *Xoo* 抗氧化能力的影响 氧化-抗氧化系统在植物与病原菌的互作过程中具有重要作用。活性氧(reactive oxygen species, ROS)在

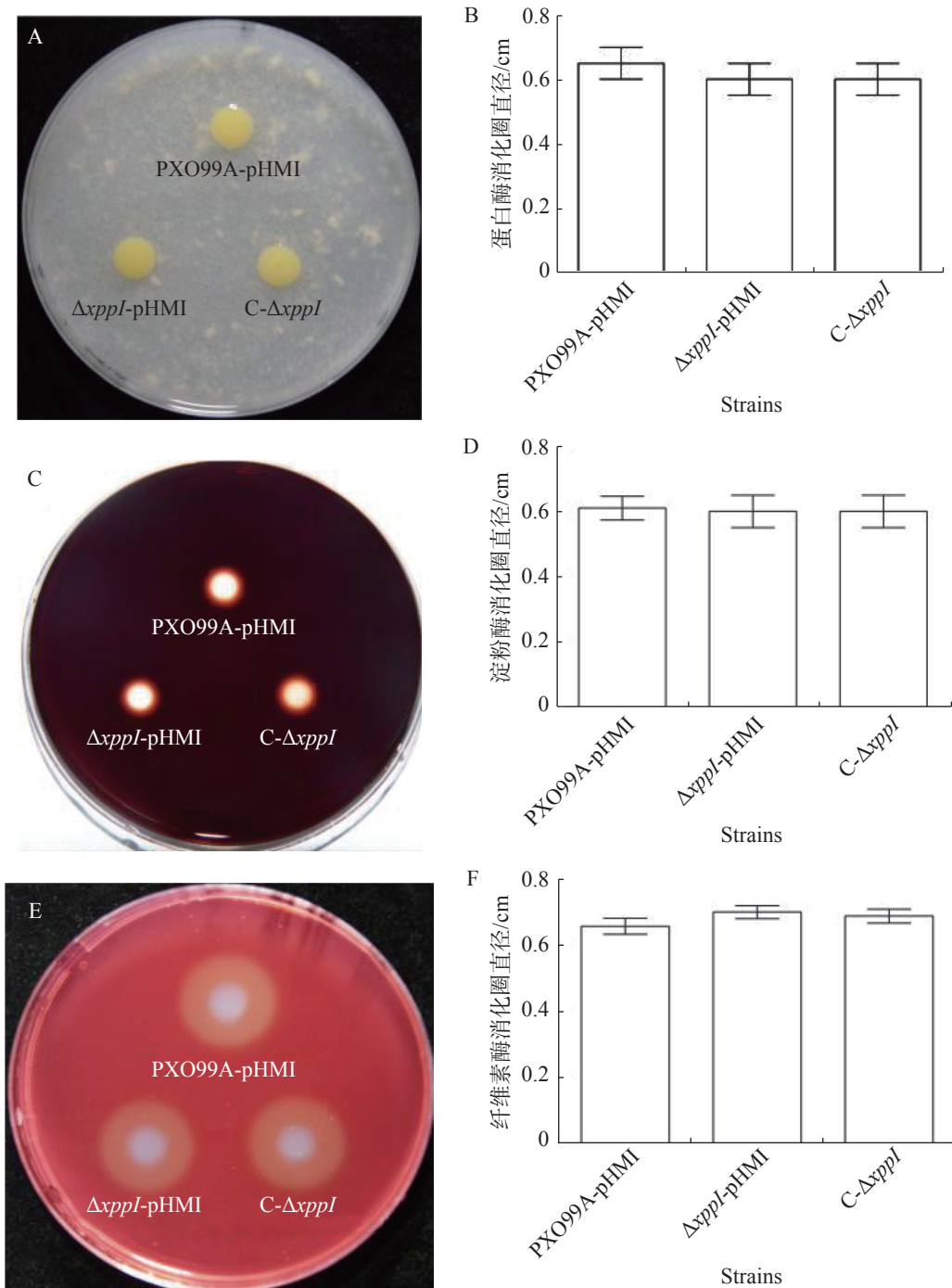


图 5 *xppI* 突变不影响多种胞外酶的活性

平板法检测蛋白酶(A)、淀粉酶(C)和纤维素酶(E)活性;在 B、D 和 F 中的消化圈直径分别体现了蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性。

