

MARCO AURÉLIO FERREIRA

**COMUNICAÇÃO CRUZADA ENTRE IMUNIDADE ANTIVIRAL,
ANTIBACTERIANA E EVENTOS DE DESENVOLVIMENTO MEDIADOS PELOS
RECEPTORES NIK1, NIK2 E NIK3**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Elizabeth Pacheco B. Fontes

Coorientadores: Anésia Aparecida Santos
Christiane Eliza M. Duarte
Pedro Augusto B. dos Reis
Virgílio Adriano P. Loriato

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F383c
2021
Ferreira, Marco Aurélio, 1991-
Comunicação cruzada entre imunidade antiviral,
antibacteriana e eventos de desenvolvimento mediados pelos
receptores NIK1, NIK2 e NIK3 / Marco Aurélio Ferreira. –
Viçosa, MG, 2021.

105 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Reações cruzadas (Imunologia). 2. Anticorpos antivirais.
3. Antígenos de bactérias. 4. RNA-seq. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 571.96


MARCO AURÉLIO FERREIRA

**COMUNICAÇÃO CRUZADA ENTRE IMUNIDADE ANTIVIRAL,
ANTIBACTERIANA E EVENTOS DE DESENVOLVIMENTO MEDIADOS PELOS
RECEPTORES NIK1, NIK2 E NIK3**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de janeiro de 2021

Assentimento:



Marco Aurélio Ferreira
Autor



Elizabeth Pacheco Batista Fontes
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e saúde durante a realização deste trabalho.

Ao meu pai, minha mãe, meu irmão, irmãs e sobrinhos que sempre me animaram e encorajaram a continuar na árdua tarefa de concluir o doutorado em Bioquímica Aplicada, objetivo que sempre foi um sonho pra mim.

Agradeço à professora Elizabeth P. B. Fontes pela orientação, acolhimento e aprendizado nestes anos.

Aos colegas de laboratório que ajudaram nos experimentos, companheiros de disciplinas e estudos que tornaram essa trajetória mais leve e aprazível.

Aos amigos que estiveram sempre presentes e ofereceram conselhos em momentos difíceis ao longo destes anos em Viçosa.

Agradeço imensamente aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que sempre estiveram presentes no meu cotidiano e pude aprender muito com os anos de convivência e aulas no início do doutorado.

Aos membros da banca avaliadora deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de estudo e aprendizado que contribuíram muito para meu crescimento.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, e aos órgãos de financiamento de pesquisa FAPEMIG e CNPQ.

RESUMO

FERREIRA, Marco Aurélio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2021. **Comunicação cruzada entre imunidade antiviral, antibacteriana e eventos de desenvolvimento mediados pelos receptores NIK1, NIK2 e NIK3.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Anésia Aparecida dos Santos, Christiane Eliza Motta Duarte, Pedro Augusto Braga dos Reis e Virgílio Adriano Pereira Loriato.

As proteínas NIKs (*NSP- INTERACTING KINASE*), são LRR-LRKs (*leucine-rich repeat receptor-like kinase*) que se localizam na membrana plasmática e foram identificadas inicialmente por interagirem com a proteína NSP (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN*) de geminivírus. NIK1 pertence à subfamília II de LRR-RLKs, cujos membros contém cinco repetições de leucina no domínio extracelular, e forma um sub-grupo contendo NIK1, NIK2 e NIK3. NIK1 e NIK2 divergem quanto a funcionalidade e estrutura de NIK3, sendo NIK1 a mais bem caracterizada, atuando na imunidade antiviral. Recentemente, foi demonstrado por meio de análises cêntricas da rede de interações entre receptores LRR de membranas que NIK1 e NIK3 formam “hubs” com alto grau de centralidade e, portanto, presume-se que sejam altamente influentes como transmissores de informação nas células. Estas observações levantaram as hipóteses de que NIK1 e NIK3 pudessem estar envolvidos em diversas vias de sinalização celular. Assim sendo, o objetivo dessa investigação foi caracterizar o envolvimento de NIK1, NIK2 e NIK3 em vias de sinalização de defesa e desenvolvimento. Nós relatamos primeiro que NIK1, anteriormente mostrado como um regulador positivo da imunidade antiviral de plantas, atua como um regulador negativo da imunidade antibacteriana. NIK2 também demonstrou funcionar como um supressor de imunidade desencadeada por PAMP (PTI). Embora a inativação de NIK2 não tenha afetado à infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* (*Pst*) DC3000 e *P. Syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) ES4326, o mutante *nik2-1* mostrou ser mais suscetível ao crescimento de *Pst* DC3000 *hrcC*, o mutante de secreção não patogênico *Pst* DC3000 tipo III, demonstrando a modulação negativa de PTI por NIK2. A modulação negativa de PTI mediada por NIK1 foi mais forte do que NIK2. As plantas que são *nik1* nulo exibiram morfologia anã, maior resistência a doenças causadas pela bactéria *Pseudomonas Syringae* e respostas PTI aumentadas por flagelina bacteriana, que foram restaurados pela reintrodução de NIK1. De forma consistente, as linhagens de superexpressão de NIK1 exibiram um fenótipo oposto. Além disso, NIK1 regulou negativamente a formação do complexo FLS2 / BAK1 e respostas mediadas por flg22. As interações entre NIK1 e o receptor de flagelina FLS2 e o co-receptor BAK1 foram aumentadas após a percepção de flg22, revelando um novo

mecanismo regulador de PTI por um RLK. Além disso, a percepção de flg22 induziu a fosforilação de NIK1 e RLP10A *in vivo* e, por sua vez, ativou o ramo de controle de tradução a jusante da sinalização antiviral. O mecanismo subjacente proposto para a modulação inversa mediada por NIK1 da imunidade antiviral e antibacteriana pode permitir que bactérias e vírus ativem respostas imunes do hospedeiro uns contra os outros. Em relação ao NIK3, propusemos pesquisar seu envolvimento na defesa e no desenvolvimento examinando primeiro o transcriptoma induzido por NIK3. Também examinamos o efeito do tratamento com brassinosteróides na variação global da expressão gênica em linhas de superexpressão de NIK3. Os resultados dessas análises genômica funcional confirmaram que NIK3 pode estar envolvido na defesa e no desenvolvimento. NIK3 pode estar envolvido na sinalização de citocinina (CK) em vez da sinalização de BR. Em comparação com Col-0, BR induziu respostas semelhantes em linhagens de superexpressão de NIK3. No entanto, a superexpressão de NIK3 regulou negativamente nove genes envolvidos na percepção e homeostase de CK, incluindo dois receptores de CK, AHK4 e AHK5, duas proteínas de fosfotransferência de histidina (AHPs), AHP1 e AHP5, reguladores positivos da sinalização de CK que fosforilam as ARRs do tipo B (Regulador de resposta de Arabidopsis). ARR4 e ARR8 retransmitem o sinal de CK do citoplasma para o núcleo para induzir a expressão de genes. Como um regulador negativo da sinalização de CK ARR15, um ARR tipo B, foi induzido por NIK3. Os transportadores de purinas e derivados PUP1, PUP2 e PUP14 foram regulados negativamente por NIK3. O PUP14 é um regulador negativo da detecção de CK, pois transporta a CK do apoplasto para o citosol; assim, impedindo AHKs de detectar CK e iniciar a sinalização. Portanto, a superexpressão de NIK3 revelou a regulação de uma série de genes associados à sinalização de CK. Especificamente, os principais reguladores da percepção e sinalização de CK foram reprimidos pela superexpressão de NIK3, sugerindo que NIK3 pode controlar negativamente a sinalização de CK. A superexpressão do NIK3 também regulou negativamente os genes associados às respostas imunológicas. Estes incluem os PRR-RLKs, FLS2 e EFR, que reconhecem os PAMPs bacterianos fls2 e EF-Tu para iniciar PTI, MAPK e fatores de transcrição WRKYs, envolvidos nas respostas imunes. Da mesma forma, NIK3 regulou negativamente os genes R, RRS1 e RPM1, bem como FRK1, um modulador das respostas imunes. Apesar da regulação negativa dos genes de defesa mediada por NIK3, PTI não foi aparentemente afetado, uma vez que a infecção por *Pst* DC3000 e o crescimento em linhagens superexpressando NIK3 foram semelhantes a Col-0. Portanto, é razoável supor que NIK3 regule principalmente ETI. Coletivamente, esses resultados sugerem que NIK3 é predominantemente um regulador

negativo da sinalização e desenvolvimento, como na sinalização de CK, e da resposta imune, do tipo ETI.

Palavras-chave: Imunidade antiviral. Imunidade antibacteriana. Desenvolvimento. RNA-seq

ABSTRACT

FERREIRA, Marco Aurélio, D.Sc., Universidade Federal of Viçosa, January, 2021. **NIK1-, NIK2- and NIK3-mediated crosstalk among antiviral immunity, antibacterial immunity and developmental events**. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Anésia Aparecida dos Santos, Christiane Eliza Motta Duarte, Pedro Augusto Braga dos Reis and Virgílio Adriano Pereira Loriato.

NIKs [NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN (NSP)-INTERACTING KINASES] are plasma membrane-anchored LRR-LRKs (*leucine-rich repeat receptor-like kinases*), first identified by their capacity of interacting with the geminivirus NSP. NIK1 belongs to the subfamily II of LRR-RLKs, which comprises proteins with five leucine-rich repeats in the extracellular domain and form a sub-clade containing NIK1, NIK2, and NIK3. NIK1 and NIK2 diverge in function and structure from NIK3, and NIK1 is the best-characterized member, acting in antiviral immunity. Recently, centric analyses of the protein-protein interaction network of the cell surface LRR receptors have demonstrated that NIK1 and NIK3 form “hubs” with a high degree of centrality, and hence they may be considered highly influential spreaders of information in the cell. These findings raised the hypothesis that NIK1 and NIK3 would be involved in several distinct cell signaling pathways. In the current investigation, the possible involvement of NIK1, NIK2, and NIK3 in defense and developmental signaling pathways was examined. We report first that NIK1, which was previously shown to positively regulate plant antiviral immunity, acts as an essential negative regulator of antibacterial immunity. NIK2 was also demonstrated to function as a PAMP-triggered immunity (PTI) suppressor. Although inactivation of NIK2 did not affect infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 and *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) ES4326, the *nik2-1* mutant showed more susceptible to the *Pst* DC3000 *hrcC* growth, the nonpathogenic *Pst* DC3000 type III secretion mutant, demonstrating the negative modulation of PTI by NIK2. The NIK1-mediated negative modulation of PTI was stronger than NIK2. Plants that are *nik1* null exhibited dwarfed morphology, enhanced disease resistance to the bacteria *Pseudomonas syringae*, and enhanced bacterial flagellin-triggered PTI responses, which were restored by reintroduction of NIK1. Consistently, NIK1 overexpressing lines displayed an opposite phenotype. In addition, NIK1 negatively regulated the formation of the FLS2/BAK1 complex and flg22-mediated responses. The interactions between NIK1 and the flagellin receptor FLS2 and coreceptor BAK1 were enhanced upon flg22 perception, revealing a novel PTI regulatory mechanism by an RLK. Furthermore, flg22 perception induced NIK1 and RLP10A phosphorylation *in vivo* and, in turn,

activated the downstream translation control branch of antiviral signaling. The proposed underlying mechanism for NIK1-mediated inverse modulation of antiviral and antibacterial immunity may allow bacteria and viruses to activate host immune responses against each other. Concerning NIK3, we proposed to search for its involvement in defense and development by examining first the NIK3 induced transcriptome. We also examined the effect of brassinosteroid treatment on the global variation of gene expression in NIK3-overexpressing lines. The results of these functional genomic analyses confirmed that NIK3 might be involved in both defense and development. NIK3 may be involved in cytokinin (CK) signaling rather than BR signaling. As compared to Col-0, BR induced similar responses in NIK3-overexpressing lines. However, the NIK3 overexpression down-regulated nine genes involved in CK perception and homeostasis, including two CK receptors, AHK4 e AHK5, two histidine phosphotransfer proteins (AHPs), AHP1 and AHP5, positive regulators of CK signaling that phosphorylate the type B ARR (Arabidopsis response regulator). ARR4 and ARR8 relay the CK signal from the cytoplasm to the nucleus to induce gene expression. As a negative regulator of CK signaling ARR15, a type B ARR, was induced by NIK3. The purine transporters PUP1, PUP2 e PUP14 were down-regulated by NIK3. PUP14 is a negative regulator of CK sensing because it transports CK from the apoplast to the cytosol; thereby, preventing AHKs from sensing CK and initiating signaling. Therefore, the NIK3 overexpression uncovered the regulation of a series of CK signaling-associated genes. Specifically, key regulators of CK perception and signaling were suppressed by NIK3 overexpression, suggesting that NIK3 may negatively control CK signaling. The NIK3 overexpression also down-regulated genes associated with immune responses. These include the PRR-RLKs, *FLS2* and *EFR*, which recognize the bacterial PAMPs fls2 and EF-Tu to initiate PTI, MAPK, and transcriptional factors WRKYs, involved in immune responses. Likewise, NIK3 down-regulated the R genes, *RRS1* and *RPM1*, as well as *FRK1*, the modulator of immune responses. Despite the NIK3-mediated down-regulation of defense genes, PTI was not apparently affected because *Pst* DC3000 infection and growth in NIK3-overexpressing lines were similar to Col-0. Therefore, it is reasonable to suppose that NIK3 regulates mainly ETI. Collectively, these results suggest that NIK3 is predominantly a negative regulator of developmental signaling, as in CK signaling, and immune response, as in ETI.

Keywords: Antiviral immunity. Antibacterial immunity. Development. RNA-seq

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
CAPÍTULO I	20
CAPÍTULO II	32
CAPÍTULO III	59
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Material vegetal e obtenção de linhagens transgênicas	68
2.2 Crescimento de raiz e hipocótilo	68
2.3 Alongamento de pecíolo	69
2.4 Extração de proteínas, imunoprecipitação de NIK3-GFP e <i>western blot</i>	69
2.5 Quantificação de zeatina	70
2.6 Extração de RNA e preparo de cDNA	71
2.7 Análises de qRT-PCR	71
2.8 Sequenciamento de RNA (Seq), plataforma illumina Hi-Seq 2000	72
2.9 Análises de bioinformática	72
3. RESULTADOS	74
3.1 NIK3 regula processos de crescimento e desenvolvimento não relacionados com brassinosteróides	74
3.2 Genes relacionados com a percepção e indução de PTI e ETI foram reprimidos pela superexpressão de NIK3	84
4. DISCUSSÃO	88
4.1 NIK3 regula negativamente genes envolvidos na síntese, percepção e resposta a citocininas	88
4.2 NIK3 regula negativamente a via de percepção e resposta contra patógenos	93
5. CONCLUSÃO	97
6. REFERÊNCIAS	99

INTRODUÇÃO GERAL

Similarmente aos seres humanos que possuem um sistema imunológico de defesa contra micróbios patogênicos, as plantas também possuem um sistema imune que as defende contra o ataque de patógenos causadores de doenças. O sistema imune dos vegetais é dividido em duas barreiras de defesa, PTI (*PAMP-triggered immunity*), resposta essa desencadeada por receptores localizados na membrana plasmática denominados receptores que reconhecem padrões (PRR) e ETI (*Effector-triggered immunity*), representada por receptores intracelulares que reconhecem especificamente proteínas efetores dos patógenos. Receptores PRRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e sinalizam para o início de uma resposta imune que induz modificações na expressão gênica e combate patógenos de uma forma menos específica, a qual pode ser contornada por estratégias co-evolutivas do organismo invasor (Bigeard et al., 2015; Ma et al., 2016). A segunda barreira imunológica das plantas é designada ETI (*Effector-triggered immunity*), sendo iniciada por proteínas intracelulares, designadas proteínas de resistência (R), que reconhecem, direta ou indiretamente, efetores de virulência de patógenos altamente variáveis (Avr), resultando no início da imunidade desencadeada por efetores (ETI). Uma resposta imune do tipo ETI geralmente induz a morte celular programada no local da infecção do patógeno para evitar que o mesmo se espalhe para tecidos não infectados (Jones e Dangl, 2006). A ativação de ETI também estimula a produção de algumas moléculas que ativam a sinalização de defesa nos tecidos não infectados distais da infecção, conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR) (Calil & Fontes 2017).

