Chinese Journal of Biotechnology
CSTR: 32114.14.j.cjb.240231
DOI: 10.13345/j.cjb.240231
Feb. 25, 2025, 41(2): 670-679
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 增强烟草抗病性

任茜薇[1]，兰胡娇[1]，刘天瑶[1]，赵焕停[1]，赵雅婷[1]，张蕊[1]，刘建中[1,2*]

1 浙江师范大学 生命科学学院，浙江 金华 321004
2 浙江师范大学 生命科学学院 浙江省特色经济植物生物技术重点实验室，浙江 金华 321004

任茜薇，兰胡娇，刘天瑶，赵焕停，赵雅婷，张蕊，刘建中. 部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 增强烟草抗病性[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 670-679.
REN Qianwei, LAN Hujiao, LIU Tianyao, ZHAO Huanting, ZHAO Yating, ZHANG Rui, LIU Jianzhong. Partial knockout of *NtPDK1a/1b/1c/1d* enhances the disease resistance of *Nicotiana tabacum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 670-679.

摘　要：真核细胞 AGC 蛋白激酶家族(AGC kinase family)参与调控多种生物学过程。3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1)是一种保守的丝氨酸/苏氨酸激酶。为了研究 *PDK1* 同源基因在四倍体烟草免疫中的作用，对前期获得的同时敲除 4 个 *NtPDK1* 同源基因中 5–7 个等位基因的 CRISPR/Cas9 转基因株系进行了细胞死亡及抗病性分析，结果发现，部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 虽然可延迟瞬时过表达激活态 Pto (active Pto, Pto^{Y207D})及大豆 *Gm*MEKK1 诱导的超敏反应(hypersensitive response, HR)细胞死亡，但可显著增强烟草对假单胞杆菌(*Pseudomonas syrangae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC3000)以及烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的抗性，而该抗性的增强与 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系中 *Nt*MPK6、*Nt*MPK3 和 *Nt*MPK4 激活程度的显著增强相关联。综上所述，本研究结果表明 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 正向调控细胞死亡，但却可能通过抑制 MAPK 途径的激活而负向调控烟草免疫反应。

关键词：AGC 激酶；*NtPDK1*；CRISPR/Cas9 技术；植物免疫；烟草

资助项目：国家自然科学基金(32170761, 31571423)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170761, 31571423).
*Corresponding author. E-mail: jzliu@zjnu.cn
Received: 2024-03-15; Accepted: 2024-05-14; Published online: 2024-05-16

Partial knockout of *NtPDK1a/1b/1c/1d* enhances the disease resistance of *Nicotiana tabacum*

REN Qianwei[1], LAN Hujiao[1], LIU Tianyao[1], ZHAO Huanting[1], ZHAO Yating[1], ZHANG Rui[1], LIU Jianzhong[1,2*]

1 College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China
2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biotechnology on Specialty Economic Plants, College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: The protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C-family (AGC kinase family) of eukaryotes is involved in regulating numerous biological processes. The 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), is a conserved serine/threonine kinase in eukaryotes. To understand the roles of *PDK1* homologous genes in cell death and immunity in tetraploid *Nicotiana tabacum*, the previuosly generated transgenic CRISPR/Cas9 lines, in which 5–7 alleles of the 4 homologous *PDK1* genes (*NtPDK1a/1b/1c/1d* homologs) simultaneously knocked out, were used in this study. Our results showed that the hypersensitive response (HR) triggered by transient overexpression of active Pto (Pto^{Y207D}) or soybean *Gm*MEKK1 was significantly delayed, whereas the resistance to *Pseudomonas syrangae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) and tobacco mosaic virus (TMV) was significantly elevated in these partial knockout lines. The elevated resistance to *Pst* DC3000 and TMV was correlated with the elevated activation of *Nt*MPK6, *Nt*MPK3, and *Nt*MPK4. Taken together, our results indicated that *NtPDK*1s play a positive role in cell death but a positive role in disease resistance, likely through negative regulation of the MAPK signaling cascade.
Keywords: AGC kinase; *NtPDK1*; CRISPR/Cas9 technology; plant immunity; tobacco

磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1)是真核生物中一个保守的丝氨酸/苏氨酸激酶，作为上游主要调控者通过磷酸化激活下游众多 AGC [cAMP dependent (PKA) and cGMP-dependent protein kinases (PKG) and protein kinase C (PKC)]蛋白激酶[1]。PDK1 一般包含 1 个 N 端激酶结构域、1 个负责与 AGC 激酶互作的 PIF (PDK1-interacting fragment)结合袋以及 C 端 1 个负责将其招募至膜上的普列克底物同源蛋白(pleckstrin homology, PH)结构域[2-4]。哺乳动物中 PDK1 可被在植物中检测不到的 PtdIns(3,4,5)P_3 [phosphatidylinositol (3,4,5)P3]所激活。而拟南芥中的 PDK1 可被磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和各种磷脂所激活[5]。在酵母、果蝇、小鼠与番茄中，PDK1 功能完全丧失会导致致死效应[6-8]，而在弱突变体中表现为个体变小[9-10]，说明 PDK1 同源蛋白在上述物种的生长与发育中起着至关重要的作用。