植物的生长和免疫方面均具有重要作用,植物在病原菌入侵的质膜附近会产生高浓度的 ROS 来毒害病原菌,并引发一系列防御反应,同时病原菌也进化出了降解酶来降低高浓度活性氧的影响^[32]。为探究 XppI 是否参与氧化胁迫响应,分别用 0、80、100、120 mmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 处理菌液,观察生

长情况。随着 H₂O₂ 浓度的增强,野生型、突变体和互补菌株的抗氧化胁迫能力均呈现降低的趋势,但是突变 *xppI* 后抗氧化胁迫能力明显降低,互补 *xppI* 后抗氧化胁迫能力有所回升,但仍略低于野生型(图 6)。这说明 XppI 与病原菌的抗氧化胁迫响应有关。

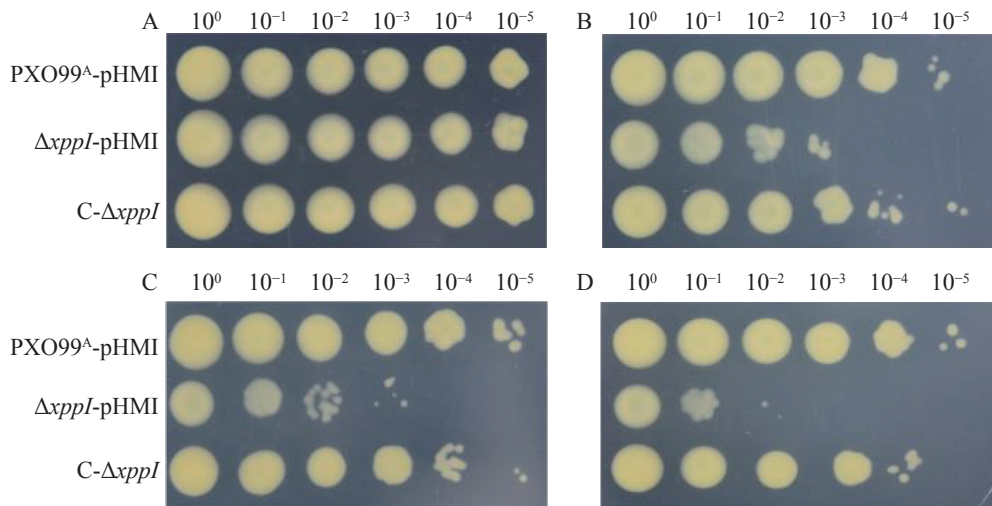


图6 *xppI* 突变降低 *Xoo* 抗氧化能力

ddH₂O(A)和 H₂O₂ 处理(B: 80 mmol·L⁻¹, C: 100 mmol·L⁻¹, D: 120 mmol·L⁻¹)菌株后的生长表型。

3 讨论

本研究旨在探究 XppI 在 *Xoo* 中的功能。通过生物信息学预测 XppI 为肽基脯氨酰顺反异构酶,并通过糜蛋白酶消化实验验证了 XppI 具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性(图 1)。在大肠杆菌中,肽基脯氨酰顺反异构酶 SlyD 影响双组份调控系统活性, *slyD* 缺失降低耐酸性和耐渗透压能力,从而降低了大肠杆菌对环境的适应能力^[33]。在酿酒酵母中,肽基脯氨酰顺反异构酶 Fpr3 与蛋白磷酸酶 1 相互作用,影响酵母的生长速率^[34]。在人细胞中,肽基脯氨酰顺反异构酶 Pin1 是糖尿病血管疾病关键通路的共同激活因子,可通过诱导促氧化适配器 p66 的线粒体易位引起线粒体氧化应激,并参与 p66 依赖的 ROS 产生,触发有害途径并导致血管并发症^[35]。在 *Xcc8004* 中,肽基脯氨酰顺反异构酶 Mip_{Xcc} 是周质折叠因子,负责胞外蛋白酶 PrtA 的正确折叠,突变 *mip_{Xcc}* 后 *Xcc* 几乎丧失胞外蛋白酶^[36]。此外,延伸因子 LepA 也具有脯氨酰异构酶活性,通过异构化核糖体 L11 蛋白、促进 GTP 的水解^[37]。肽基脯氨酰顺反异构酶的调控功能多样,在细菌生长、抗胁迫、抗氧化和胞外酶合成等方面发挥重要作用。

为探究 *Xoo* 中肽基脯氨酰顺反异构酶 XppI 的具体功能,本研究从细菌的生长、胞外酶活性、抗氧化能力等方面进行了研究,发现 *xppI* 基因缺失对于菌体本身的生长、运动性和胞外酶活性无显著影响(图 2,图 4 和图 5),与 *Xcc* 和酵母中