Estas duas barreiras do sistema imune dos vegetais, coletivamente, combatem infecções e doenças provocadas por diversos patógenos bacterianos, fúngicos, nematoides e até contra o ataque de herbívoros (Tsuda & Katagiri, 2010; Smant & Jones, 2011; Erb et al., 2012). Com relação à defesa contra patógenos virais, o mecanismo de defesa do tipo ETI tem sido por muito tempo reconhecido como uma resposta efetiva contra diversos vírus de plantas (Gouveia et al., 2017). De fato, o primeiro gene R (resistência) identificado foi o gene N (*necrotic-type*) de tabaco que codifica uma proteína de resistência TIR-NB-LRR [Toll/interleukin 1 receptor-like (TIR), *nucleotide binding* (NB) *leucine-rich repeat* (LRR)] que interage especificamente com a proteína replicase (fator de avirulência, Avr) de TMV (*Tobacco mosaic virus*) para ativar ETI em genótipos resistentes ao vírus (Holmes, 1938; Whitham et al., 1994). Desde então, uma lista crescente de genes de resistência que especificamente reconhecem genes de avirulência de vírus tem sido elaborada (Gouveia et al., 2017). Muito menos entendido é o mecanismo de ativação

de PTI contra patógenos virais. Sabe-se que as infecções por alguns vírus podem ativar respostas similares às respostas imunes resultantes da ativação de PTI, no entanto os mecanismos de percepção de PAMPs virais por PRRs ainda são obscuros (Teixeira et al., 2019). Recentes descobertas indicam que ácidos nucleicos virais e dsRNAs sintéticos possam ser percebidos por PRRs, ainda não identificadas, e estimular uma resposta imune contra a infecção viral (Niehl, et al., 2016; Amari & Niehl, 2020). Evidências adicionais de que a barreira de defesa PTI também combate vírus em plantas incluem os estudos de genética reversa, tendo como alvos componentes já caracterizados da via de defesa PTI contra patógenos não virais, como os co-receptores BAK1 [*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1)-ASSOCIATED KINASE 1*] (Yang et al., 2010; Kørner et al., 2013), ressaltando que BAK1 forma complexos imunes ativos com vários PRRs não virais diante do reconhecimento de PAMPs (Ma et al., 2016); SERK1 (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1*) requerido para ativação de PRRs por dsRNA (Niehl et al., 2016); SERK4, cuja inativação aumenta a susceptibilidade a vírus de RNA (Yang et al., 2010), e o componente a jusante MAPK4 (*MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 4*), que funciona como um inibidor de PTI (Liu et al., 2011). Além disso, a pré-ativação de PTI com PAMPs de patógenos não virais aumenta a resistência de plantas contra vírus, indicando que PTI combate vírus com mecanismos similares a PTI típica contra patógenos não virais (Iriti and Varoni, 2015).

Um arsenal de proteínas efetoras virais pode inibir este mecanismo de defesa das plantas, muitas das quais codificadas pelo genoma viral e satélites associados a vírus (Buchmann et al., 2009; Yang et al., 2011). Devido à capacidade codificadora limitada de genomas virais, muitas proteínas virais podem assumir mais de uma função, em muitos casos agindo como supressores da resposta imune do vegetal. Exemplos de proteínas virais supressoras da resposta imune PTI incluem a proteína do capsídeo (CP) de *Plum pox virus* (PPV), gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* (Nicaise and Candresse, 2017), P6 de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), gênero *Caulimovirus*, família *Caulimoviridae* (Zvereva et al., 2016), a proteína de movimento (MP) de *Cucumber mosaic virus* (CMV), gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae* (Kong et al., 2018) e a proteína C4 de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae* (Gomez et al., 2019); interage com e inibe FLS2 (*FLAGELLIN-SENSITIVE 2*), um PRR típico ativado pela PAMP bacteriana flagelina. Além disso, a proteína C4 é redirecionada da membrana plasmática para o cloroplasto durante a infecção viral e interage com o receptor sensor de cálcio (CAS) para inibir respostas de defesa mediadas por este

receptor, incluindo a biossíntese do hormônio de defesa antiviral, ácido salicílico (Medina-Puche et al., 2020)

Um tipo de resposta imune contra vírus, diferente de ETI e PTI, mas desencadeada por um outro RLK, NIK1 (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN-INTERACTING KINASE 1*), foi recentemente descrita (Teixeira et al., 2019). Entretanto, assim como em PTI, esse mecanismo de defesa antiviral é alvo de um fator de virulência, NSP (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN*) de *Begomovirus*, limitando sua efetividade contra a infecção viral. O receptor de membrana NIK1 pertence à família de receptores do tipo LRR-RLK (*Leucine-rich repeat receptor-like kinase*) e, como tal, possui um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR) na região N-terminal, um segmento transmembrana e um domínio C-terminal conservado de cinases do tipo serina/treonina no lado citosólico (Mariano et al., 2004). NIK1 foi inicialmente identificada em tomateiro e soja por ser alvo de virulência da proteína NSP (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN*) dos begomovirus pertencentes à família *Geminiviridae* (Mariano et al., 2004). Posteriormente, a subfamília II de LRR-RLKs a qual pertence NIK1, foi filogeneticamente caracterizada em *Arabidopsis* e tomateiro, englobando três subgrupos, (i) subgrupo SERK com cinco membros, (ii) subgrupo LRRin com cinco membros desconhecidos e (iii) subgrupo NIK com três membros, NIK1, NIK2 e NIK3 (Fontes et al., 2004; Mariano et al., 2004; Sakamoto et al., 2012). A interação de NSP com o domínio citoplasmático de NIK1 inibe a sua atividade cinase, e reduz a funcionalidade do gene *NIK1* (Fontes et al., 2004). Por outro lado, a superexpressão de NIK1 em *Arabidopsis* e tomateiros suprime o desenvolvimento de sintomas e diminui o acúmulo do DNA viral de begomoviruses, grupo de vírus de DNA circular fita simples. Além disso, a inativação de NIK1 em linhagens nocaute aumenta susceptibilidade ao begomovirus CaLCuV (*Cabbage leaf curl virus*) e TRV (*Tobacco Rattle Virus*), um vírus de RNA pertencente à família *Tobravirus* (Fontes et al., 2004; Carvalho et al., 2008; Li et al., 2019).

Progressos alcançados na elucidação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 incluem a identificação dos componentes a jusante, a proteína ribossomal L10 (RPL10) e o repressor de transcrição LIMYB (*L10-INTERACTING MYB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN*) (Carvalho et al., 2008; Rocha et al., 2008; Zorzatto et al., 2015). Mais recentemente, foi demonstrado que ácidos nucleicos derivados de begomovirus funcionam como PAMPs virais e são capazes de ativar a via de sinalização de NIK1 que culmina com a montagem de uma defesa contra begomovirus (Teixeira et al., 2019). O modelo atual para ativação e montagem da defesa antiviral mediada por NIK1 sustenta que sinais da infecção viral, correspondentes a ácidos

nucléicos derivados de begomovirus, devem ser percebidos por um receptor transmembrana do tipo PRR ainda desconhecido que então recruta NIK1, formando heterodímero o que permite a aproximação dos respectivos domínios cinases, e consequente transfosforilação dos domínios intracelulares. A ativação de NIK1 é dependente de fosforilação da treonina 474, presente na alça de ativação (*A-loop*) do domínio cinase de NIK1 (Santos et al., 2009). Após a adição de um fosfato no domínio citoplasmático de NIK1 inicia-se a amplificação da cascata de sinalização que promove a fosforilação indireta seguida da translocação da proteína ribossomal RPL10 para o núcleo da célula (Carvalho et al., 2008). No núcleo celular, L10 interage com LIMYB, um fator de transcrição que reprime a expressão de genes relacionados com a maquinaria de tradução, o que causa supressão global de tradução em células infectadas, impactando negativamente a infecção viral (Zorzatto et al., 2015; Brustolini et al., 2015). Como uma medida de contra defesa, NSP se liga ao domínio cinase de NIK1 impedindo a oligomerização e a fosforilação da treonina 474 desse receptor, prevenindo assim a transmissão do sinal antiviral. Consequentemente, a via de sinalização antiviral mediada por NIK1 é um mecanismo de defesa de plantas contra vírus evolutivamente superado por begomovirus. Entretanto, como a ativação de NIK1 culmina com a supressão da tradução global em células vegetais, é possível que outros sinais de estresses possam ativar NIK1 por meio de oligomerização com receptores cognatos específicos para diferentes estresses fisiológicos.

Possivelmente, a síntese de proteínas é o processo celular básico que mais consome energia na célula. Uma rede de sinalização complexa em células eucarióticas regula mecanismos de tradução, específicos ou gerais, em resposta a uma gama de estresses fisiológicos (Buttgereit & Brand, 1995; Proud et al., 2019). Em geral, o status energético da célula, normalmente comprometido em situações de estresse, deve ser balanceado com a síntese de proteínas. Diversas cinases citossólicas e de membranas tem sido caracterizadas em células eucarióticas que regulam tradução global em resposta a situações de estresses bióticos e abióticos. Entre estas, podem ser citadas a proteína cinase Gcn2 (*GENERAL CONTROL NON-DEREPRESSIBLE 2*) de leveduras, ativada por estresses e limitação nutricional, PERK [*PKR-LIKE ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) KINASE*], ativada em resposta a estresse no retículo endoplasmático, PKR (*DOUBLE-STRANDED RNA DEPENDENT PROTEIN KINASE PKR*), ativada por intermediários de replicação, e dsRNAs, produzidos durante a infecção viral (Nakamura et al., 2010). A via de mTOR, serina/treonina proteína cinase de mamíferos, impacta positivamente ou negativamente a tradução global em resposta a hormônios de proliferação celular ou em resposta a estresses energéticos, respectivamente (Wang & Proud 2006;

Appenzeller-Herzog & Hall 2012; Proun, 2019). Recentemente, foi demonstrado que a proteína NIK1 apresenta características que podem validar uma ampla função na regulação de tradução em resposta a diferentes sinais de estresses (Ahmed et al., 2018; Smakowska-Luzan et al., 2018).

A identificação de uma rede de interações baseada em receptores LRR da superfície celular (CSI^{LRR}) revelou que NIK1 forma um “hub” com alto grau de centralidade, se posicionando entre os 35 LRR-RLKs mais influentes como espalhador de informação (Ahmed et al., 2018; Smakowska-Luzan et al., 2018). Um outro LRR-RLK, BAK1, pertencente à mesma subfamília II e com similar configuração estrutural de NIK1, também se posiciona como altamente influenciador de informação. Consistente com este resultado, BAK1 participa como co-receptor de vários PRRs, envolvidos em PTI, e também do receptor BRI1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1*), envolvido na transdução de sinais de desenvolvimento por brassinosteroide (Ma et al., 2016). Portanto, é possível que NIK1 também esteja envolvido na transdução de diferentes sinais de estresses reconhecidos por diferentes receptores transmembrana. Em suporte a estas observações, além da função antiviral de NIK1, foi demonstrado recentemente que NIK1 e seu parálogo NIK2 também influenciam PTI e regulam negativamente a imunidade antibacteriana, embora o mecanismo da regulação negativa não tenha sido elucidado (Ahmed et al., 2018).

Análises filogenéticas recentes da subfamília II de LRR-RLKs agrupou os 13 membros de *Arabidopsis* em 5 grupos, subdividindo os subclados SERK e NIK em quatro subgrupos. Nesta análise filogenética, NIK1 e NIK2 agruparam juntos formando um subclado próprio, separado de NIK3 (Hosseini et al., 2020). Consistente com estes dados, foi demonstrado que NIK1 e NIK2 compartilham redundância funcional, como reguladores positivos de imunidade antiviral e reguladores negativos de PTI, enquanto NIK3 funciona em ETI (Ahmed et al., 2018). Além disso, NIK1 e NIK3 formam *hubs* independentes de interação proteína-proteína de alta centralidade o que indica que NIK1 e NIK3 diferem funcionalmente e devem regular eventos de sinalização diferentes. Foi também demonstrado que NIK3, também designado CIK1 (*CLAVATA 3 INSENSITIVE RECEPTOR KINASE 1*), funciona como co-receptor de CLAVATA 3 na regulação da manutenção da homeostase de células troncos (Hu et al., 2018). Estes resultados indicam que NIK1 e NIK3 divergem funcionalmente em imunidade e desenvolvimento, mas as comunicações cruzadas de NIK1 com outras vias de imunidade e de NIK3 em outros eventos de desenvolvimento ainda não foram acessadas cientificamente.

O objetivo primordial dessa investigação foi avançar o nosso conhecimento com relação à alta centralidade de NIK1 e de NIK3 nas interações entre receptores de membranas e como influenciadores no espalhamento de informações sinalizadoras em células vegetais. As múltiplas interações de NIK1 e NIK3 com receptores de membranas levantaram as hipóteses da existência de possíveis comunicações cruzadas mediadas por NIK1 em resposta a estresses bióticos e por NIK3 em eventos de desenvolvimento. Para acessar estas hipóteses, esta investigação foi organizada em três capítulos. No primeiro capítulo, é apresentada uma revisão de imunidade de plantas focalizando em receptores transmembranas. Este capítulo I foi submetido para publicação na revista *Virology*, sendo designado “Geminivirus-Host Interactions: Action and Reaction in Receptor-mediated Antiviral Immunity”. O segundo capítulo endereça a comunicação cruzada e influência de NIK1 na imunidade antiviral e antibacteriana, cujos resultados foram publicados em *Nature Communications*, sendo que o autor dessa investigação Marco Aurelio Ferreira compartilha a primeira autoria com o Dr. Bo Li. O capítulo II é referenciado como: Li, Bo; Ferreira, M. A. et al. (2019). “The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity”. *Nature Communications*.10, 1-14. O capítulo III focaliza em desvendar novas funções de NIK3 em eventos de desenvolvimento por meio de genômica funcional, sendo designado, “Caracterização funcional de NIK3 por análise de RNA-seq, um novo elo entre desenvolvimento e imunidade em plantas”.

Coletivamente os resultados do capítulo II demonstraram que a via de sinalização antiviral mediada por NIK1 e suprimida por begomoviruses, pode ser pré-ativada por PAMPs bacterianas antes da infecção viral, constituindo uma alternativa para controle de infecções múltiplas de begomovirus e bactérias em campo aberto. Além disso, demonstraram que NIK1 pode formar complexos imunes alternativos sendo ativada por sinais diferentes de infecções virais e que também levam à supressão global de tradução, corroborando com o argumento de que a via de sinalização de controle traducional mediada por NIK1 pode ser ativada por outros sinais de estresses. Os resultados do capítulo III forneceram evidências de que NIK3 participa de eventos de desenvolvimento diversos como regulador negativo. Considerando a relevância conceitual de vias de sinalização mediadas por receptores e seu controle, as caracterizações de NIK1, como regulador negativo de imunidade antibacteriana, e de NIK3, como regulador negativo de eventos de desenvolvimento, contribuirão para o nosso entendimento de como controlar melhor e racionalmente o sistema imune e eventos de desenvolvimento para obtenção de plantas geneticamente melhorad

REFERÊNCIAS

- Ahmed, H., Howton, T. C., Sun Y. L., Weinberger, N., Belkhadir, Y., & Mukhtar M. S. (2018) Network biology discovers pathogen contact points in host protein-protein interactomes. *Nat Commun.* 9, 1-13.
- Amari, K., & Niehl, A. (2020). Nucleic acid-mediated PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Virol.* 42, 32-39.
- Amin, I., Patil, B. L., Briddon, R. W., Mansoor, S., & Fauquet, C. M. (2011). Comparison of phenotypes produced in response to transient expression of genes encoded by four distinct begomoviruses in *Nicotiana benthamiana* and their correlation with the levels of developmental miRNAs. *Virol. J.* 8, 238.
- Appenzeller-Herzog, C., & Hall, M. N. (2012). Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends Cell Biol.* 22(5), 274-282.
- Beam, K., & Ascencio-Ibáñez, J. T. (2020). Geminivirus Resistance: A Minireview. *Front. Plant Sci.* 11.
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant.* 8(4), 521-539.
- Bisaro, D. M. (2006). Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology.* 344, 158-168.
- Buchmann, R. C., Asad, S., Wolf, J. N., Mohannath, G., & Bisaro, D. M. (2009). Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J. Virol.* 83, 5005-5013.
- Burgyán, J., & Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16, 265-272.
- Calil, I. P. & Fontes, E. P. B. (2017). Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Ann. Bot.* 119, 711-723.
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K. B., Montgomery, T. A., Nguyen, T., Cuperus, J. T., & Carrington J. C. (2012). Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell.* 24, 3613–3629.
- Carvalho, C. M., Santos, A. A., Pires, S. R., Rocha, C. S., Saraiva, D. I. Machado, J. P. B. Mattos, E. C. Fietto, L. G. & Fontes, E. P. B. (2008). Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathog.* 4 (12), 1000244-1000247.
- Chikoti, P. C., Mulenga, R. M., Tembo, M., & Sseruwagi, P. (2019). Cassava mosaic disease: a review of a threat to cassava production in Zambia. *J. Plant Pathol.* 1-11.
- Erb, M., Meldau, S., & Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci.* 17(5), 250-259.