拟南芥基因组中有 2 个 *PDK*1 编码基因，起初分别命名为 *AtPDK1.1* (GenBank 登录号：At5g04510)和 *AtPDK1.2* (GenBank 登录号：At3g10540)，随后命名为 *PDK1* 和 *PDK2*[11]。*PDK1* 和 *PDK2* T-DNA 插入双突变体株系 *pdk1pdk2* 仅表现出弱发育缺陷[12-13]。最新研究表明，先前报道的 *pdk1pdk2* 双突变体并不是完全功能丧失的突变体[11,14]。最新鉴定出的 *PDK1* 与 *PDK2* 的 T-DNA 插入双突变体[14]以及 *PDK1* 为 CRISPR/Cas9 敲除，*PDK2* 为 T-DNA 插入的双突

变体株系[11]均表现出强烈的生长素相关的发育缺陷。PDK1 通过磷酸化而激活与短根相关的蛋白激酶(protein kinase associated with brevis radix, PAX)和 D6 蛋白激酶(D6 protein kinase, D6PK)，而非通过激活 PID (PINOID)而参与生长素相关的生长与发育[11,14]。

植物中 PDK1 不仅参与生长发育，还参与细胞死亡及免疫的调控。沉默番茄 AGC 家族成员 *Adi3* 导致植株叶片上出现自发性细胞死亡并伴随抗性增强，表明 Adi3 是番茄免疫反应中的负调控因子。而番茄 *Sl*PDK1 则通过磷酸化 Adi3 中的 Ser539 激活 Adi3，从而导致细胞死亡[8,15]。在拟南芥中，*At*OXI1-*At*Pti1-4 信号通路可以调控 MAPKs 和/或被 MAPKs 调控。*At*OXI1 作为 AGC 激酶的典型代表，其活性受 *At*PDK1 调节，且 PA 以 *At*PDK1 依赖的方式激活 *At*OXI1[16-18]。在水稻中，*Os*PDK1 和 *Os*OXI1 可被几丁质和 H_2O_2 激活，因此，与拟南芥中的 *At*OXI1 类似，*Os*PDK1 和 *Os*OXI1 可被病原物相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)信号激活进而调控水稻的免疫反应[19]。PDK1 在免疫反应中作用也有相反的报道，在本生烟(*Nicotiana benthamiana*)中同时沉默 4 个 *NbPDK*s 同源基因可减弱细菌效应子诱导的细胞死亡，并导致对青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)抗性的降低[20]。这些结果说明 *NbPDKs* 可能通过激素途径及活性氧迸发调控效应子触发的免疫(effector-triggered immunity, ETI)相关的超敏反应(hypersensitive response, HR)细胞死亡，并且 PDK1 在不同种植物中调控细胞死亡方面具有功能差异。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术构建出同时敲除烟草 4 个 *NtPDK1* 同源基因(*NtPDK1a*/*1b*/*1c*/*1d*)中 5–7 个等位基因的突变株系[21]，以此突变体株系为材料证明了 *NtPDK*1s 正调控细胞死亡，但可能通过抑制 MAPK 激酶途径负调控烟草的抗病性。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草材料为携带烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)抗性基因 *N* 的三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *NN*)，由加州大学伯克利分校的 Barbara Baker 教授提供。烟草的生长在培养室，温度为 22 ℃，光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。

菌种：假单胞杆菌(*Pseudomonas syrangae* pv. *tomato*, *Pst*) DC3000、TMV-GFP 以及农杆菌菌株 GV3101，均由 Iowa State University 的 Steven Whitham 教授提供。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌介导的瞬时表达

将携带 *35S*::*GmMEKK1*[22]与 *35S*::*Pto*^{Y207D}[23]的农杆菌菌株 GV3101 (OD_{600}=1)按 Liu 等[24]所描述的方法注射到生长 45 d 烟草植株的叶片上(顶部下第 3–4 位叶)以诱导细胞死亡。

1.2.2 接种 *Pst* DC3000

Pst DC3000 的培养、接菌、取样以及菌落计数均按已发表文献中的方法[25-27]进行。用注射法对生长 35 d 的野生型与敲除株系叶片(顶部下第 3 位叶)接种低浓度(OD_{600}=10^{-4})的 *Pst* DC3000。接菌 0 d 和 3 d 后分别进行菌落计数单位统计分析。

1.2.3 TMV-GFP 侵染导致 HR 细胞死亡斑大小的测量

TMV-GFP 的侵染、HR 细胞死亡斑大小的测量参考文献[26-27]中的方法进行。用 TMV-GFP 侵染叶片的提取汁液(sap)通过摩擦接种法进行侵染生长 45 d 烟草植株的叶片(顶部下第 3–4 位叶)。用 ImageJ 软件进行 HR 死亡斑直径的测量。

1.2.4 免疫印迹法分析检测磷酸化 *Gm*MPK3/6

烟草叶片中蛋白质的提取、电泳分离、转膜以及 Western blotting 参考文献[22,24]。所用抗体为 Phospho-p44/42 MAP Erk1/2 抗体(Cell Signaling Technology 公司)。从不同基因型叶片上打取的叶圆片置于湿润滤纸上在室温下静置 24 h 以去除伤害对激酶的激活效应，然后用 10 μmmol/L flg22 处理不同时间，最后提取蛋白用 phospho-p44/42 MAP Erk1/2 抗体进行激酶活性检测。