的表型不同^[35-36],表明不同 PPIases 可能调控不同蛋白的构型变化进而调控不同的细胞活动。*xppI* 缺失导致 *Xoo* 抗氧化胁迫能力的降低(图 6),降低 *Xoo* 的致病力(图 3),这与 Pin 的功能类似^[35]。因此, XppI 可能通过其 PPIase 活性、调控 *Xoo* 响应宿主活性氧胁迫,从而间接调控 *Xoo* 的致病力。

在植物与病原微生物互作的过程中,植物的免疫系统会响应被入侵部位的活性氧信号,来抑制病原菌的入侵;与此同时植物病原菌需要清除活性氧,来破坏植物防卫反应的信号传递并降低活性氧对自身的毒害作用^[38]。活性氧的清除主要依靠超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等清除酶的作用, XppI 可能直接或间接调控这些酶的活性。下一步将寻找 XppI 的作用靶标,明确 XppI 的具体调控通路及作用机制。

参考文献:

- [1] LONG J Y, SONG C F, YAN F, et al. Non-TAL effectors from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suppress peptidoglycan-triggered MAPK activation in rice [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1857.
- [2] 朱镜璇. 分子动力学模拟结合深度学习探究氨基酸突变或配体结合对酶活性的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [3] 于淑惠. 顺式肽键发生机制及其模式蛋白功能效应研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2020.
- [4] REIN T. Peptidylprolylisomerases, protein folders, or scaffolders? The example of FKBP51 and FKBP52 [J]. *BioEssays*, 2020, 42(7): e1900250.
- [5] ANCHAL, KAUSHIK V, GOEL M. Distribution of pep-

- tidyl-prolyl isomerase (PPIase) in the *Archaea* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 751049.
- [6] 刘琳. 拟南芥叶绿体 PPIase 突变体的创建及表型初步分析[D]. 西安: 西北大学, 2020.
- [7] KUMAWAT M, SINGH R, KARUNA I, et al. *Salmonella Typhimurium* peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C (PPIase C) plays a substantial role in protein folding to maintain the protein structure [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2020, 36(11): 168.
- [8] WOJTKIEWICZ P, BIERNACKA D, GORZELAK P, et al. Multicopy suppressor analysis of strains lacking cytoplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerases identifies three new PPIase activities in *Escherichia coli* that includes the DksA transcription factor [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(16): 5843.
- [9] DENIC M, TURLIN E, MICHEL V, et al. A novel mode of control of nickel uptake by a multifunctional metallochaperone [J]. *PLOS Pathogens*, 2021, 17(1): e1009193.
- [10] RAMADORI G, IORIS R M, VILLANYI Z, et al. FKBP10 regulates protein translation to sustain lung cancer growth [J]. *Cell Reports*, 2020, 30(11): 3851 – 3863.
- [11] 乔晓亚. Pin1 结构、稳定性及与磷酸化蛋白相互作用的核磁共振研究[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2017.
- [12] KATSUHIKO T, TAKAFUMI U, NOBUAKI H, et al. L-balanine inhibits the catalytic activity of Pin1, a peptidyl prolyl cis/trans-isomerase [J]. *Personalized Medicine Universe*, 2020, 9: 51 – 58.
- [13] BORN A, SOETBEER J, HENEN M A, et al. Ligand-specific conformational change drives interdomain allostery in Pin1 [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 4546.
- [14] SIMÓN SERRANO S, TAVECCHIO M, MALLIK J, et al. Synergistic effects of sangliferin-based cyclophilin inhibitor NV651 with cisplatin in *Hepatocellular carcinoma* [J]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4553.
- [15] SENGUPTA A, ROGNONI L E, MERKEL U, et al. SlyD accelerates trans-to-cis prolyl isomerization in a mechanosignaling protein under load [J]. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 2021, 125(31): 8712 – 8721.
- [16] LAKHANPAL S, FAN J S, LUAN S, et al. Structural and functional analyses of the PPIase domain of *Arabidopsis thaliana* CYP71 reveal its catalytic activity toward histone H3 [J]. *FEBS Letters*, 2021, 595(1): 145 – 154.
- [17] KOYANAGI T, HARA A, KOBAYASHI K, et al. *Thermococcus* sp. KS-1 PPIase as a fusion partner improving soluble production of aromatic amino acid decarboxylase[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1):178.
- [18] ZHU W, XU L Q, YU X X, et al. The immunophilin CYCLOPHILIN28 affects PSII-LHCII super complex assembly and accumulation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(4): 915 – 929.
- [19] DOMINGUES M N, DE CAMPOS B M, DE OLIVEIRA M L P, et al. TAL effectors target the C-terminal domain of RNA polymerase II (CTD) by inhibiting the prolyl-isomerase activity of a CTD-associated cyclophilin [J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(7): e41553.
- [20] HOPKINS C M, WHITE F F, CHOI S H, et al. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1992, 5(6): 451 – 459.
- [21] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69 – 73.
- [22] HUYNH T V, DAHLBECK D, STASKAWICZ B J. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity [J]. *Science*, 1989, 245(4924): 1374 – 1377.
- [23] SAMBROOK J, FRITSCH E R, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.) [D]. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [24] IKURA T, ITO N. Requirements for peptidyl-prolyl isomerization activity: a comprehensive mutational analysis of the substrate-binding cavity of FK506-binding protein 12 [J]. *Protein Science: a publication of the Protein Society*, 2007, 16(12): 2618 – 2625.
- [25] LI R, WANG S, SUN R, et al. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* type III effector PthXo3JXOV suppresses innate immunity, induces susceptibility and binds to multiple targets in rice [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(7): 4919724.
- [26] 韦梅良. 用野油菜黄单胞菌插入突变体库筛选与胞外蛋白酶产生相关的基因[D]. 南宁: 广西大学, 2002.
- [27] DILUZIO W R, TURNER L, MAYER M, et al. *Escherichia coli* swim on the right-hand side [J]. *Nature*, 2005, 435(7046): 1271 – 1274.
- [28] PENNISI A M, ABENAVOLI M R, MAIMONE B, et al. *In planta* and *in vitro* [J]. *Plant Protection Science*, 2002, 38(11): 461 – 465.
- [29] WADHWAN, BERG H C. Bacterial motility: machinery and mechanisms [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(3): 161 – 173.
- [30] MOREIRA C G, WEINSHENKER D, SPERANDIO V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* virulence *in vitro* and *in vivo* [J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(3): 914 – 926.
- [31] 陈小云. 柑橘溃疡病菌致病相关基因生物学功能分析及 XAC1992 互作蛋白的初步筛选[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [32] 王艳丽. 水稻白叶枯病菌 *oxyR/ahpF/ahpC* 基因簇在过氧化氢 (H₂O₂) 抗性和毒性中的功能分析[D]. 北京:

- 中国农业科学院, 2012.
- [33] 周薇, 刘松艳, 王曼宇, 等. 大肠杆菌肽基脯氨酰顺反异构酶 *slyD* 基因缺失株的构建及生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(1): 6–10.
- [34] 伍翔. 亲免疫蛋白 Fpr3 的表达、纯化及多克隆抗体的制备[D]. 武汉: 华中师范大学, 2009.
- [35] PANENI F, COSTANTINO S, CASTELLO L, et al. Targeting prolyl-isomerase Pin1 prevents mitochondrial oxidative stress and vascular dysfunction: insights in patients with diabetes [J]. *European Heart Journal.*, 2015, 36: 817–828.
- [36] 蒙青林. MipXcc 蛋白对十字花科黑腐病菌胞外蛋白酶活性的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2011.
- [37] 王莉. LepA 调节蛋白翻译的机理研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2010.
- [38] 田婷婷. 马铃薯晚疫病原菌对 H₂O₂ 胁迫响应的机制研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2020.

A putative mechanism underlining regulation of the virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by XppI

YU Yanyan, XIA Yingying, WU Kejian, ZHAN Zhaohong, TAO Jun

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources/ College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: In order to uncover the roles of *Xanthomonas* peptidyl-prolyl isomerase (XppI) in the interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) and rice, we detected the isomerase activity of XppI *in vitro*, constructed the mutant and complementary strains of XppI by homologous recombination method, and analyzed the roles of XppI in growth, pathogenicity, extracellular enzyme activity and antioxidant ability of *Xoo*. The results showed that XppI had peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity, and positively regulated the virulence and antioxidant ability of *Xoo*, but did not affect the growth and extracellular enzyme activities, which indicates that XppI may affect the ability of the causal agent *Xoo* to cope with oxygen stress in the host by regulating the conformation of antioxidation-related pathway proteins, thus enhancing the *Xoo* virulence.

Keywords: *Xanthomonas oryzae*; PPIase; virulence; antioxidant stress

(责任编辑: 潘学峰)