- Fontes, E. P. B., Santos, A. A., Luz, D. F., Waclawovsky, A. J., & Chory, J. (2004). The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes Dev.* 18, 2545-2556.
- García-Arenal, F., & Zerbini, F. M. (2019). Life on the edge: geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. *Annu. Rev. Virol.* 6, 411-433.
- Holmes, F. O. (1938). Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathol.* 28, 553–561.
- Hosseini, S., Schmidt, E. D. L. & Bakker, F. T. (2020). Leucine-rich repeat receptor-like kinase II phylogenetics reveals five main clades throughout the plant kingdom. *Plant J.* 103, 547-560.
- Hu, C., Zhu, Y., Cui, Y., Cheng, K., Liang, W., Wei, Z., Zhu, M., Yin, H., Zeng, L., Xiao, Y., Lv, M., Yi, J., Hou, S., He, K., Li, J., & Gou, X. (2018). A group of receptor kinases are essential for CLAVATA signalling to maintain stem cell homeostasis. *Nat Plants.* 4, 205-211.
- Iriti, M. & Varoni, E. M. (2015). Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 2935-2944.
- Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature.* 444 (7117), 323-329.
- Kørner, C. J., Klauser, D., Niehl, A., Dominguez-Ferreras, A., Chinchilla, D., Boller, T., Heinlein, M., & Hann, R. D. (2013). The immunity regulator *BAK1* contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 1271–1280.
- Law, J.A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.*, 11, 204-220.
- Li, B., Ferreira, M. A., Huang, M., Camargos, L. F., Yu, X., Teixeira, R. M., Carpinetti., P. A. Mendes, G. C. Gouveia-Mageste, B. C. Liu, C. Pontes, C. S. L. Brustolini, O. J. B. Martins, L. G. C. Melo, B. P. Duarte, C. E. M. Shan, L. He, P. & Fontes, E. P. B. (2019). The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. *Nat. Commun.* 10, 1-14.
- Li, F., Xu, X., Huang, C., Gu, Z., Cao, L., Hu, T., Ding, M., Li, Z., & Zhou, X. (2015). The AC5 protein encoded by Mungbean yellow mosaic India virus is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. *New Phytol.* 208(2), 555-569.
- Liu, J. Z., Horstman, H. D., Braun, E., Graham, M. A., Zhang, C., Navarre, D., Hill, J. H. & Whitham, S. A. (2011). Soybean homologs of MPK4 negatively regulate defense responses and positively regulate growth and development. *Plant Physiol.* 157(3), 1363-1378.
- Lozano-Durán, R. & Zipfel, C. (2015). Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* 20 (1), 12-19.
- Ma, X., Xu, G., He, P., & Shan, L. (2016). SERKing coreceptors for Receptors. *Trends Plant Sci.* 21, 1017–1033.
- Mariano, A. C., Andrade, M. O., Santos, A. A., Carolino, S. M. B., Oliveira, M. L., Baracat-Pereira, M. C., Brommonshenkel, S. H., & Fontes, E. P. B. (2004). Identification of a novel

receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*. 318, 24-31.

Medina-Puche, L., Tan, H., Dogra, V., Wu, M., Rosas-Diaz, T., Wang, L., Xue, D., Zhang, D. Fu, X. Kim, C. & Lozano-Duran, R. (2020). A defense pathway linking plasma membrane and chloroplasts and co-opted by pathogens. *Cell*, 182(5), 1109-1124.

Mubin, M., Amin, I., Amrao, L., Briddon, R. W., & Mansoor, S. (2010). The hypersensitive response induced by the V2 protein of a monopartite begomovirus is countered by the C2 protein. *Mol. Plant Pathol.* 11, 245–254.

Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C. Z. & Hotamisligil, G. S. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*, 140(3), 338-348.

Nicaise, V. and Candresse, T. (2017). Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. *Mol. Plant Pathol.* 18, 878–886

Niehl, A., Wyrsh, I., Boller, T., & Heinlein, M. (2016). Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol.* 211, 1008–1019.

Palauqui, J-C., Elmayan, T., Pollien, J-M., & Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16, 4738-4745.

Pooggin, M. M. (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15233– 15259.

Proud, C. G. (2019). Phosphorylation and signal transduction pathways in translational control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11(7), a033050.

Rodríguez-Negrete, E., Lozano-Durán, R., Piedra-Aguilera, A., Cruzado, L., Bejarano, E. R., & Castillo, A. G. (2013). Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytol.* 199, 464-475.

Sakamoto, T., Deguchi, M., Brustolini, O. J. B., Santos, A. A., Silva, F. F; & Fontes, E. P. B. (2012). The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biol.* 12, 229.

Santos, A. A., Carvalho, C.M., Florentino, L. H., Ramos, H. J. O., & Fontes, E.P.B. (2009). Conserved threonine residues within the A-Loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. *PLoS ONE*, 4, e5781.

Santos, A. A., Lopes, K. V. G., Apfata, J. A. C. & Fontes, E. P. B. (2010). NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling. *J. Exp. Bot.* 61, 38-39.

Smakowska-Luzan, E., Mott, G. A., Parys, K., Stegmann, M., Howton, T. C., Layeghifard, M., Neuhold, J., Lehner, A., Kong, J., Grünwald, K., Weinberger, N., Satbhai, S. B., Mayer, D. Busch, W., Madalinski, M., Stolt-Bergner, P., Provart, N. J., Mukhtar, M. S., Zipfel, C., Desveaux, D., Guttman, D. S., & Belkhadir, Y. (2018). An extracellular network of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinases. *Nature*. 553(7688), 342-346.

- SMANT, G; JONES, J. Suppression of plant defences by nematodes. In: **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Springer, Dordrecht, 2011. p. 273-286.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13(4), 459-465.
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6, 206–220.
- Wang, H., Buckley, K. J., Yang, X., Buchmann, R. C., & Bisaro, D. M. (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* 79, 7410-7418
- Wang, X. B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W., Gascioli, V., Vaucheret, H., & Ding, S. (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 23, 1625–1638.
- Wang, X., & Proud, C. G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology.* 21(5), 362-369.
- Whitham, S., Dineshkumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., & Baker, B. (1994). The product of the Tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the Interleukin-1receptor. *Cell.* 78, 1101–1115.
- Yadav, R. K., & Chattopadhyay, D. (2011). Enhanced viral intergenic region-specific short interfering RNA accumulation and DNA methylation correlates with resistance against a geminivirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 1189-1197.
- Yang, X., Xie, Y., Raja, P., Li, S., Wolf, J. N., Shen, Q., Bisaro, D. M., & Zhou, X. (2011). Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β C1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. *PLoS Pathog.* 7, e1002329.
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., & Chua, N. H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20, 3255-3268.
- Zhang, Z., Chen, H., Huang, X., Xia, R., Zhao, Q., Lai, J., Teng, K., Li, Y., Liang, L., Du, Q., Zhou, X., Guo, H., & Xie, Q. (2011). BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23, 273-288.
- Zvereva, A. S., Golyaev, V., Turco, S., Gubaeva, E. G., Rajeswaran, R., Schepetilnikov, M. V., Srour, O., Ryabova, L. A., Boller, T., Pooggin, M. M. (2016). Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants. *New Phytol.* 211 (3), 1020-1034.

CAPÍTULO I

Geminivirus-Host Interactions: Action and Reaction in Plant Antiviral Immunity

Artigo submetido para publicação no dia 07 de março de 2021. Revisado 7 de abril de 2021. Aceito 4 de maio de 2021. Publicado 6 de maio de 2021, na revista *Viruses*, ISSN: 1999-4915

Marco Aurélio Ferreira, Ruan Maloni Teixeira e Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Geminivirus-Host Interactions: Action and Reaction in Plant Antiviral Immunity. (doi: <https://doi.org/10.3390/v13050840>).

Review

Geminivirus–Host Interactions: Action and Reaction in Receptor-Mediated Antiviral Immunity

 Marco Aurélio Ferreira, Ruan M. Teixeira and Elizabeth P. B. Fontes * 

Department of Biochemistry and Molecular Biology, BIOAGRO, National Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interactions, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36571.000, MG, Brazil; marco.aurelioferreira@hotmail.com (M.A.F.); ruanmaloni@gmail.com (R.M.T.)

* Correspondence: bbfontes@ufv.br

Abstract: In plant–virus interactions, the plant immune system and virulence strategies are under constant pressure for dominance, and the balance of these opposing selection pressures can result in disease or resistance. The naturally evolving plant antiviral immune defense consists of a multilayered perception system represented by pattern recognition receptors (PRR) and resistance (R) proteins similarly to the nonviral pathogen innate defenses. Another layer of antiviral immunity, signaling via a cell surface receptor-like kinase to inhibit host and viral mRNA translation, has been identified as a virulence target of the geminivirus nuclear shuttle protein. The *Geminiviridae* family comprises broad-host range viruses that cause devastating plant diseases in a large variety of relevant crops and vegetables and hence have evolved a repertoire of immune-suppressing functions. In this review, we discuss the primary layers of the receptor-mediated antiviral immune system, focusing on the mechanisms developed by geminiviruses to overcome plant immunity.

Keywords: PAMP-triggered immunity; effector-triggered immunity; NIK1 antiviral defense; viral suppressors; effectors; NIK1; PTI; ETI; geminiviruses



check for updates

Citation: Ferreira, M.A.; Teixeira, R.M.; Fontes, E.P.B.

Geminivirus–Host Interactions:

Action and Reaction in

Receptor-Mediated Antiviral

Immunity. *Viruses* **2021**, *13*, 840.

<https://doi.org/10.3390/v13050840>

Academic Editor: Eugene Savenkov

Received: 7 April 2021

Accepted: 4 May 2021

Published: 6 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Plants, like any other organism, are frequently exposed to infections caused by a diversity of pathogens. The microbe perception by the plant via cell surface and intracellular receptors is crucial for the activation of plant defenses during pathogen attack [1,2]. Conversely, the recognition of the host enables the pathogen to activate virulence strategies. The receptor-mediated innate immune system is broadly divided into two lines of defense. The first line of plant defense against pathogens is represented by cell surface-localized pattern recognition receptors (PRRs), which sense and recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) presented by the pathogens, or danger-associated molecular patterns (DAMPs), endogenous signals released by the host upon infection [3,4]. Upon PAMP recognition, PRRs are activated to initiate PAMP-triggered immunity (PTI), a relatively weak defense barrier that inhibits most invading organisms [5,6]. Recent studies have demonstrated that viruses, like nonviral pathogens, both activate and suppress PTI-like responses [7]. Therefore, successful infection depends on PTI suppression by virulence effectors eliciting effector-triggered susceptibility (ETS) [8–10].

To overcome these virulence strategies, plant cells have evolved a second line of defense called effector-triggered immunity (ETI), activated in resistant genotypes upon specific interactions between host intracellular receptors (resistance proteins; R) and pathogen avirulence (Avr) effectors [11]. Therefore, many effectors that activate ETI (avirulence factors) in resistant genotypes have evolved to suppress PTI as virulence factors [8,12]. The nonviral pathogens effectors are delivered into the apoplast or injected into the cytoplasm of plant cells via a microbial secretion system [13]. In contrast, viral effectors are synthesized intracellularly and promote virulence by interfering with the components of the host defense system [7,14]. Due to the limited coding capacity of viral genomes,

virtually all virus-encoded proteins, including essential proteins required for infection, can function as avirulence factors in genotypes harboring the cognate R gene. Therefore, viral avirulence factors are often required for a successful infection and almost invariably act as virulence factors in susceptible hosts. Viral effectors are considered here as virus-encoded proteins that interfere with host defenses to promote virulence.

Another layer of the antiviral immunity corresponds to the transmembrane receptor-like kinase nuclear shuttle protein (NSP)-interacting kinase 1 (NIK1)-mediated antiviral defense that is often suppressed by the geminivirus nuclear shuttle protein (NSP) [15]. The NIK1-mediated antiviral signaling has been shown to suppress global host translation to fight geminiviruses and tobacco rattle virus (TRV) [16–18]. This minireview focuses on the three layers of receptor-mediated plant antiviral immunity (PTI, ETI, and NIK1-mediated antiviral signaling) and describes the virulence strategies evolved by geminiviruses to overcome these host defense barriers. We also discuss the interplay of antibacterial PTI with the NIK1-mediated antiviral signaling, which may circumvent the NIK1 inhibition by the geminivirus NSP.

2. Genome Organization of Geminiviruses (*Geminiviridae* Family)

The *Geminiviridae* family represents a group of plant DNA viruses that cause severe diseases in many crops, a major constraint to agricultural productivity and food security. This family includes nine genera (*Mastrevirus*, *Eragrovirus*, *Becurtovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus*, *Grablovirus*, and *Begomovirus*), which comprise viruses with monopartite or bipartite circular single-stranded DNA genomes of 2.6 to 3.0 kb [19] (Figure 1). The viral genomes replicate via dsDNA intermediates containing complementary-sense (CS) and virion-sense (VS) strands (Figure 1). Proteins encoded by the CS strand are called C1–C5 and by the VS strand, V1 and V2. In bipartite begomoviruses, the ORF designations incorporate A (AC1–AC5, AV1–AV2) or B (BC1, BV1) from DNA-A and DNA-B. These designations are often replaced with protein function, including replication initiator protein (Rep/AC1/C1), transcriptional activator protein (TrAP/AC2/C2), replication enhancer protein (REn/AC3/C3), coat protein (CP), movement protein (MP/BC1), and nuclear shuttle protein (NSP/BV1). Due to the limited coding capacity of the viral genomes, the encoded proteins evolved into multifunctional proteins to harbor both the virus cycle-supporting and host immunity-suppressing functions.