2 结果与分析

2.1 *NtPDK*1s 正调控 HR 细胞死亡

番茄 *Pto* 基因编码细胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，是最早从植物中克隆出的抗病 *R* 基因之一[27]。Pto 可识别 2 种病原体效应蛋白 AvrPto 或 AvrPtoB 而激活 R 蛋白 Prf 介导的 ETI，从而触发 HR[28]。Pto^{Y207D} 突变体为激活态 Pto，在无需识别 AvrPto 或 AvrPtoB 的情况下即可诱导 HR (约 2 d 后出现)。在植物叶片中瞬时过表达 *Gm*MEKK1 也可诱导 HR 细胞死亡(约 1.5 d 后出现)[22]。

为了检测烟草中部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 对细胞死亡的影响，通过农杆菌注射法在野生型与敲除植株叶片上瞬时表达 Pto^{Y207D} 与 *Gm*MEKK1。结果表明，*NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系叶片上 Pto^{Y207D} 与 *Gm*MEKK1 诱导的 HR 细胞死亡较对照叶片上显著延迟(图 1)，说明 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 具正向调控 HR 细胞死亡的效应。

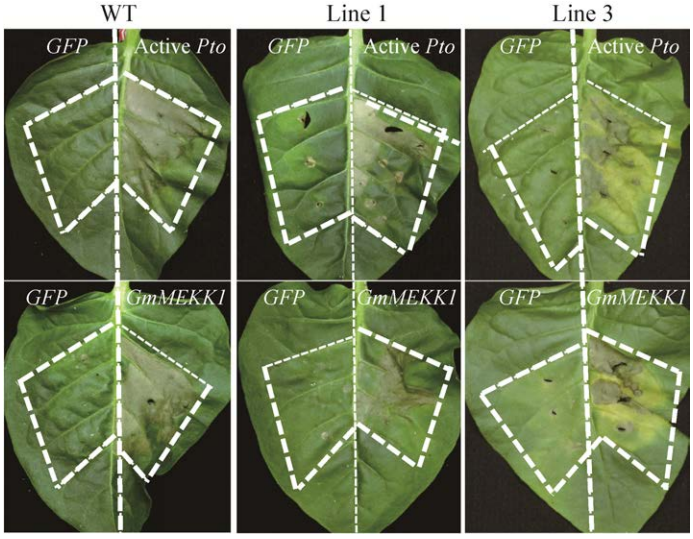

图 1 部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 延迟 Pto^{Y207D} 与 *Gm*MEKK1 诱导的 HR 细胞死亡 通过农杆菌注射法在 45 d 大小野生型与 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系对等叶片上(顶端下第 3–4 位叶)瞬时表达可诱导 HR 细胞死亡的 *35S::Pto*^{Y207D} 与 *35S::GmMEKK1*，同时注射 *35S::GFP* 作为阴性对照；虚线区域为注射区域；注射 4 d 后拍照。

Figure 1 The HR cell death induced by transiently over-expressing *35S::Pto*^{Y207D} and *35S::GmMEKK1* on the leaves of the partial knockout lines of *NtPDK1a/1b/1c/1d* is delayed relative to on the WT leaves. Agrobacterium strains carrying *35S::Pto*^{Y207D} and *35S::GmMEKK1* were infiltrated into the equivalent leaves of 45-day-old WT and the partial *NtPDK1a/1b/1c/1d* knockout plants (the 3rd and 4th leaves below the top), respectively; Agrobacterium strain carrying *35S::GFP* was infiltrated as a negative control; Infiltrated regions were dash lined; WT: Wild-type. The photos were taken at 4 days post infiltration.

2.2 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系对 *Pst* DC3000 的非寄主抗性增强

为了检测敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 对烟草抗病性的影响，首先将对照株与 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 敲除株叶片用注射法接种低浓度(调整细菌浓度 OD_{600}=0.1 后，稀释 1 000 倍配制成注射液)的 *Pst* DC3000。在接种 0 d 与 3 d 后进行细菌菌落形成单位(colony forming unit, CFU)统计。结果表明，*Pst* DC3000 在 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 植株叶片内的繁殖效率显著低于野生型叶片，说明部分敲除 *NtPDK11a/b/c/d* 导致烟草对 *Pst* DC3000 的非寄主抗性增强(图 2)。

2.3 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系对 TMV-GFP 的抗性增强

对野生型和 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 敲除突变株进行烟草花叶病毒的抗性比较。选用的烟草材料为三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun, NN)，该品种携带烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的抗性基因 *N*。接种 TMV 后，该品种烟草叶片会诱导强烈的 HR 细胞死亡，将 TMV 局限在侵染部位，防止病毒向邻近健康细胞扩散，从而达到抗病毒效果。HR 细胞死亡斑的大小可反映病毒繁殖与运动的程度，可作为抗性强弱的指标。通过摩擦法在野生型与敲除株系叶片上接种 TMV-GFP，5 d 后对叶片上的 HR 病斑拍照，进行台盼蓝染色后测量 HR 细胞死亡斑的直径。直径测量结果表明，*NtPDK1a/1b/1c/1d* 敲除突变株叶片上的 HR 区域显著小于野生型叶片上的 HR 区域(图 3A–3C)，说明敲除株系对 TMV 的抗性增强。为了证明这一点，对 TMV-GFP 在野生型与敲除株系上的转录水平进行了 RT-qPCR 分析比较，结果发现 2 个敲除株系叶片上 TMV-GFP 的转录水平显著低于在野生型叶片上的水平(图 3D)，证实敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 导致烟草对 TMV-GFP 的抗性增强。

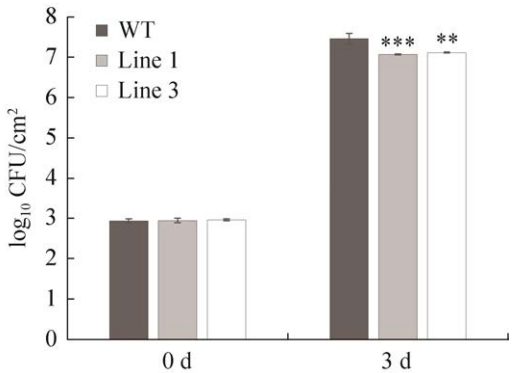

图 2 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 敲除株系对 *Pst* DC3000 的非寄主抗性增强 对野生型与敲除株系接种 *Pst* DC3000 后第 0 天和第 3 天进行菌落计数单位计数分析；*t* 检验，**与***分别代表不同株系间在 $P<0.01$ 与 $P<0.001$ 水平上达到显著差异；该结果重复 3 次，得到相似结果。

Figure 2 *NtPDK1a/1b/1c/1d* partial knocking out plants exhibit enhanced resistance to *Pst* DC3000 relative to WT plants. Colony forming units were calculated at 0 and 3 days post inoculation; Student's *t*-test, ** and *** represent significant difference at $P<0.01$ and $P<0.001$ level, respectively. This experiment was repeated three times with similar result.

2.4 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系中 flg22 诱导的 *Nt*MPK3/4/6 的激活程度增强

MAPK 级联途径在病原物相关分子模式触发免疫(PAMP-triggered immunity, PTI)信号转导中起着重要作用。植物质膜上受体激酶识别 PAMP 后激活 MAPK 级联途径，MAPK 级联途径通过磷酸化下游靶蛋白(如转录因子)而促进防御相关基因的表达，从而激活免疫反应[29-30]。另有大量研究表明 MAPK 途径也参与 R 蛋白诱导的 HR 细胞死亡[29-30]。由于 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系中 Pto^{Y207D} 及 *Gm*MEKK1 诱导的细胞死亡较对照延迟(图 1)，推测 flg22 诱导的 *Nt*MPK3/4/6 的激活程度可能也会减弱。

为了验证这一推测，对经不同时间 flg22 处理的野生型与 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 敲除株系叶

片中提取的蛋白样品用可特异性检测磷酸化态 *Nt*MPK3/4/6 的抗体 p44/42 MAP Erk1/2，通过 Western blotting 进行激酶磷酸化分析。与预测相反，*NtPDK1a/1b/1c/1d* 敲除株系中 flg22 诱导的 *Nt*MPK6、*Nt*MPK3 和 *Nt*MPK4 的激活程度较野生型显著增强(图 4)，表明部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 可增强 flg22 对 MAPK 激酶的激活程度，即 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 负调控 MAPK 级联反应的激活。说明 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系中 Pto^{Y207D} 与 *Gm*MEKK1 诱导的 HR 细胞死亡的延迟可能不依赖于 MAPK 途径(图 1)。设置 flg22 处理 10 min 的拟南芥 Col-0 对照是为了确定烟草中 MPK3、MPK4 及 MPK6 的对应位置。