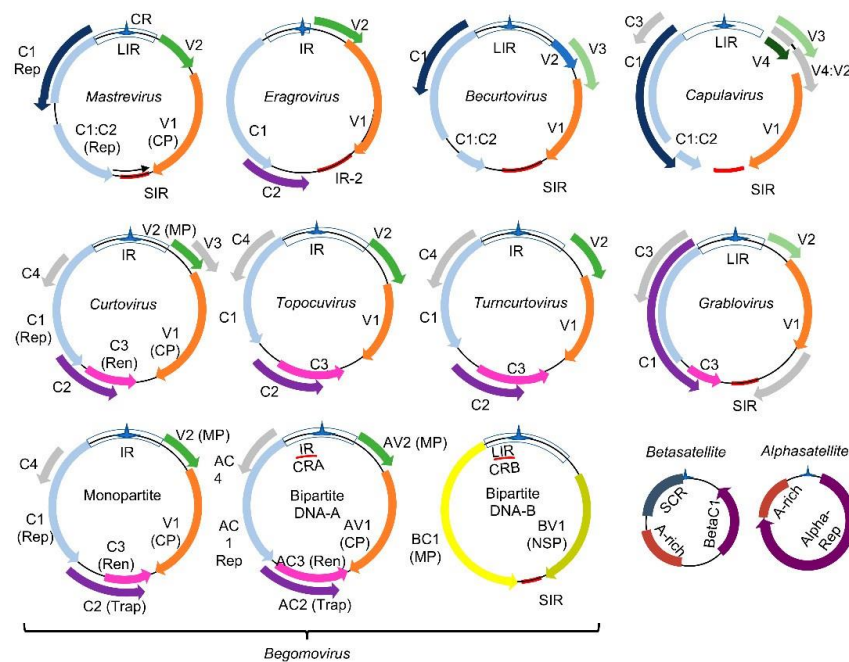


Figure 1. Genomic organization of geminiviruses (*Geminiviridae* family): The *Geminiviridae* family includes nine genera represented by monopartite or bipartite species. LIR denotes the long intergenic

region, SIR, the short intergenic region, and CR, the common region. The viral proteins replication initiator protein, Rep (C1), and replication enhancer protein, Ren (C3), are associated with replication, and the transcription activator protein, Trap (C2), with the transcription of viral and host genes; AC4 is a virulence factor. The capsid protein (CP) is indicated in the monopartite and bipartite genomes. In monopartite species, V2 represents the movement protein (MP). In bipartite begomoviruses, MP (BC1) is encoded by the DNA-B that also encodes the nuclear shuttle protein, NSP (BV1), which facilitates the nucleocytoplasmic movement of viral DNA. Bipartite begomoviruses are often associated with DNA satellites: the alphasatellites, which encode a replication protein (Rep), and the betasatellites that encode the virulence-related β C1 protein. A-rich is a conserved adenine rich region of the DNA satellites, and SCR is the satellite conserved region. As with β C1, the encoded products of ORFs V1, V2, BV1, C2, C4, and AC3 from some geminivirus species are also reported as virulence factors. Adapted from [19].

3. Geminiviruses Activate and Suppress Viral PTI and ETI-Like Responses

Although viruses are intracellular parasites, recent studies have demonstrated that virus infection can activate PTI-like responses in the host [7,20]. However, viral PAMPs and their cognate PRRs have not been isolated and characterized, and hence, the mechanism of PTI activation in response to viral infection remains unknown. Fragmented knowledge about viral PTI includes the observation that RNA from infected plants and double-stranded (ds) RNA [poly(I:C)] have been shown to trigger typical PTI responses in a somatic embryogenesis receptor kinase 1 (SERK1)-dependent manner [21,22]. SERK1 belongs to the subfamily II of the transmembrane leucine-rich repeat (LRR) receptor-like kinases (RLK) that encompasses several characterized coreceptors of PRRs [6,23]. Viral dsRNA may be regarded as potential PAMPs as it is usually generated in infected plants by RNA and DNA viruses [7,21]. However, PRRs recognize nonviral PAMPs extracellularly, and as intracellular obligate parasites, it is uncertain whether plant PRRs would perceive viruses via its extracellular PAMP-sensing domain.

Resembling the dsRNA-mediated SERK1 activation, NIK1, another LRR-RLK member of the subfamily II of coreceptors, can be activated by begomovirus-derived nucleic acids [7]. However, NIK1 activation induced by exogenously provided viral PAMPs requires mechanically injured leaves to facilitate the entry of begomovirus-derived nucleic acids in noninfected *Arabidopsis thaliana* leaf cells. These results suggest that PRRs sense viral PAMPs intracellularly, which would require either an endocytic internalization of the PRR sensing extracellular domain or perception via the PRR kinase cytosolic domain. In mammalian cells, the perception of virus-derived nucleic acids (DNA, ssRNA, and dsRNA) occurs intracellularly by the LRR domain of endosomal toll-like receptors (TLRs) or by the kinase sensor domain of cytosolic receptors [24,25]. An example of mammalian dsRNA-sensing kinase domain includes the protein kinase RNA-activated (PKR), which phosphorylates eIF2 alpha to shutdown translation in response to virus infection [25]. The recent demonstration that dsRNAs induce phosphorylation of eIF2 alpha in *Arabidopsis* may suggest a similar mechanism for viral PAMP-mediated kinase sensor domain activation in plant cells [26].

In addition to SERK1, required for viral PTI activation, the subfamily II of LRR-RLKs comprises members that function as coreceptors for multiple complexes of RLKs involved in defense [6,23]. The receptor configuration of the members of the LRR-RLK subfamily II includes an N-terminal extracellular domain harboring four complete LRRs and a fifth incomplete LRR, a single-pass transmembrane segment, and a conserved serine/threonine kinase domain at the cytosolic side [27,28] (Figure 2). Among members of the LRR-II-RLK clade, brassinosteroid insensitive 1 (BRI1)-associated kinase 1 (BAK1), also designated SERK3, represents the best-characterized coreceptor that forms complexes with multiple PRRs, assembling active immune complexes to initiate nonviral and viral PTI [6,29]. Examples of PRRs for BAK1 coreceptor include the flagellin receptor flagellin sensing 2 (FLS2), elongation factor-thermo unstable (EF-Tu) receptor (EFR), or PEP1 receptor 1 (PEPR1),

which perceive specific PAMPs/DAMPs and trigger PTI (reviewed in [6]). Additional LRR-RLK subfamily members, SERK4/BKK1 (BAK1-like kinase 1) and NIK1, have also been shown to function in antiviral immunity [30,31].

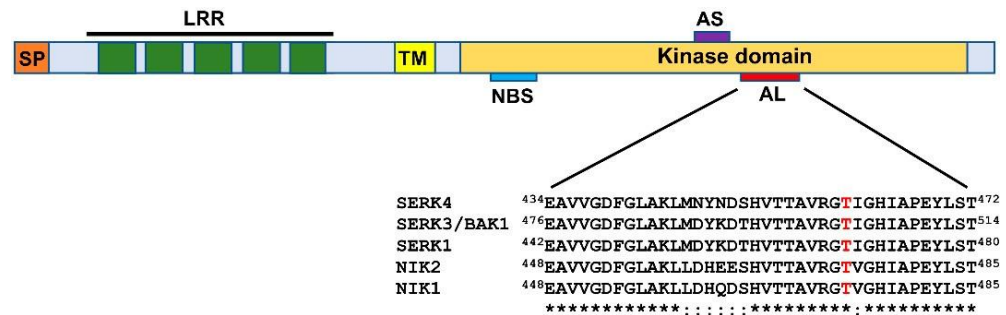


Figure 2. Domain organization of the LRR-RLK subfamily II members: Leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs) belonging to the subfamily II harbor a signal peptide (SP) and an LRR domain with 5 repeats at the N-terminal extracellular region, a transmembrane segment (TM), and a kinase domain at the cytosolic side. The relative positions of the nucleotide-binding site (NBS), the active site (AS), and the activation loop (AL) of the kinase are indicated. In the A-loop sequence comparison of LRR-RLK subfamily II representatives, the phosphorylation-dependent activation site of the kinase is highlighted in red.

Although nucleic acid-sensing PRRs have yet to be identified in plants, virus infection induces several PTI marker immune events, indicating that viral PTI may operate in plants with similar mechanisms as nonviral PTI [7,21,32]. Furthermore, PTI preactivation with nonviral PAMPs increases resistance against viruses, and PTI inhibitors enhance susceptibility to virus infection [33,34]. Reverse genetics studies targeting upstream components of PTI have also confirmed that plants employ PTI to fight virus infection. Inactivation of the PTI coreceptors BAK1, SERK1, and SERK4/BKK1 has been shown to enhance susceptibility to RNA virus infection [8,22,29,31]. Precedents in the literature indicate that geminivirus infection activates and suppresses PTI (Figure 3). Rep from different geminiviruses induces PTI-associated marker genes and SA-dependent defenses [35,36]. When coexpressed with tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) C4 protein, Rep redirects C4 to the chloroplasts where it acts as a PTI suppressor by reducing SA and ROS-dependent defense signals [20]. Geminivirus infection promotes the plasma membrane-bound N-myristoylated C4 translocation to the chloroplasts, where the nonmyristoylated C4 interacts with the plant calcium-sensing receptor (CAS) and hampers SA biosynthesis and mediated defenses [37]. In addition to Rep and C4, tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCV) betasatellite β C1 protein, required for symptom induction, has been shown to interfere with PTI-like responses. β C1 affects PTI-induced MAPK activation and downstream responses by targeting MKK2 in *A. thaliana* and *Nicotiana benthamiana* [38,39].

TYLCV C4 also interacts with RLKs, including FLS2, a typical PRR activated by the bacterial PAMP flagellin, and NIK1, an antiviral immune receptor that can protect plants against begomovirus [3,40]. The C4 interaction with FLS2 has been shown to inhibit partially PTI-like responses [40]. The C4 ectopic expression in Arabidopsis inhibited the early apoplastic ROS burst following flg22 perception but not the expression of PTI-marker defense genes, and neither affected the late inhibition of growth mediated by PTI activation. Likewise, NSP has been shown to interact with the FLS2 coreceptor BAK1 and hence may impair immune responses upon pathogen perception, similarly to the NIK1 inhibition by the begomovirus-encoded NSP [23,41]. However, NSP-BAK1 interaction has only been shown by the yeast two-hybrid system; therefore, further studies are necessary to assign a PTI-suppressing function to NSP.

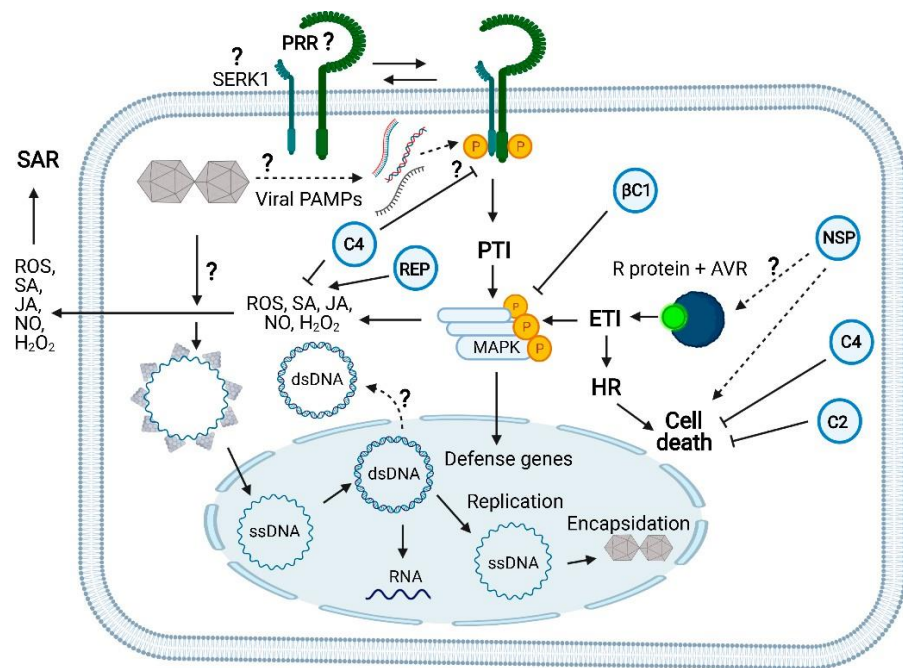


Figure 3. Receptor-mediated innate immunity against geminiviruses and counterdefensive viral activities: Like any other plant virus, geminiviruses are obligate intracellular parasites delivered into the cytoplasm of plant cells by the insect vector. The viral particle unpacking is likely to occur in the cytoplasm. Then, viral (v) CP-bound ssDNA is directed to the nucleus where v-ssDNA is converted to v-dsDNA to replicate the viral genome via the rolling circle mechanism and for transcribing the viral genes. The geminivirus infection both induces and suppresses the plant innate immunity. Geminivirus-derived nucleic acids may act as a viral PAMP to induce the dimerization of a yet-to-be-identified PRR with its coreceptor SERK1 to initiate the PTI signaling pathway. SERK1 has been shown to be required for viral PTI elicited by dsRNA, but no direct evidence exists for its participation in geminiviral PTI. FLS2 may function as a geminiviral PRR because C4 acts as a virulence effector by binding to FLS2 and inhibiting early PTI responses. Likewise, the betasatellite β C1 virulence effector affects the MAPKinase cascade. In a resistant *Phaseolus vulgaris* genotype to bean dwarf mosaic virus (BDMV), NSP acts as an avirulence factor; it is recognized by an unknown intracellular receptor and activates HR, cell death, and ETI-like responses. A typical NLR intracellular receptor of ETI (TYNBS1) confers resistance to TYLCV, yet the cognate geminivirus avirulence factor is unknown. Rep has been shown to induce ROS and SA-mediated defenses. As virulence effectors, C4 and C2 counter ETI activation by suppressing HR and cell death. C4 also inhibits SA-mediated defenses. The question marks indicate either events not well clarified or unknown. Solid line arrows describe experimentally demonstrated events and dotted line arrows denote genetically implicated events. See Figure 1 for the designations of the viral proteins. The figure was created with BioRender 101 (BioRender.com; <https://biorender.com/>, accessed on 1 April 2021).

The second layer of plant innate immunity, ETI, represents a more specific and robust line of host defense, which, in contrast to PTI, often results in programmed cell death, the hypersensitive response (HR), to restrict the pathogen to the site of infection [42]. ETI relies on intracellular immune receptors (resistance, R, proteins), which recognize, directly or indirectly, very specifically pathogen avirulent effectors to activate immune responses [11,14,20]. The antiviral intracellular R proteins are mostly represented by the nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR) receptors [14,43,44]. The natural Ty-2 resistance locus to TYLCV encodes an NB-LRR protein, named TYNBS1, which might activate ETI via recognition of a yet-to-be-identified geminiviral effector [45]. Examples of non-NB-LRR resistance proteins against TYLCV include the sensor proteins Ty-1 and Ty-3, which encode an RNA-dependent RNA polymerase (RDR) [46] and the recessive resistance gene encoded by the Ty-5 locus, the messenger RNA surveillance factor Pelota [47,48]. However, Ty-1-

based resistance against TYLCV is uncoupled to ETI and involves enhanced transcriptional gene silencing [49], and the underlying mechanism mediating Pelota resistance against geminiviruses is unknown.

Further evidence that geminiviruses activate ETI is derived from studies of geminivirus inducers and suppressors of HR and ETI-like responses (Figure 3). Geminivirus infection induces hypersensitive response (HR) and senescence-related genes without developing a visible cell death phenotype [50]. More specifically, the geminivirus proteins Rep, NSP, and V2 have been shown to induce HR [51–53]. In contrast, some geminiviral proteins possess the capacity of suppressing HR-like cell death [19]. The C2 protein from papaya leaf curl virus (PaLCuV) and cotton leaf curl Kokhran virus (CLCuKoV) has been shown to inhibit V2-mediated HR [53]. Likewise, TYLCV infection alleviates cell death in tomato plants, induced by the inactivation of heat shock protein 90 (HSP90) and suppressor of the G2 allele of Skp1 (SGT1) [54]. Still, the TYLCV-mediated cell death suppression mechanism is unknown. In contrast, the underlying mechanism for the cell death-suppressing activity of C4 from tomato leaf curl Yunnan virus (TLCYnV) has been recently uncovered [55]. C4 interacts with HIR1, impairs HIR1 self-oligomerization, and promotes its degradation, thereby inhibiting the HIR1-mediated HR and increasing virus pathogenicity. Although several lines of evidence indicate that both monopartite and bipartite begomoviruses induce and suppress HR, the mechanisms of ETI activation and suppression by geminiviruses are still far from understood.

4. NIK1-Mediated Antiviral Signaling and Crosstalk with Antibacterial Immunity

NIK1 was first identified in tomato as a virulence target of NSP from tomato golden mosaic virus (TGMV). It transduces an antiviral signal that culminates in the suppression of global host translation [16,18]. NIK1 interaction with NSP is conserved among NIKs from different hosts, such as Arabidopsis, soybean, and tomato, and NSPs from distinct begomoviruses, including cabbage leaf curl virus (CabLCV), TGMV, tomato crinkle yellow leaf virus (TCrYLV), and tomato yellow spot virus (ToYSV) [30,56]. Recently, NIK2 from Arabidopsis has been shown to function as a NIK1 paralog in the antiviral signaling pathway [7,27].

Although the NIK1-mediated antiviral signaling has been considered a new paradigm for plant antiviral immunity, it exhibits several PTI features [57]. First, NIK1 is structurally related to the typical PTI coreceptors BAK1, SERK4, and SERK1, which display a highly conserved kinase domain and a similar configuration of the LRR extracellular domain [27] (Figure 2). Second, NIK1 activation requires phosphorylation at threonine-474, a conserved position among the activation sites of BAK1, SERK4, and SERK1, which may indicate a similar mechanism for kinase activation [58]. Third, NIK1 is activated by begomovirus-derived nucleic acids, resembling the PTI activation mechanism by viral PAMPs [7,22]. Finally, the NIK1-mediated antiviral signaling is inhibited by begomovirus-encoded NSP, fulfilling the premise that the successful ETI activation would depend on the PTI suppression by viral effectors [7,11]. Examples of PTI suppressors from other plant viruses include CP from plum pox virus (PPV), *Potyvirus* genus [8], P6 from cauliflower mosaic virus (CaMV), *Caulimovirus* genus [59], and MP from cucumber mosaic virus (CMV), *Cucumovirus* genus [9]. Therefore, like the classic viral PTI, the NIK1-mediated antiviral signaling is activated and repressed by begomovirus infection.

Despite the similarities between PTI and NIK1 signaling, the downstream events of receptor/coreceptor activation and the assembly of a defense response differ considerably. Typically, the PTI activation results in ROS accumulation as an early response, followed by activation of MAP Kinases, induction of PTI-associated defense genes, ethylene and salicylic acid synthesis, and callose deposition [5]. Differing from PTI immune responses, NIK1-mediated antiviral signaling results in suppression of host global translation (Figure 4) [60]. According to the mechanistic model for NIK1 activation, during infection, begomovirus-derived nucleic acids function as viral PAMPs that induce NIK1 dimerization with itself, NIK2, or an unknown receptor (Figure 4) [7,30]. As members of the subfamily II of LRR-II-RLK with similar ectodomain configuration as PTI coreceptors, Arabidopsis

NIK1 and its paralog NIK2 may function as coreceptors of unknown nucleic acid-sensing PRRs [6]. An active immune complex formation leads to NIK1 phosphorylation at Thr-474, essential for NIK1 kinase activation to initiate signaling [41,58]. Activated NIK1 mediates the phosphorylation of the downstream component ribosomal protein (RP) L10, which in turn promotes its translocation to the nucleus [61,62]. NIK1 may control the extent of RPL10 phosphorylation by sequential autophosphorylation at the functionally antagonistic Thr-469 residue [41]. In the nucleus, phosphorylated RPL10 interacts with the transcriptional repressor LIMYB to fully repress the expression of translational machinery-related genes, causing suppression of global protein synthesis [18]. Viral mRNAs cannot escape the host translational suppression; they are not translated efficiently, compromising the infection [16,18]. Counteracting the activation mechanism of the defense pathway, NSP interacts with the kinase domain to prevent NIK1 phosphorylation and activation, creating an environment that is more favorable to begomovirus infection [30,41,61]. Therefore, the NIK1-mediated antiviral signaling is an evolutionarily suppressed host defense by begomoviruses.

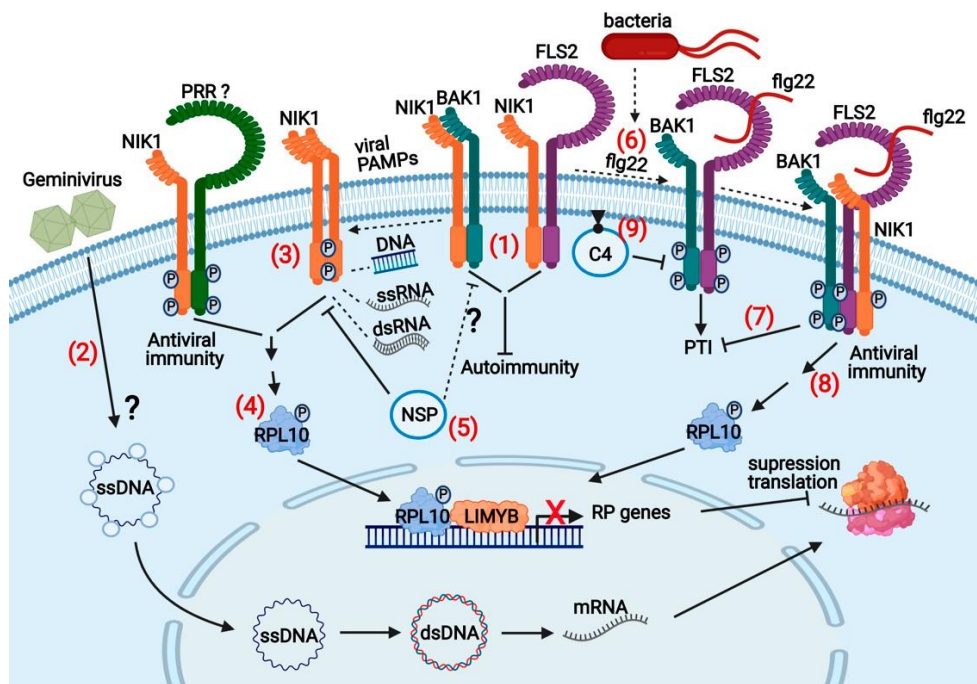


Figure 4. NIK1-mediated antiviral signaling and crosstalk with antibacterial immunity: In noninfected cells, (1) NIK1 pools are bound to the PRR FLS2 and the PTI coreceptor BAK1 to prevent autoimmunity. (2) At the onset of infection, CP-bound ssDNA is transported to the nucleus for replication of the viral genome and transcription of viral genes. (3) In the infected cells, geminivirus-derived nucleic acids act as viral PAMPs and induce the dimerization of NIK1 with itself or with another unknown receptor (PRR-like) for transphosphorylation of the kinase intracellular domains. NIK1 phosphorylation at Thr-474 activates the kinase that in turn mediates the RPL10 phosphorylation. (4) Phosphorylated RPL10 is redirected to the nucleus, where it interacts with LIMYB to repress the expression of ribosomal proteins (RBs) and translational machinery-related genes, culminating in suppressing host and viral mRNA translation. (5) NSP counters this antiviral mechanism's activation by binding to the NIK1 kinase domain, thereby preventing NIK1 phosphorylation and activation. (6) Bacterial infection (*Pseudomonas* spp) provides the apoplasmic bacterial PAMP flagellin (flg22), which is recognized by PRR FLS2, thereby inducing the formation of the active immune complex FLS2-BAK1 to initiate PTI. FLS2-BAK1-bound NIK1 is then phosphorylated at Thr-474 by the activated BAK1, (7) enhancing NIK1 suppression of PTI but (8) activating the NIK1-mediated antiviral signaling that results in suppression of global translation. (9) C4 from geminiviruses binds to FLS2 and inhibits the early PTI responses and subsequent NIK1 activation creating an environment that favors virus infection. The question marks indicate either events not well clarified or unknown. The figure was created with BioRender 101.

The NIK1-mediated immunity cross-communicates with PTI because NIK1 and NIK2 also function as PTI suppressors (Figure 4) [17]. Inactivation of either NIK1 or NIK2 in Arabidopsis enhances PTI activation and confers resistance to *Pseudomonas syringae*, an opposite phenotype displayed by NIK-overexpressing lines. Under normal conditions, NIK1 interacts with the flagellin receptor FLS2 and its coreceptor BAK1 to interfere with the immune complex formation and prevent autoimmunity (Figure 4). The bacterial PAMP flagellin, or its active peptide flg22, interacts with FLS2 and induces dimerization with BAK1, leading to the formation of an active immune complex to initiate PTI signaling. FLS2-mediated activation of BAK1 promotes NIK1 phosphorylation at the activation site Thr-474, which stimulates further the NIK1 interaction with FLS2 and BAK1 to control the extent of PTI activation and in turn triggers the activation of the NIK1-mediated antiviral signaling. Flg22-induced NIK1 phosphorylation requires both PRR FLS2 and its coreceptor BAK1, indicating that NIK1 acts downstream of receptor signaling. These results substantiate the argument that NIK1 may function as a coreceptor in ligand-induced activation of a yet unknown nucleic acid-sensing receptor (PRR) to elicit the NIK1-mediated antiviral defense. They also suggest that a bacterial PAMP can activate begomovirus resistance via NIK1 phosphorylation, which may alleviate NSP inhibition. Several lines of evidence indicate that the phosphorylation-mediated activation of NIK1 is downstream of NIK1 inhibition by begomovirus-encoded NSP. First, the NSP-binding site on NIK1 maps within an 80 amino acid stretch overlapping the activation loop and the kinase activation site (Thr474) [30]. Second, the replacement of the Thr-474 activation site with an aspartate creates a phosphomimic mutant that is no longer inhibited by NSP [41]. Finally, overexpression of the phosphomimic mutant NIK1-T474D in Arabidopsis and tomato plants confers broad-range resistance to begomovirus infection [16,18]. Therefore, treating hosts with the bacterial PAMP flg22 prior to begomovirus infection may lead to an efficient NIK1-mediated antiviral immune response by bypassing NSP inhibition. This interplay between immune responses allows bacteria to activate immunity against viruses, hence preventing multiple infections by pathogens from different kingdoms presumably to avoid competition.

5. Conclusions

Recent studies have demonstrated that plants deploy both levels of the classic innate immunity, PTI and ETI, to fight virus infection, and geminiviruses are not exception. Nevertheless, evidence for geminiviral PTI and ETI relies on the observations that geminivirus infection can induce and suppress PTI and ETI-like responses. In addition, some geminiviral proteins function as PTI suppressors, and at least one isolated resistance gene to TYLCV displays the classical NL-LRR configuration of intracellular R proteins that elicits ETI. However, our knowledge about geminiviral PTI and ETI mechanisms is still rudimentary, and several steps in PTI and ETI activation and response are unknown. For instance, we do not know the identity of geminiviral PAMPs that would induce PTI, and the cognate PRRs have not been identified. Furthermore, the repertoire of PTI geminiviral suppressors is restricted to C4 and perhaps to β C1 and NSP. The NSP-suppressed NIK1-mediated antiviral signaling has been shown to cross-communicate with bacterial PTI. In addition to suppressing global host translation, NIK1 activation leads to suppression of bacterial PTI, which restricts even further the use of sustained NIK1-mediated antiviral signaling to control virus infection. The isolation of geminiviral PAMPs and cognate PRRs, geminiviral effectors (Avr genes), and NL-LRR host targets will help to elucidate the mechanism of ETI activation and PTI suppression as the foundation for understanding the evolutionary pressure dynamics acting upon geminivirus and host interactions. This understanding will ultimately help to determine how to deploy the immune system to control geminivirus infection.

Author Contributions: M.A.F. and R.M.T. wrote the first draft of the manuscript. E.P.B.F. conceived and supervised the review topics. All authors contributed to the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially funded by CAPES finance code 001, CNPq, FAPEMIG, and the National Institute of Science and Technology in Plant-Pest interactions. MA is a recipient of a CAPES graduate fellowship and RMT is supported by a FAPMIG graduate fellowship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Dangl, J.L.; Horvath, D.M.; Staskawicz, B.J. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science* **2013**, *341*, 746–751. [[CrossRef](#)]
- Zhou, J.-M.; Zhang, Y. Plant Immunity: Danger Perception and Signaling. *Cell* **2020**, *181*, 978–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Macho, A.P.; Lozano-Duran, R. Molecular dialogues between viruses and receptor-like kinases in plants. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 1191–1195. [[CrossRef](#)]
- Zipfel, C. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* **2014**, *35*, 345–351. [[CrossRef](#)]
- Bigeard, J.; Colcombet, J.; Hirt, H. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant* **2015**, *8*, 521–539. [[CrossRef](#)]
- Ma, X.; Xu, G.; He, P.; Shan, L. SERKING Coreceptors for Receptors. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21*, 1017–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Teixeira, R.M.; Ferreira, M.A.; Raimundo, G.A.S.; Loriato, V.A.P.; Reis, P.A.B.; Fontes, E.P.B. Virus perception at the cell surface: Revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 1196–1202. [[CrossRef](#)]
- Nicaise, V.; Candresse, T. Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. *Mol. Plant Pathol.* **2017**, *18*, 878–886. [[CrossRef](#)]
- Kong, J.; Wei, M.; Li, G.; Lei, R.; Qiu, Y.; Wang, C.; Li, Z.-H.; Zhu, S. The cucumber mosaic virus movement protein suppresses PAMP-triggered immune responses in Arabidopsis and tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *498*, 395–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, Y.; Wang, Y. Trick or Treat: Microbial Pathogens Evolved Apoplastic Effectors Modulating Plant Susceptibility to Infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2018**, *31*, 6–12. [[CrossRef](#)]
- Jones, J.D.G.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *444*, 323–329. [[CrossRef](#)]
- Dodds, P.N.; Rathjen, J.P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 539–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Macho, A.P.; Zipfel, C. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* **2015**, *23*, 14–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gouveia, B.C.; Calil, I.P.; Machado, J.P.B.; Santos, A.A.; Fontes, E.P.B. Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Front. Microbiol.* **2017**, *7*, 2139. [[CrossRef](#)]
- Martins, L.G.C.; Raimundo, G.A.S.; Ribeiro, N.G.A.; Silva, J.C.F.; Euclides, N.C.; Loriato, V.A.P.; Duarte, C.E.M.; Fontes, E.P.B. A Begomovirus Nuclear Shuttle Protein-Interacting Immune Hub: Hijacking Host Transport Activities and Suppressing Incompatible Functions. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brustolini, O.J.; Machado, J.P.B.; Condori-Apfata, J.A.; Coco, D.; Deguchi, M.; Loriato, V.A.; Pereira, W.A.; Alfenas-Zerbini, P.; Zerbini, F.M.; Inoue-Nagata, A.K.; et al. Sustained NIK-mediated antiviral signalling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. *Plant Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 1300–1311. [[CrossRef](#)]
- Li, B.; Ferreira, M.A.; Huang, M.; Camargos, L.F.; Yu, X.; Teixeira, R.M.; Carpinetti, P.A.; Mendes, G.C.; Gouveia-Mageste, B.C.; Liu, C.; et al. The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)]
- Zorzatto, C.; Machado, J.P.B.; Lopes, K.V.G.; Nascimento, K.J.T.; Pereira, W.A.; Brustolini, O.J.B.; Reis, P.A.B.; Calil, I.P.; Deguchi, M.; Sachetto-Martins, G.; et al. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *520*, 679–682. [[CrossRef](#)]
- Kumar, R.V. Plant Antiviral Immunity Against Geminiviruses and Viral Counter-Defense for Survival. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1460. [[CrossRef](#)]
- Aguilar, E.; Gomez, B.G.; Lozano-Duran, R. Recent advances on the plant manipulation by geminiviruses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2020**, *56*, 56–64. [[CrossRef](#)]
- Amari, K.; Niehl, A. Nucleic acid-mediated PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Virol.* **2020**, *42*, 32–39. [[CrossRef](#)]
- Niehl, A.; Wyrsh, I.; Boller, T.; Heinlein, M. Double-stranded RNA s induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol.* **2016**, *211*, 1008–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sakamoto, T.; Deguchi, M.; Brustolini, O.J.B.; Santos, A.; Silva, F.F.; Fontes, E.P.B. The tomato RLK superfamily: Phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biol.* **2012**, *12*, 229. [[CrossRef](#)]
- Botos, I.; Segal, D.M.; Davies, D.R. The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure* **2011**, *19*, 447–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wu, J.; Chen, Z.J. Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, *32*, 461–488. [[CrossRef](#)]
- Niehl, A.; Heinlein, M. Perception of double-stranded RNA in plant antiviral immunity. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 1203–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hosseini, S.; Schmidt, E.D.L.; Bakker, F.T. Leucine-rich repeat receptor-like kinase II phylogenetics reveals five main clades throughout the plant kingdom. *Plant J.* **2020**, *103*, 547–560. [[CrossRef](#)]
- Zhang, X.S.; Choi, J.H.; Heinz, J.; Chetty, C.S. Domain-Specific Positive Selection Contributes to the Evolution of Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR RLK) Genes. *J. Mol. Evol.* **2006**, *63*, 612–621. [[CrossRef](#)]