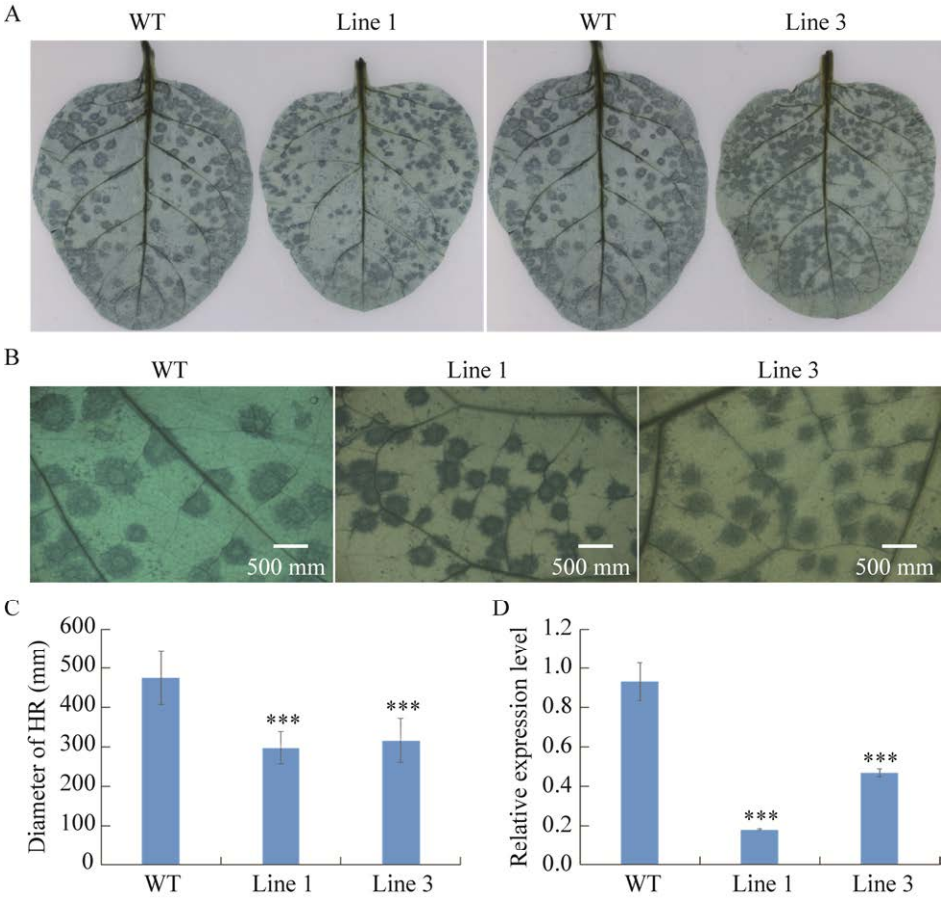

图 3　*NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系对 TMV-GFP 的抗性增强　A、B：TMV-GFP 侵染 5 d 后野生型与 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系上叶片上 HR 细胞死亡的台盼蓝染色，比例尺=500 mm。C：TMV-GFP 侵染 5 d 后 HR 细胞死亡斑直径测量结果。D：TMV-GFP 侵染 5 d 后病毒转录水平的 RT-qPCR 分析。*t* 检验，***P<0.001。该实验重复 3 次，得到相似结果。

Figure 3　Partially knocking out *NtPDK1a/1b/1c/1d* results in an enhanced resistance to TMV. A, B: Comparison of the HRs induced by TMV-GFP infection 5 days post infection visualized by trypan blue staining. C: Comparison of diameters of the HRs on the leaves of the knockout lines with those on the WT leaves induced 5 days post TMV-GFP infection. D: RT-qPCR analysis of the transcription level of TMV 5 days post TMV-GFP infection. Student's *t*-test, ***P<0.001. This experiment was repeated three times with similar result.

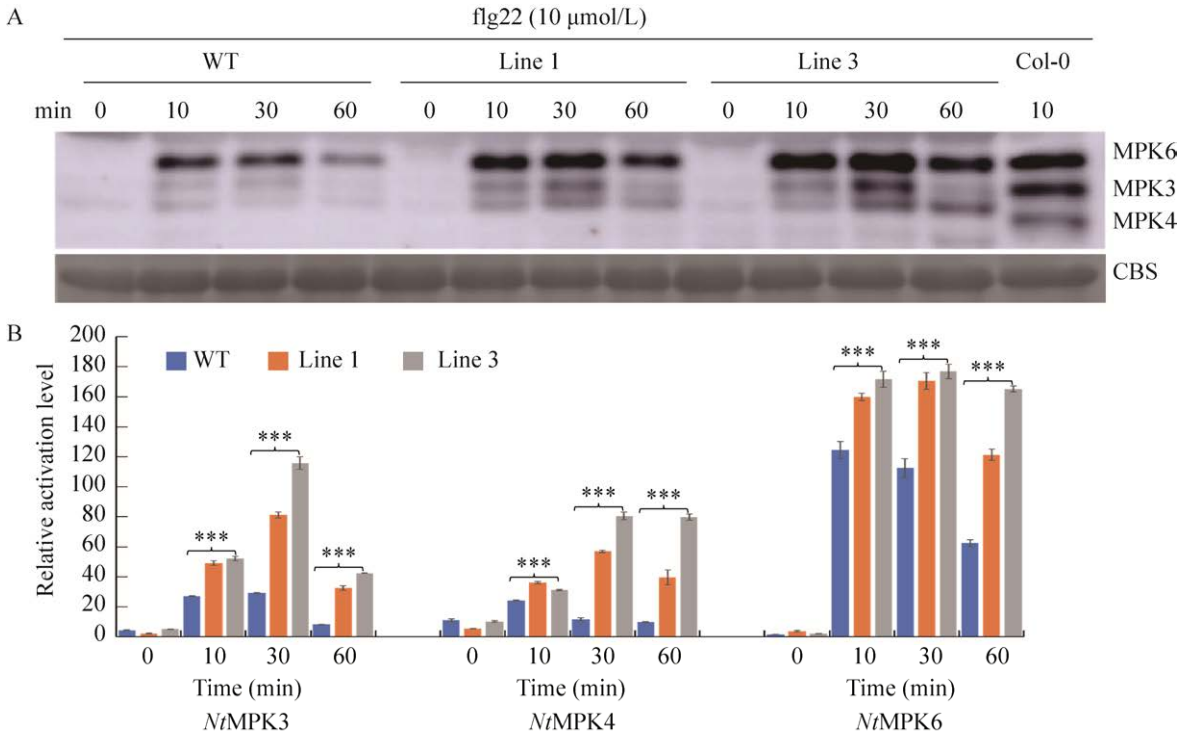

图 4 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系中 flg22 诱导的 *Nt*MPK3、*Nt*MPK4 和 *Nt*MPK6 的激活程度增强 A：用 phospho-p44/42 MAP Erk1/2 抗体分析 flg22 诱导的 *Nt*MPK3、*Nt*MPK4 和 *Nt*MPK6 的激活，拟南芥样品作为阳性对照。B：用 ImageJ 定量 A 中条带的强度比较，图中所示结果为 3 次重复的统计结果。WT：Wild-type；*t* 检验，***P<0.001。

Figure 4 The activation of *Nt*MPK3, *Nt*MPK4 and *Nt*MPK6 in response to flg22 is enhanced in *NtPDK1a/1b/1c/1d* partial knockout lines. A: The kinase activation of *Nt*MPK3, *Nt*MPK4 and *Nt*MPK6 in response to flg22 was detected by immunoblotting using phospho-p44/42 MAP Erk1/2 antibody. The *Arabidopsis* sample was used as a positive control. The results shown were average values of 3 replicates. B: The band intensities shown in A were quantified using ImageJ. WT: Wild-type; Student's *t*-test, ***P<0.001.

3 讨论与结论

在酵母、果蝇、小鼠与番茄中 PDK1 功能丧失具有致死效应[6-8]。但 PDK1 在植物细胞死亡中的功能却有着截然相反的报道。在番茄中，同时沉默 *PDK1* 与 *PDK2* 也会导致植株死亡，沉默 *PDK1* 下游 AGC 激酶 *Adi3* 也可诱导依赖于 MAPKKKα 的细胞死亡，说明 PDK1-Adi3 信号途径负调控番茄的细胞死亡[8]。一氧化氮(nitrate oxide, NO)可能通过特异性亚硝基化番茄 PDK1 中的第 128 位半胱氨酸残基(Cys^{128})来抑制 PDK1 的激酶活性，从而诱导细胞死亡[31]。在拟南芥中，PDK1 的功能丧失仅导致生长发育缺陷，并不致死[11,14]。利用病毒诱导的基因沉默技术在本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中同时沉默 4 个 NbPDKs 同源基因可导致病原菌侵染诱导的 HR 细胞死亡减弱[20], HR 细胞死亡的减弱与病原菌侵染所诱导的水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)以及 H_2O_2 积累水平的显著降低相关[20]，说明 *Nb*PDKs 可能通过调控植物激素途径及活性氧迸发而参与 HR 细胞死亡的调控。上述研究说明不同植物的

PDK1 同源蛋白在调控细胞死亡方面具显著的功能差异。

本课题组前期通过 CRISPR/Cas9 技术同时敲除烟草基因组中 4 个 *NtPDK1* 同源基因中的 6–7 个等位基因[21]，发现部分敲除株系叶片上 Pto^{Y207D} 与 *Gm*MEKK1 诱导的细胞死亡出现延迟(图 1)，说明烟草属中 PDK1 同源蛋白在调控细胞死亡方面的功能是保守的；同时也说明不同植物的 PDK1 同源蛋白在调控细胞死亡方面具有不同的效应。本研究未能获得同时敲除 4 个 *NtPDK1s* 全部 8 个等位基因的纯合株系，提示全部敲除 8 个等位基因可能致死[21]。

PA 及其他磷脂通过调控拟南芥 *At*PDK1 的活性而参与生物与非生物胁迫反应[5]。除了 PA，真菌的 PAMP 也可激活 *At*PDK1，说明 *At*PDK1 参与防御反应[18]。拟南芥 *At*PDK1 通过磷酸化 *At*Oxi1-*At*Pti1-2 激活防御反应[16,18]，水稻 *Os*PDK1 同样作用于 *Os*Oxi1-*Os*Pti1a 信号途径上游而参与水稻防御反应[19]。*At*OXI1 是 PDK1 下游的受 ROS 调控的 AGC 激酶，*At*OXI1 的激活是拟南芥活性氧迸发(oxidative burst)所必需的[16-19]。*At*OXI1 通过调控 ROS 的合成参与对霜霉菌(*Peronospora parasitica*)的基础抗性[16,18]。*Os*PDK1 与 *Os*Oxi1 互作并磷酸化 *Os*Oxi1 的 Ser^{283}[19]。真菌的 PAMP 几丁质可迅速激活 *Os*PDK1 的激酶活性，说明其通过病原物的识别而参与防御反应的信号传导[19]。过表达 *Os*PDK1 增强水稻对真菌病害稻瘟病与细菌病害白叶枯的抗性，说明 *Os*PDK1 通过调控 *Os*Oxi1-*Os*Pti1a 的磷酸化而正向调控水稻的基础抗性[19]。与水稻中的结果相反，本研究发现在烟草中部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 导致对 *N* 基因介导的 TMV 的 ETI 与对 *Pst* DC3000 的非寄主抗性显著增强(图 2，图 3)，说明 PDK1 在不同植物中对抗病性有不同的调控作用。

拟南芥 *PDK1* 沉默植株中，真菌 PAMP 木聚糖酶(xylanase)诱导的 *At*MPK6 的激活减弱，而细菌 PAMP (flg22)诱导的 MPK6 的激活则不受影响，即前者依赖于 *At*PDK1，而后者则不依赖于 *At*PDK1[18]，说明真菌与细菌的 PAMP 通过不同的信号途径激活 *At*MPK6。*At*OXI 作用于 ROS 下游，但作用于 MAPK 途径上游；在氧化胁迫条件下，*At*OXI1 突变体中 *At*MPK3 和 *At*MPK6 的激活受损，说明 *At*OXI 为 *At*MPK3/*At*MPK6 激活的正调控因子[18]。由于 *At*PDK1 可激活 *At*OXI，推测 *At*PDK1 可通过激活 *At*OX1 来正向调控 *At*MPK3/*At*MPK6 的活性。但与此相反，本研究发现 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系中 flg22 诱导的 *Nt*MPK3/*Nt*MPK4/*Nt*MPK6 激活较对照植株显著增强(图 4)，说明烟草中 *Nt*PDK1a/1b/1c/1d 为 *Nt*MPK3/*Nt*MPK4/*Nt*MPK6 的负调控因子。*Nt*MPK3/*Nt*MPK4/*Nt*MPK6 的激活(图 4)可能是 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 部分敲除株系抗性增强(图 2)的原因之一。在番茄中沉默 *SlPDK1* 及 *SlAdi3* 所诱导的细胞死亡依赖于 *Sl*MAPKKKα 的功能[8]，说明 *Sl*PDK1 功能的丧失同样激活 MAPK 途径。在今后的研究中需要确定烟草中 MAPKKKα 的同源蛋白是否同样也是作用于 *Nt*MPK3/*Nt*MPK4/*Nt*MPK6 上游的激酶。