29. Kørner, C.J.; Klauser, D.; Niehl, A.; Domínguez-Ferreras, A.; Chinchilla, D.; Boller, T.; Heinlein, M.; Hann, D.R. The Immunity Regulator BAK1 Contributes to Resistance Against Diverse RNA Viruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2013**, *26*, 1271–1280. [[CrossRef](#)]
30. Fontes, E.P.; Santos, A.A.; Luz, D.F.; Waclawovsky, A.J.; Chory, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2545–2556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yang, H.; Gou, X.; He, K.; Xi, D.; Du, J.; Lin, H.; Li, J. BAK1 and BKK1 in Arabidopsis thaliana confer reduced susceptibility to turnip crinkle virus. *Eur. J. Plant Pathol.* **2010**, *127*, 149–156. [[CrossRef](#)]
32. Nicaise, V. Crop immunity against viruses: Outcomes and future challenges. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 660. [[CrossRef](#)]
33. Iriti, M.; Varoni, E.M. Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *22*, 2935–2944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liu, J.-Z.; Horstman, H.D.; Braun, E.; Graham, M.A.; Zhang, C.; Navarre, D.; Qiu, W.-L.; Lee, Y.; Nettleton, D.; Hill, J.H.; et al. Soybean Homologs of MPK4 Negatively Regulate Defense Responses and Positively Regulate Growth and Development. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 1363–1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ding, X.; Jimenez-Gongora, T.; Krenz, B.; Lozano-Duran, R. Chloroplast clustering around the nucleus is a general response to pathogen perception in Nicotiana benthamiana. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 1298–1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, D.; Zhang, X.; Yao, X.; Zhang, P.; Fang, R.; Ye, J. A 7-Amino-Acid Motif of Rep Protein Essential for Virulence Is Critical for Triggering Host Defense Against Sri Lankan Cassava Mosaic Virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2020**, *33*, 78–86. [[CrossRef](#)]
37. Medina-Puche, L.; Tan, H.; Dogra, V.; Wu, M.; Rosas-Díaz, T.; Wang, L.; Ding, X.; Zhang, D.; Fu, X.; Kim, C.; et al. A Defense Pathway Linking Plasma Membrane and Chloroplasts and Co-opted by Pathogens. *Cell* **2020**, *182*, 1109–1124.e25. [[CrossRef](#)]
38. Cui, X.; Tao, X.; Xie, Y.; Fauquet, C.M.; Zhou, X. A DNA β Associated with Tomato Yellow Leaf Curl China Virus Is Required for Symptom Induction. *J. Virol.* **2004**, *78*, 13966–13974. [[CrossRef](#)]
39. Hu, T.; Huang, C.; He, Y.; Castillo-González, C.; Gui, X.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhou, X. β C1 protein encoded in geminivirus satellite concertedly targets MKK2 and MPK4 to counter host defense. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Gómez, B.G.; Zhang, D.; Rosas-Díaz, T.; Wei, Y.; Macho, A.P.; Lozano-Durán, R. The C4 Protein from Tomato Yellow Leaf Curl Virus Can Broadly Interact with Plant Receptor-Like Kinases. *Viruses* **2019**, *11*, 1009. [[CrossRef](#)]
41. Santos, A.A.; Carvalho, C.M.; Florentino, L.H.; Ramos, H.J.O.; Fontes, E.P.B. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5781. [[CrossRef](#)]
42. Dalio, R.J.D.; Paschoal, D.; Arena, G.D.; Magalhães, D.M.; Oliveira, T.S.; Merfa, M.V.; Maximo, H.J.; Machado, M.A. Hypersensitive response: From NLR pathogen recognition to cell death response. *Ann. Appl. Biol.* **2021**, *178*, 268–280. [[CrossRef](#)]
43. Ando, S.; Miyashita, S.; Takahashi, H. Plant defense systems against cucumber mosaic virus: Lessons learned from CMV–Arabidopsis interactions. *J. Gen. Plant Pathol.* **2019**, *85*, 174–181. [[CrossRef](#)]
44. Calil, I.P.; Fontes, E.P.B. Plant immunity against viruses: Antiviral immune receptors in focus. *Ann. Bot.* **2016**, *119*, 711–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yamaguchi, H.; Ohnishi, J.; Saito, A.; Ohyama, A.; Nunome, T.; Miyatake, K.; Fukuoka, H. An NB-LRR gene, TYNBS1, is responsible for resistance mediated by the Ty-2 Begomovirus resistance locus of tomato. *Theor. Appl. Genet.* **2018**, *131*, 1345–1362. [[CrossRef](#)]
46. Verlaan, M.G.; Hutton, S.F.; Ibrahim, R.M.; Kormelink, R.; Visser, R.G.F.; Scott, J.W.; Edwards, J.D.; Bai, Y. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003399. [[CrossRef](#)]
47. Lapidot, M.; Karniel, U.; Gelbart, D.; Fogel, D.; Evenor, D.; Kutsher, Y.; Makhbash, Z.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Chen, L.; et al. A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005538. [[CrossRef](#)]
48. Wang, Y.; Jiang, J.; Zhao, L.; Zhou, R.; Yu, W.; Zhao, T. Application of Whole Genome Resequencing in Mapping of a Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
49. Butterbach, P.; Verlaan, M.G.; Dullemans, A.; Lohuis, D.; Visser, R.G.F.; Bai, Y.; Kormelink, R. Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 12942–12947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ascencio-Ibáñez, J.T.; Sozzani, R.; Lee, T.-J.; Chu, T.-M.; Wolfinger, R.D.; Cella, R.; Hanley-Bowdoin, L. Global Analysis of Arabidopsis Gene Expression Uncovers a Complex Array of Changes Impacting Pathogen Response and Cell Cycle during Geminivirus Infection. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 436–454. [[CrossRef](#)]
51. Amin, I.; Patil, B.L.; Briddon, R.W.; Mansoor, S.; Fauquet, C.M. Comparison of phenotypes produced in response to transient expression of genes encoded by four distinct begomoviruses in Nicotiana benthamiana and their correlation with the levels of developmental miRNAs. *Virol. J.* **2011**, *8*, 238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Garrido-Ramirez, E.R.; Sudarshana, M.R.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Bean dwarf mosaic virus BV1 Protein Is a Determinant of the Hypersensitive Response and Avirulence in Phaseolus vulgaris. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2000**, *13*, 1184–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mubin, M.; Amin, I.; Amrao, L.; Briddon, R.W.; Mansoor, S. The hypersensitive response induced by the V2 protein of a monopartite begomovirus is countered by the C2 protein. *Mol. Plant Pathol.* **2010**, *11*, 245–254. [[CrossRef](#)]
54. Moshe, A.; Gorovits, R.; Liu, Y.; Czosnek, H. Tomato plant cell death induced by inhibition of HSP90 is alleviated by Tomato yellow leaf curl virus infection. *Mol. Plant Pathol.* **2015**, *17*, 247–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Mei, Y.; Ma, Z.; Wang, Y.; Zhou, X. Geminivirus C4 antagonizes the HIR1-mediated hypersensitive response by inhibiting the HIR1 self-interaction and promoting degradation of the protein. *New Phytol.* **2019**, *225*, 1311–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
56. Mariano, A.C.; Andrade, M.O.; Santos, A.A.; Carolino, S.M.; Oliveira, M.L.; Baracat-Pereira, M.C.; Brommonshenkel, S.H.; Fontes, E.P. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* **2004**, *318*, 24–31. [[CrossRef](#)]
 57. Machado, J.P.B.; Mendes, G.C.; Santos, A.A.; Brustolini, O.J.B.; Fontes, E.P.B. NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? *BioEssays* **2015**, *37*, 1236–1242. [[CrossRef](#)]
 58. Santos, A.A.; Lopes, K.V.G.; Apfata, J.A.C.; Fontes, E.P.B. NSP-interacting kinase, NIK: A transducer of plant defence signalling. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 3839–3845. [[CrossRef](#)]
 59. Zvereva, A.S.; Golyaev, V.; Turco, S.; Gubaeva, E.G.; Rajeswaran, R.; Schepetilnikov, M.V.; Srouf, O.; Ryabova, L.A.; Boller, T.; Pooggin, M.M. Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants. *New Phytol.* **2016**, *211*, 1020–1034. [[CrossRef](#)]
 60. Machado, J.P.B.; Calil, I.P.; Santos, A.A.; Fontes, E.P. Translational control in plant antiviral immunity. *Genet. Mol. Biol.* **2017**, *40*, 292–304. [[CrossRef](#)]
 61. Carvalho, C.M.; Santos, A.A.; Pires, S.R.; Rocha, C.S.; Saraiva, D.I.; Machado, J.P.B.; Mattos, E.C.; Fietto, L.G.; Fontes, E.P.B. Regulated Nuclear Trafficking of rpl10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 62. Rocha, C.S.; Santos, A.A.; Machado, J.P.B.; Fontes, E.P. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology* **2008**, *380*, 165–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

CAPÍTULO II

The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity

Artigo publicado no dia 01 de novembro de 2019 na revista *Nature Communication*, nº 4996.

Bo Li, Marco Aurélio Ferreira, Mengling Huang, Luiz Fernando Camargos, Xiao Yu, Ruan M. Teixeira, Paola A. Carpinetti, Giselle C. Mendes, Bianca C. Gouveia-Mageste, Chenglong Liu, Claudia S. L. Pontes, Otávio J. B. Brustolini, Laura G. C. Martins, Bruno P. Melo, Christiane E. M. Duarte, Libo Shan, Ping He & Elizabeth P. B. Fontes (2019). The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. (doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12847-6>).

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12847-6>

OPEN

The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity

Bo Li^{1,2,10*}, Marco Aurélio Ferreira^{3,4,10}, Mengling Huang^{1,2}, Luiz Fernando Camargos^{3,4,7}, Xiao Yu⁵, Ruan M. Teixeira^{3,4}, Paola A. Carpinetti⁴, Giselle C. Mendes^{3,4,8}, Bianca C. Gouveia-Mageste³, Chenglong Liu⁵, Claudia S.L. Pontes³, Otávio J.B. Brustolini^{3,9}, Laura G.C. Martins^{3,4}, Bruno P. Melo^{3,4}, Christiane E.M. Duarte^{3,4}, Libo Shan⁵, Ping He⁶ & Elizabeth P.B. Fontes^{3,4*}

Plants deploy various immune receptors to recognize pathogens and defend themselves. Crosstalk may happen among receptor-mediated signal transduction pathways in the same host during simultaneous infection of different pathogens. However, the related function of the receptor-like kinases (RLKs) in thwarting different pathogens remains elusive. Here, we report that NIK1, which positively regulates plant antiviral immunity, acts as an important negative regulator of antibacterial immunity. *nik1* plants exhibit dwarfed morphology, enhanced disease resistance to bacteria and increased PAMP-triggered immunity (PTI) responses, which are restored by NIK1 reintroduction. Additionally, NIK1 negatively regulates the formation of the FLS2/BAK1 complex. The interaction between NIK1 and FLS2/BAK1 is enhanced upon flg22 perception, revealing a novel PTI regulatory mechanism by an RLK. Furthermore, flg22 perception induces NIK1 and RPL10A phosphorylation in vivo, activating antiviral signalling. The NIK1-mediated inverse modulation of antiviral and antibacterial immunity may allow bacteria and viruses to activate host immune responses against each other.

¹ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China. ² The Provincial Key Lab of Plant Pathology of Hubei Province, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China. ³ National Institute of Science and Technology in Plant–Pest Interactions, Bioagro, Viçosa, MG 36570.900, Brazil. ⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570.900, Brazil. ⁵ Department of Plant Pathology and Microbiology, Institute for Plant Genomics and Biotechnology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. ⁶ Department of Biochemistry and Biophysics, Institute for Plant Genomics and Biotechnology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. ⁷ Present address: Federal Institute of Education from Goiás, Science and Technology, Urutaí, GO 75790-000, Brazil. ⁸ Present address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Rio do Sul, SC 89163-356, Brazil. ⁹ Present address: Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Petrópolis, RJ, Brazil. ¹⁰ These authors contributed equally: Bo Li, Marco Aurélio Ferreira. *email: boli@mail.hzau.edu.cn; bbfontes@ufv.br

Plants recognize potential pathogens mainly through two classes of distinct immune receptors^{1–3}. The first class of immune receptors is cell-surface-associated pattern recognition receptors (PRRs), which are often represented by receptorlike kinases (RLKs) and receptor-like proteins (RLPs). PRRs recognize conserved structural motifs present in microbes, known as microbe- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs/ PAMPs), or endogenous danger signals released by the host during wounding or pathogenic attack, termed as damage-associated molecular patterns (DAMPs)⁴. Perception of PAMPs by PRRs activates PAMP-triggered immunity (PTI), which inhibits a broad spectrum of potential pathogens, including bacteria, viruses, fungi, and oomycetes¹. The second class of immune receptors includes intracellular immune receptors, which are designated as resistance (R) proteins^{3,5}. These intracellular receptors directly or indirectly recognize avirulent effectors secreted by the pathogens into the host intracellular environment, thereby activating effector-triggered immunity (ETI), which is often associated with the hypersensitive response.

Plants counteract viral infection by employing both PTI and ETI^{6–8}. An additional antiviral defence mechanism, which was uncovered recently, relies on host translation suppression mediated by a transmembrane immune receptor, nuclear shuttle protein (NSP)-interacting kinase 1 (NIK1)⁹. NIK1 belongs to the leucine-rich repeat (LRR) subfamily II of the RLK superfamily and was first identified as virulence targets of the begomovirus NSPs^{10–13}. Loss of NIK1 function increases susceptibility to viral infection, whereas enhanced accumulation of NIK1 confers tolerance to begomovirus¹⁰. The mechanistic model for NIK1-mediated antiviral signalling stipulates that, upon virus perception, NIK1 undergoes dimerization to transphosphorylate a threonine position 474, leading to kinase activation^{14,15}. Activated NIK1 phosphorylates the ribosomal protein RPL10, which in turn translocate into the nucleus, where it interacts with the RPL10-interacting Myb domain-containing protein (LIMYB) to repress the expression of translation-related genes^{16–18}. The prolonged downregulation of translation machinery-related genes causes suppression of global protein synthesis, reducing the association not only of host messenger RNAs (mRNAs) but also of viral mRNAs with actively translating polysomes in infected cells, thereby preventing viral protein synthesis^{18,19}. Therefore, this downregulation of cytosolic translation at least partially underlies the molecular mechanisms involved in NIK1-mediated antiviral defence.

NIK1 configuration resembles the structural organization of the somatic embryogenesis receptor kinases (SERKs), the other members of the LRR-II-RLK subfamily²⁰. This subfamily is further divided into (i) a cluster of five SERKs (1–5), (ii) a cluster of RLKs with unknown function and (iii) a cluster of NIK1-like receptors. Among the SERKs, SERK3, also named as brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1 (BAK1), is the most well-characterized subfamily member and, together with SERK4, functions as a co-receptor of several PRRs, such as flagellin sensing 2 (FLS2), elongation factor-thermo unstable receptor or plant elicitor peptide 1 receptor 1, which perceive specific PAMPs/DAMPs and trigger or amplify PTI^{21–24}. In addition, members of SERKs complex with various endogenous peptide receptors to regulate plant development²⁵.

Recently, we showed that loss of *NIK1* function up-regulates the expression of immune response-associated genes, suggesting a negative role of NIK1 in plant antibacterial immunity in contrast to its positive role in antiviral defence⁹. Emerging evidence has indicated that NIK1 exhibits a role in modulating PTI²⁶. However, the underlying molecular link remains unclear. Here, we demonstrate that loss of *NIK1* function in *Arabidopsis* leads to

increased resistance to bacterial pathogens. Furthermore, NIK1 associates with BAK1 and FLS2 and the NIK1 interaction was strengthened upon flagellin-derived flg22 treatment. Our results indicate that NIK1 inversely modulates antiviral and antibacterial immunity in plants, which may be dependent on the phosphorylation status of the protein.