某一蛋白的功能丧失与过表达均可激活免疫反应并不罕见。有报道表明有些蛋白的表达水平或活性必须控制在一定的阈值范围内，高于或低于此阈值范围均可激活免疫反应[22,24,26,32-34]。其中 *Gm*MEKK1 与 *Gm*MPK6 均为激酶[22,24]；PDK1 可能也属此类蛋白，其表达或激活水平高于或低于某个阈值均可激活免疫反应。部分敲除 *NtPDK1a/1b/1c/1d* 导致 flg22 诱导的 *Nt*MPK3/*Nt*MPK4/*Nt*MPK6 激活的增强，说明 *Nt*PDK1 负调控 *Nt*MPK3/*Nt*MPK4/*Nt*MPK6 的活性。后续会通过互作研究与激酶分析确定该负

调控是直接效应还是间接效应，是否通过下游AGC激酶或下游靶蛋白发挥作用。综上所述，本研究结果表明*Nt*PDK1s为烟草细胞死亡的正调控因子，但却为烟草抗病性的负调控因子，其可能通过抑制MAPK激酶途径而负调控烟草的抗病性。

REFERENCES

[1] PEARCE LR, KOMANDER D, ALESSI DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, 11: 9-22.

[2] BIONDI RM, CHEUNG PC, CASAMAYOR A, DEAK M, CURRIE RA, ALESSI DR. Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(5): 979-988.

[3] MORA A, KOMANDER D, van AALTEN DMF, ALESSI DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2004, 15(2): 161-170.

[4] FRÖDIN M, ANTAL TL, DÜMMLER BA, JENSEN CJ, DEAK M, GAMMELTOFT S, BIONDI RM. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(20): 5396-5407.

[5] DEAK M, CASAMAYOR A, CURRIE RA, DOWNES CP, ALESSI DR. Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain[J]. FEBS Letters, 1999, 451(3): 220-226.

[6] CASAMAYOR A, TORRANCE PD, KOBAYASHI T, THORNER J, ALESSI DR. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast[J]. Current Biology, 1999, 9(4): 186-197.

[7] NIEDERBERGER C, SCHWEINGRUBER ME. A *Schizosaccharomyces pombe* gene, *ksg1*, that shows structural homology to the human phosphoinositide-dependent protein kinase PDK1, is essential for growth, mating and sporulation[J]. Molecular and General Genetics, 1999, 261(1): 177-183.

[8] DEVARENNE TP, EKENGREN SK, PEDLEY KF, MARTIN GB. Adi3 is a Pdk1-interacting AGC kinase that negatively regulates plant cell death[J]. The EMBO Journal, 2006, 25(1): 255-265.

[9] LAWLOR MA, MORA A, ASHBY PR, WILLIAMS MR, MURRAY-TAIT V, MALONE L, PRESCOTT AR, LUCOCQ JM, ALESSI DR. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(14): 3728-3738.

[10] RINTELEN F, STOCKER H, THOMAS G, HAFEN E. PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(26): 15020-15025.

[11] XIAO Y, OFFRINGA R. PDK1 regulates auxin transport and *Arabidopsis* vascular development through AGC1 kinase PAX[J]. Nature Plants, 2020, 6: 544-555.

[12] CAMEHL I, DRZEWIECKI C, VADASSERY J, SHAHOLLARI B, SHERAMETI I, FORZANI C, MUNNIK T, HIRT H, OELMÜLLER R. The OXI1 kinase pathway mediates *Piriformospora indica*-induced growth promotion in *Arabidopsis*[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(5): e1002051.

[13] SCHOLZ S, PLEßMANN J, ENUGUTTI B, HÜTTL R, WASSMER K, SCHNEITZ K. The AGC protein kinase UNICORN controls planar growth by attenuating PDK1 in *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS Genetics, 2019, 15(2): e1007927.

[14] TAN ST, ZHANG XX, KONG W, YANG XL, MOLNÁR G, VONDRÁKOVÁ Z, FILEPOVÁ R, PETRÁŠEK J, FRIML J, XUE HW. The lipid code-dependent phosphoswitch PDK1–D6PK activates PIN-mediated auxin efflux in *Arabidopsis*[J]. Nature Plants, 2020, 6: 556-569.

[15] GRAY JW, NELSON DITTRICH AC, CHEN SX, AVILA J, GIAVALISCO P, DEVARENNE TP. Two Pdk1 phosphorylation sites on the plant cell death suppressor Adi3 contribute to substrate phosphorylation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1834(6): 1099-1106.