Results

NIK1 function in resistance to viral and bacterial pathogens. Although NIK1 and BAK1 are conserved and belong to the LRR-II-RLK subfamily, the mechanism of NIK1-mediated antiviral defence is distinct from that of BAK1-mediated PTI. Furthermore, the transcriptome induced by NIK1 activation seems to oppose the BAK1-mediated response^{9,18}. To further examine the contribution of NIK1 to plant immunity, we analysed the differentially expressed genes in *nik1-1* seedlings (Supplementary Fig. 1a) (<http://inctipp.bioagro.ufr.br/Arabidopsnik0/>) using the eigenvector centrality method²⁷ and the *Arabidopsis* pathogen interactome network database (http://interactome.dfci.harvard.edu/A_thaliana; Supplementary Fig. 2a). An important hub of upregulated genes in *nik1-1* is represented by genes involved in salicylic acid (SA) signalling. Upregulation of the SA signalling-associated *PR1* gene in *nik1-1* mutants, but not in *nik2-1* and *nik3-1* mutants, was confirmed by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR), which was associated with increased SA accumulation (Supplementary Fig. 2b, c). These results suggest that a subset of SA-related defence responses is constitutively activated in *nik1-1*-null mutant plants, consistent with the stunted growth, increased H₂O₂ accumulation and elevated cell death observed in *nik1-1* mutants (Supplementary Fig. 2d–f).

Despite enhanced accumulation of free SA in *nik1-1* mutants, we have previously demonstrated that *nik1-1* displays an enhanced susceptibility phenotype to begomovirus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) infection (Fig. 1a)^{10,16}. Elevated accumulation of viral DNA in *nik1-1* compared to Col-0 is most likely due to inactivation of the NIK1-mediated antiviral defence, which protects plant against DNA viruses^{18,19}. However, the effectiveness of NIK1's antiviral function against RNA viruses has not been evaluated. To address this issue, *Tobacco rattle virus* (TRV) was first propagated in *Nicotiana benthamiana* and rubinoculated in *Arabidopsis*. The results revealed that relative levels of TRV genomic RNA were significantly higher in *nik1-1* than in Col-0 (Fig. 1b), indicating that increased endogenous SA and constitutive expression of SA-related genes are not sufficient to confer resistance to TRV. Enhanced susceptibility of *nik1-1* to TRV was due to the loss of NIK1 function, as ectopic expression of *NIK1-GFP* restored the enhanced susceptibility phenotype in the knockout line (Supplementary Fig. 1d). These results indicate that NIK1 antiviral function is likely independent of the SA pathway and more important than over-accumulation of SA in controlling both DNA and RNA viral infections.

Constitutive activation of *nik1-1* defences is consistent with recent data from network-centric analyses of the LRR-based cell-surface interaction network (CSI^{LRR}), which implicated NIK1 as one of the 35 predicted LRR-RLK pathogen effector targets and most influential spreaders of information in CSI^{LRR} network^{26,28}. In this investigation, we applied the approximation maximum cut algorithm, which divided the CSI^{LRR} network into two major groups, clustering NIK1/NIK2 together and NIK3 as a separate group (Fig. 1c). As this algorithm aims to identify a cut that maximizes connections between the two resulting sides, separation of a NIK1/NIK2 cluster from NIK3 might indicate that NIK1 and NIK3 differ in function and regulate at least two independent cellular processes. In contrast, NIK1 and NIK2 may share functional redundancies, although the degree of centrality

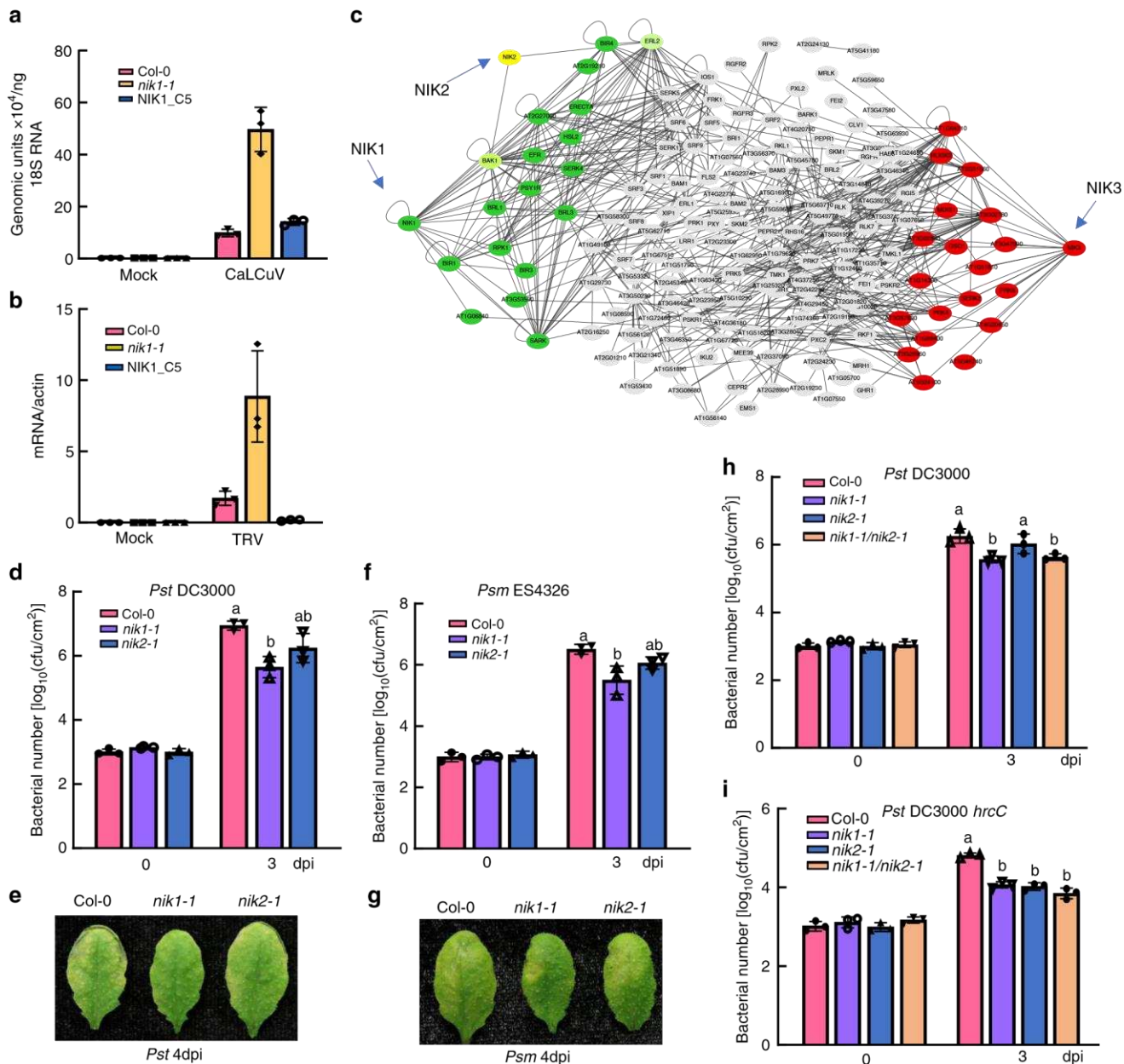


Fig. 1 Opposite roles of NIK1 in resistance to viral and bacterial pathogens. **a** Quantification of CaLCuV genomic units in infected plants and mockinoculated plants. Col-0, *nik1-1* and NIK1_C5 plants were inoculated with infectious CaLCuV DNA-A and DNA-B clones by biolistic delivery and viral DNA accumulation was determined by qPCR at 14 dpi using 18S rDNA as endogenous control. **b** Relative accumulation of TRV in infected and mock-inoculated plants. TRV from *N. benthamiana*-infected leaves was sap inoculated to *Arabidopsis* leaves and TRV expression was monitored by qRT-PCR. Error bars, 95% confidence intervals based on bootstrap resampling replicates of four independent ($n = 4$) experiment in **a**, **b**. **c** Major NIK1, NIK2 and NIK3 interacting clusters derived from the cell-surface interaction network of *Arabidopsis thaliana* leucine-rich repeat receptor-like kinase (CSILRR). The approximation maximum cut algorithm was used to rearrange the CSILRR network into clusters of NIK1, NIK2 and NIK3- directly interacting proteins. **d** Bacterial growth of *Pst* DC3000 post infection. Leaves of 4-week-old plants Col-0, *nik1-1* and *nik2-1* were hand infiltrated with bacterial suspensions of *Pst* DC3000 at a density of 5×10^5 CFU/mL, and bacterial populations were quantified at 0 and 3 dpi. **e** Disease symptoms on leaves post *Pst* DC3000 infection. Images were taken at 4 dpi. **f** Bacterial growth of *Psm* ES4326 post infection. Similar experiments were performed as in **d** with *Psm* ES4326 inoculation. **g** Disease symptoms post *Psm* ES4326 infection. Images were taken at 4 dpi. **h** Growth of *Pst* DC3000 3 days post infection. Four-week-old plants of Col-0, *nik1-1*, *nik2-1* and *nik1-1/nik2-1* double mutants were hand-inoculated with *Pst* DC3000. **i** Growth of *Pst* DC3000 *hrcC* 3 days post infection. The above experiments were repeated three times with similar results. Different letters denote significant differences among bacterial number of distinct genotypes by the one-way ANOVA test ($p < 0.05$). Source data are provided as a Source Data File.

demonstrates that NIK1 may strongly influence the spread of information²⁶.

In contrast to viral infection phenotype, we found that *nik1-1*-knockout plants were more resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 and *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*)

ES4326, as bacterial growth was significantly reduced in the *nik1-1*-knockout line relative to wild-type (WT) plants (Fig. 1d, f) and disease symptoms were attenuated in *nik1-1*-knockout mutants (Fig. 1e, g). NIK2 did not exhibit obviously negative modulation of resistance against *Pst* and *Psm*, suggesting

differential relevance to the immune response between paralogous NIK1 and NIK2. The *nik1-1* allele has been previously described¹⁰ and further characterized herein using RNA-sequencing (RNA-seq) (Supplementary Fig. 1b, c). Importantly, we showed that inhibition of *Pst* growth in *nik1-1*-knockout mutants was restored by ectopic expression of NIK1 (Supplementary Fig. 3a, b). Therefore, loss of NIK1 function enhances bacterial resistance, which is in marked contrast with the enhancement of viral susceptibility in *nik1-1* null mutants.

To further characterize whether NIK1 and NIK2 exhibit redundant functionality in antibacterial immunity, we generated *nik1-1/nik2-1* double mutants (Supplementary Fig. 1e–h) and assayed for bacterial infection. Infection with *Pst* DC3000 was reduced in *nik1-1*, but not in *nik2-1*, while remaining inhibited in the *nik1-1/nik2-1* double mutant to the same extent as in *nik1-1*, strengthening the assumption that NIK2 does not affect resistance to *Pst* DC3000 (Fig. 1h). Likewise, we did not observe a synergistic or additive effect on the inhibition of *Pst* DC3000 hrcC growth, the nonpathogenic *Pst* DC3000 type III secretion mutant, in the double mutant *nik1-1/nik2-1* compared to bacterial growth in the single mutants (Fig. 1i). Notably, *nik2-1* mutants showed more susceptibility to the nonpathogenic strain hrcC, consistent with previous results²⁶. While partial redundancy between these paralogous genes may exist with respect to modulating PTI, these results suggest that NIK1 and NIK2 may either modulate different, non-overlapping aspects of the same pathway or act upon distinct signal transduction pathways of the immune responses.

Elevated early PTI responses in *nik1-1* mutants. To further examine the mechanism by which NIK1 negatively modulates antibacterial immunity, we activated PTI using flg22 and monitored the readouts of PTI activation in the *nik1-1*- and *nik2-1*-knockout mutants. As early responses, flg22 induced increased ROS accumulation and enhanced MAP kinase activation in the *nik1-1* line compared to Col-0, whereas the mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, but not reactive oxygen species (ROS) burst, was also elevated in *nik2-1*, although to a lesser extent (Fig. 2a–c). Stronger activation of MAPKs in *nik1-1* was followed by greater induction of the PTI-associated marker genes FRK1, *WRKY30*, and *PP2C*, whereas *WRKY30* and *PP2C* were also increased in the *nik2-1* mutant (Fig. 2d). However, the expression of calcium-dependent protein kinase pathway-specific marker gene PH11 was not further increased in *nik1-1* and *nik2-1* mutants (Fig. 2e), potentially indicating that NIK1 and NIK2 are not implicated in the Ca²⁺ signalling branch. Subsequently, increased callose deposits were observed in *nik1-1*, but not in *nik2-1* (Fig. 2f, g). As *nik2-1* mutants display moderate enhancement of immunity, NIK2 may regulate only certain branches of the PTI response. The enhanced resistance phenotype and PTI responses of *nik1-1* mutants were due to inactivation of NIK1 function, as ectopic expression of NIK1 in the *nik1-1* background restored the WT phenotype, as determined by ROS production and MAPK activation (Supplementary Fig. 3c–e). Furthermore, another transfer DNA (T-DNA) insertion mutant *nik1-2* supported less bacteria growth and displayed higher ROS production and MAPK activity compared to Col-0 (Supplementary Fig. 3f–h). Enhanced PTI activation was easily discernible in *nik1* mutants, demonstrating a more accentuated effect of NIK1 in the negative regulation of PTI among members of the NIK-like subfamily of LRR/RLK proteins. Therefore, NIK1 loss-of-function induces an enhanced flg22-induced immune response, a phenotype restored by NIK1 complementation.

Interestingly, the *nik1-1*-knockout line accumulated higher levels of AS in a primed state, as infection with *Pst* caused the

further accumulation of SA to a much higher level than that observed in WT lines (Supplementary Fig. 4a). Therefore, the loss of NIK1 function induces constitutive activation of immune responses, which are further amplified by the bacterial infection. SA signalling has previously been demonstrated to be required for early as well as late flg22 responses^{29,30}. To understand whether the robustness of NIK1 modulation of PTI displayed in the *nik1-1* mutant is a result of increased SA accumulation in *nik1-1*, we generated *nik1-1/sid2-5* double mutants (Supplementary Fig. 4b, c). ROS burst in double mutants remained significantly higher than Col-0, but flg22-induced MAPK activity was greatly attenuated in *sid2-5* and *nik1-1/sid2-5* double mutants compared to *nik1-1* mutants (Supplementary Fig. 4d, e). Treatment with BTH, an agonist of the SA pathway, induces the accumulation of MPK3 and MPK6 in *Arabidopsis*³¹; however, MPK3 and MPK6 were not more abundant in *nik1-1* mutants than Col-0, as monitored by α -MPK3 and α -MPK6 antibodies (Supplementary Fig. 4f, g). This result indicates that the stronger MAPK activity in response to flg22 is not due to increases in endogenous MPK protein levels.

As NIK1 negatively regulates most of the flg22-induced PTI responses, we next examined whether NIK1 requires the coreceptor BAK1 for the negative modulation of PTI. We generated *nik1-1/bak1-4* double mutants by crossing (Supplementary Fig. 5a), and disruption of NIK1 and BAK1 expression was confirmed by RT-PCR (Supplementary Fig. 5b). Upon flg22 treatment in the *nik1-1/bak1-4* double mutant, MAPK activation (Supplementary Fig. 5c, d) and induction of the defence genes, *PP2C* and *WRKY29*, were as low as in the *bak1-4* mutant (Supplementary Fig. 5e, f), indicating that NIK1 requires BAK1 to suppress flg22-triggered PTI responses. Collectively, these results indicate that NIK1 functions as a negative regulator of flg22-triggered immune responses.

NIK1 binding to FLS2/BAK1 is enhanced by flg22 signalling.

For the biochemical mechanism of negative modulation, we examined whether NIK1 directly interacts with the flg22 receptor FLS2 and with the co-receptor BAK1 by Y2H assay. Yeast expressing NIK1 kinase domain (NIK1K) and FLS2 kinase domain (FLS2K) or BAK1 kinase domain (BAK1K) grew on the deficient media, indicating that NIK1 interacts with BAK1 and FLS2 in yeast (Fig. 3a). We also demonstrated the interaction between NIK1 and these receptors by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay in tobacco, since the reconstructed yellow fluorescent protein (YFP) signal was observed in cells containing NIK1-nYFP and FLS2-cYFP, but not in the control cells (Fig. 3b). BiFC assays confirmed that the formation of NIK1/FLS2 or NIK1/BAK1 complexes occurred in the plasma membrane of tobacco epidermal cells independent of the orientation of the NIK1 fusions (N terminus or C terminus of YFP) (Supplementary Fig. 6). *Escherichia coli*-produced MBP-FLS2JK or MBP-BAK1JK, also tagged with HA, were pulled down by GST-NIK1JK, indicating direct interactions in vitro (Fig. 3c).