[16] RENTEL MC, LECOURIEUX D, OUAKED F, USHER SL, PETERSEN L, OKAMOTO H, KNIGHT H, PECK SC, GRIERSON CS, HIRT H, KNIGHT MR. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*[J]. Nature, 2004, 427: 858-861.

[17] ANTHONY RG, HENRIQUES R, HELFER A, MÉSZÁROS T, RIOS G, TESTERINK C, MUNNIK T, DEÁK M, KONCZ C, BÖGRE L. A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*[J]. The EMBO Journal, 2004, 23(3): 572-581.

[18] ANTHONY RG, KHAN S, COSTA J, PAIS MS, BÖGRE L. The *Arabidopsis* protein kinase PTI1-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXI1[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(49): 37536-37546.

[19] MATSUI H, MIYAO A, TAKAHASHI A, HIROCHIKA H. Pdk1 kinase regulates basal disease resistance through the OsOxi1–OsPti1a phosphorylation cascade in rice[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(12): 2082-2091.

[20] KIBA A, FUKUI K, MITANI M, GALIS I, HOJO Y, SHINYA T, OHNISHI K, HIKICHI Y. Silencing of phosphoinositide dependent protein kinase orthologs

reduces hypersensitive cell death in *Nicotiana benthamiana*[J]. Plant Biotechnology, 2020, 37(3): 363-367.

[21] REN QW, LIU TY, LAN HJ, LI ZC, HUANG MJ, ZHAO YT, CHEN Y, LIAO LN, MA XH, LIU JZ. Partially knocking out *NtPDK1a/1b/1c/1d* simultaneously in *Nicotiana tabacum* using CRISPR/CAS9 technology results in auxin-related developmental defects[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2024, 343: 112057.

[22] XU HY, ZHANG C, LI ZC, WANG ZR, JIANG XX, SHI YF, TIAN SN, BRAUN E, MEI Y, QIU WL, LI S, WANG B, XU J, NAVARRE D, REN DT, CHENG NH, NAKATA PA, GRAHAM MA, WHITHAM SA, LIU JZ. The MAPK kinase kinase *Gm*MEKK1 regulates cell death and defense responses[J]. Plant Physiology, 2018, 178(2): 907-922.

[23] RATHJEN JP, CHANG JH, STASKAWICZ BJ, MICHELMORE RW. Constitutively active *Pto* induces a *Prf*-dependent hypersensitive response in the absence of *avrPto*[J]. The EMBO Journal, 1999, 18(12): 3232-3240.

[24] LIU JZ, BRAUN E, QIU WL, SHI YF, MARCELINO-GUIMARÃES FC, NAVARRE D, HILL JH, WHITHAM SA. Positive and negative roles for soybean MPK6 in regulating defense responses[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(8): 824-834.

[25] TIAN SN, LIU DD, ZHONG CL, XU HY, YANG S, FANG Y, RAN J, LIU JZ. Silencing *GmFLS2* enhances the susceptibility of soybean to bacterial pathogen through attenuating the activation of *Gm*MAPK signaling pathway[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2020, 292: 110386.

[26] LI ZC, REN QW, GUO Y, RAN J, REN XT, WU NN, XU HY, LIU X, LIU JZ. Dual roles of GSNOR1 in cell death and immunity in tetraploid *Nicotiana tabacum*[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 596234.

[27] LI JM, YE MY, MA XH, WU NN, LIU JZ. Over-expression of soybean *Gm*SAUL1 enhances disease resistance in *Nicotiana tabacum*[J]. Agronomy, 2023, 13(6): 1533.

[28] MARTIN GB, BROMMONSCHENKEL SH, CHUNWONGSE J, FRARY A, GANAL MW, SPIVEY R, WU T, EARLE ED, TANKSLEY SD. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato[J]. Science, 1993, 262(5138): 1432-1436.

[29] TANG X, FREDERICK RD, ZHOU J, HALTERMAN DA, JIA Y, MARTIN GB. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and pto kinase[J]. Science, 1996, 274(5295): 2060-2063.

[30] MENG XZ, ZHANG SQ. MAPK cascades in plant disease resistance signaling[J]. Annual Review of Phytopathology, 2013, 51: 245-266.

[31] LIU JZ, DUAN JC, NI M, LIU Z, QIU WL, WHITHAM SA, QIAN WJ. *S*-nitrosylation inhibits the kinase activity of tomato phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(48): 19743-19751.

[32] LI JM, YE MY, WANG CF, MA XH, WU NN, ZHONG CL, ZHANG YJ, CHENG NH, NAKATA PA, ZENG LR, LIU JZ. Soybean *Gm*SAUL1, a bona fide U-box E3 ligase, negatively regulates immunity likely through repressing the activation of *Gm*MPK3[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(7): 6240.

[33] TONG M, KOTUR T, LIANG WW, VOGELMANN K, KLEINE T, LEISTER D, BRIESKE C, YANG SH, LÜDKE D, WIERMER M, ZHANG YL, LI X, HOTH S. E3 ligase SAUL1 serves as a positive regulator of PAMP-triggered immunity and its homeostasis is monitored by immune receptor SOC3[J]. The New Phytologist, 2017, 215(4): 1516-1532.

[34] LIANG WW, van WERSCH S, TONG M, LI X. TIR-NB-LRR immune receptor SOC3 pairs with truncated TIR-NB protein CHS1 or TN2 to monitor the homeostasis of E3 ligase SAUL1[J]. The New Phytologist, 2019, 221(4): 2054-2066.