In addition, we confirmed the in vivo association between NIK1 and FLS2 or BAK1 in *Arabidopsis* using co-immunoprecipitation (Co-IP) assays. NIK1-HA was co-immunoprecipitated from extracts co-transfected with BAK1-FLAG and FLS2-FLAG using anti-FLAG agarose without flg22 treatment (Fig. 3d, e) demonstrating the association of NIK1-HA with BAK1-FLAG and FLS2-FLAG in the absence of flg22. Interestingly, flg22 treatment promoted the NIK1 association with the FLS2/BAK1 complex, as demonstrated by the amount of co-immunoprecipitated NIK1 in the presence of flg22 (Fig. 3f). Therefore, binding of NIK1 to both FLS2 and BAK1 occurs constitutively and is further enhanced in response to flg22 treatment.

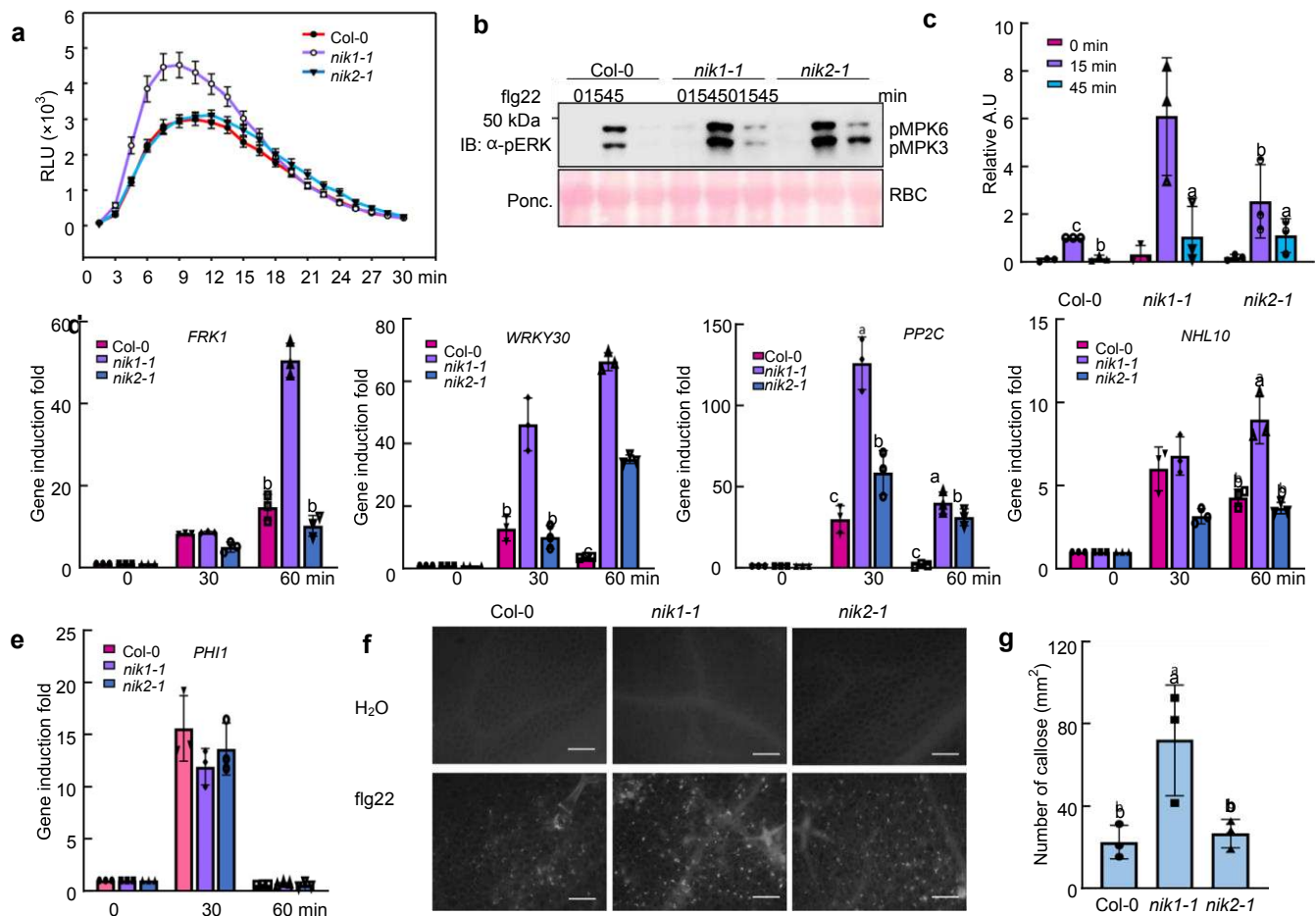


Fig. 2 Elevated PTI early responses in *nik1-1*-null mutants. **a** Flg22-induced ROS burst in WT, *nik1-1* and *nik2-1* plants. Leaf discs from 5-week-old plants were treated with water or 500 nM flg22 for 30 min, and the relative light units (RLU) were detected. Values represent the mean \pm SE ($n > 10$). **b** Flg22-induced MAPK activation in WT, *nik1-1* and *nik2-1* plants. Ten-day-old seedlings from the Col-0-, *nik1-1*- and *nik2-1*-knockout lines were treated with 100 nM flg22 and harvested at 0, 15 and 45 min post treatment. MAPK activation was monitored by immunoblotting total protein extracts with an α -pERK antibody (top panel). Protein loading was evaluated by Ponceau S staining for Rubisco (RBC) (bottom panel). **c** Quantitative data for MAPK activity signals. ImageJ was used to quantify signal intensity. Different letters denote significant differences by the one-way ANOVA test ($n = 4$, $p < 0.05$). **d** Relative induction of the PTI-associated marker genes *FRK1*, *WRKY30*, *PP2C* and *NHL10*. Ten-day-old seedlings were treated with 100 nM flg22 for 30 and 60 min. Total RNA was extracted for qRT-PCR analysis. Values represent the mean \pm SD of five biological replicates. Different letters denote significant differences by the one-way ANOVA test ($p < 0.05$). **e** Gene induction of the CPK pathway-specific marker gene *PH11* upon flg22 treatment. **f** Flg22-induced callose deposition in WT, *nik1-1* and *nik2-1* plants. Leaves of 5-week-old plants were infiltrated with 500 nM flg22 for 12 h and callose was detected by aniline blue staining. **g** Callose deposition triggered by flg22 treatment. The number in each image was quantified using the ImageJ software, and values represent the mean \pm SD ($n = 10$). Different letters denote significant differences by the one-way ANOVA test ($p < 0.05$). Source data are provided as a Source Data file

NIK1 negatively modulates FLS2/BAK1 interaction and immunity. The dynamics of NIK1 binding to the FLS2-BAK1 immune complex differ from that of another negative modulator of PTI, BIR2. Unlike NIK1, BIR2 does not interact with a cognate receptor and is released from BAK1 upon ligand perception³². These differences prompted us to investigate whether NIK1 directly modulates FLS2/BAK1 complex formation or inhibits signalling downstream of complex formation. We coimmunoprecipitated FLS2 with BAK1 from *nik1-1*-knockout lines or from NIK1-overexpressing protoplasts that had been treated with flg22 and compared the efficiency of complex formation in these samples to samples derived from Col-0. Loss of NIK1 function increased the efficiency of flagellin-dependent FLS2/BAK1 complex formation (Fig. 4a, b). Further, we also showed that endogenous FLS2 and BAK1 do not over-accumulate in *nik1-1* mutants, indicating that the enhanced interaction was not due to elevated protein levels

(Supplementary Fig. 4h, i). Consistently, NIK1-HA overexpression affected the flg22-induced FLS2/BAK1 complex formation, as the amount of FLS2 that coimmunoprecipitated with BAK1 in the *NIK1*-expressing sample was lower than that in the controls (Fig. 4c, d). These results indicate that NIK1 has a negative regulatory effect on BAK1/FLS2 complex formation, and this function is enhanced upon flg22 treatment to interfere with the activated receptor complex.

To further verify the negative role of NIK1 in the flg22 mediated PTI signalling pathway, we generated NIK1-6HA overexpressing lines driven by the 35S promoter in the Col-0 WT background. Two independently transformed lines with similar protein expression levels were chosen for immune response assays (Fig. 4e). Overexpressing lines are more susceptible to *Pst* DC3000 infection compared to WT plants. The bacterial vgrowth in overexpressing lines was approximately five-fold greater than

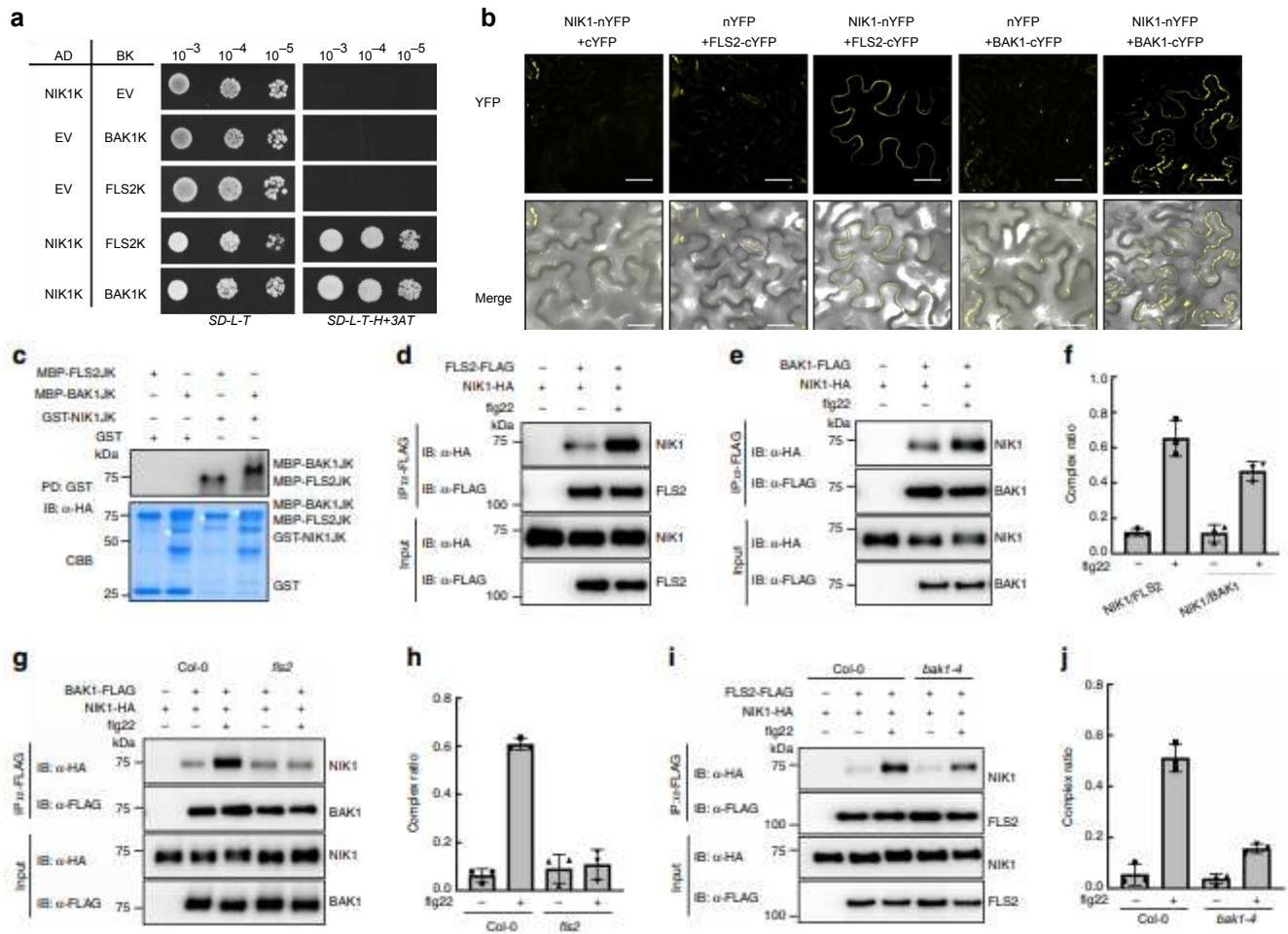


Fig. 3 Interaction between NIK1 and the FLS2/BAK1 receptor complex is enhanced in response to flg22 signalling. **a** Interaction of NIK1 with BAK1 or FLS2 in Y2H assay. The kinase domains of NIK1, BAK1 or FLS2 were expressed in yeast as GAL4 activation domain (AD) fusions or binding domain (BD) fusions. EV indicates the empty vectors for either pGAD7 or pGBT7. **b** In vivo interaction between NIK1 and BAK1 or FLS2 by BiFC analysis. Fluorescence (YFP) and bright field confocal images were acquired of tobacco leaves co-expressing the indicated fusion proteins in the presence of HC-Pro suppressor 48 h after agro-infiltration with the indicated DNA constructs. Scale bars = 20 μ m. **c** NIK1 directly interacts with BAK1 or FLS2 in vitro. GST or GST-NIK1JK immobilized on glutathione Sepharose beads was incubated with MBP, MBP-FLS2JK or MBP-BAK1JK proteins. Beads were washed and pelleted for immunoblot analysis with α -HA antibody. PD, pull-down. **d**, **e** NIK1 associates with FLS2 or BAK1 and these interactions are strengthened by flg22 treatment. *Arabidopsis* protoplasts were co-transfected with NIK1-HA and FLS2-FLAG, BAK1-FLAG or an empty vector control. Protoplasts were treated with (+) or without (-) 100 nM flg22 for 15 min before harvesting. Co-IP was performed with α -FLAG Agarose (IP: α -FLAG), and proteins were analysed using immunoblots with an α -HA antibody (IB: α -HA). **f** Quantitative data for **d**, **e**. Signal intensity was quantified using the ImageJ software, and values represent the mean \pm SD ($n = 3$). **g** Flg22-enhanced NIK1 and BAK1 interaction was abolished in a *fls2* mutant background. NIK1-HA and BAK1-FLAG were co-expressed in Col-0 or *fls2* protoplasts, and flg22 treatments were performed before samples collection. **h** Quantitative data for **g**. Images were quantified using the ImageJ software, and values represent the mean \pm SD ($n = 3$). **i** Flg22-enhanced NIK1 and FLS2 interaction is largely reduced in a *bak1-4* mutant background. NIK1-HA and FLS2-FLAG were co-expressed in Col-0 or *bak1-4* protoplasts, and treated with flg22 before sample collection. **j** Quantitative data for **i**. Co-IP signals were quantified using the ImageJ software, and values represent the mean \pm SD ($n = 3$). Source data are provided as a Source Data file

that in WT (Fig. 4f). Furthermore, both flg22-induced MAPK activation and ROS burst were also largely suppressed in NIK1overexpressing lines compared to Col-0 (Fig. 4g, h). In addition, the flg22 induction of *FRK1*, *WRKY30* and *NHL10* was decreased in transgenic plants compared to WT (Fig. 4i). Collectively, these data demonstrate that innate immunity is compromised in NIK1overexpressing plants, further substantiating the argument that NIK1 plays a negative role in FLS2 signalling.

NIK1 interaction with FLS2 or BAK1 and phosphorylation.

NIK1's interaction with BAK1 and FLS2 is enhanced upon flg22

treatment (Fig. 3d, e). We hypothesized that flg22-induced stronger interactions between NIK1 and BAK1 or FLS2 were a result of NIK1 conformational changes resulting from flg22-induced formation of an active FLS2-BAK1 complex. This hypothesis accommodates the argument that NIK1 may be modified by phosphorylation that triggers for a conformational change that would favour interaction. To examine this hypothesis, we first monitored whether the flg22-induced higher affinity of NIK1 binding to BAK1 and FLS2 would require the presence of both receptor and co-receptor, a pre-requisite for complex formation. In this case, we monitored Co-IP of NIK1 with BAK1 in the *fls2* mutant and with FLS2 in the *bak1-4* mutant, comparing

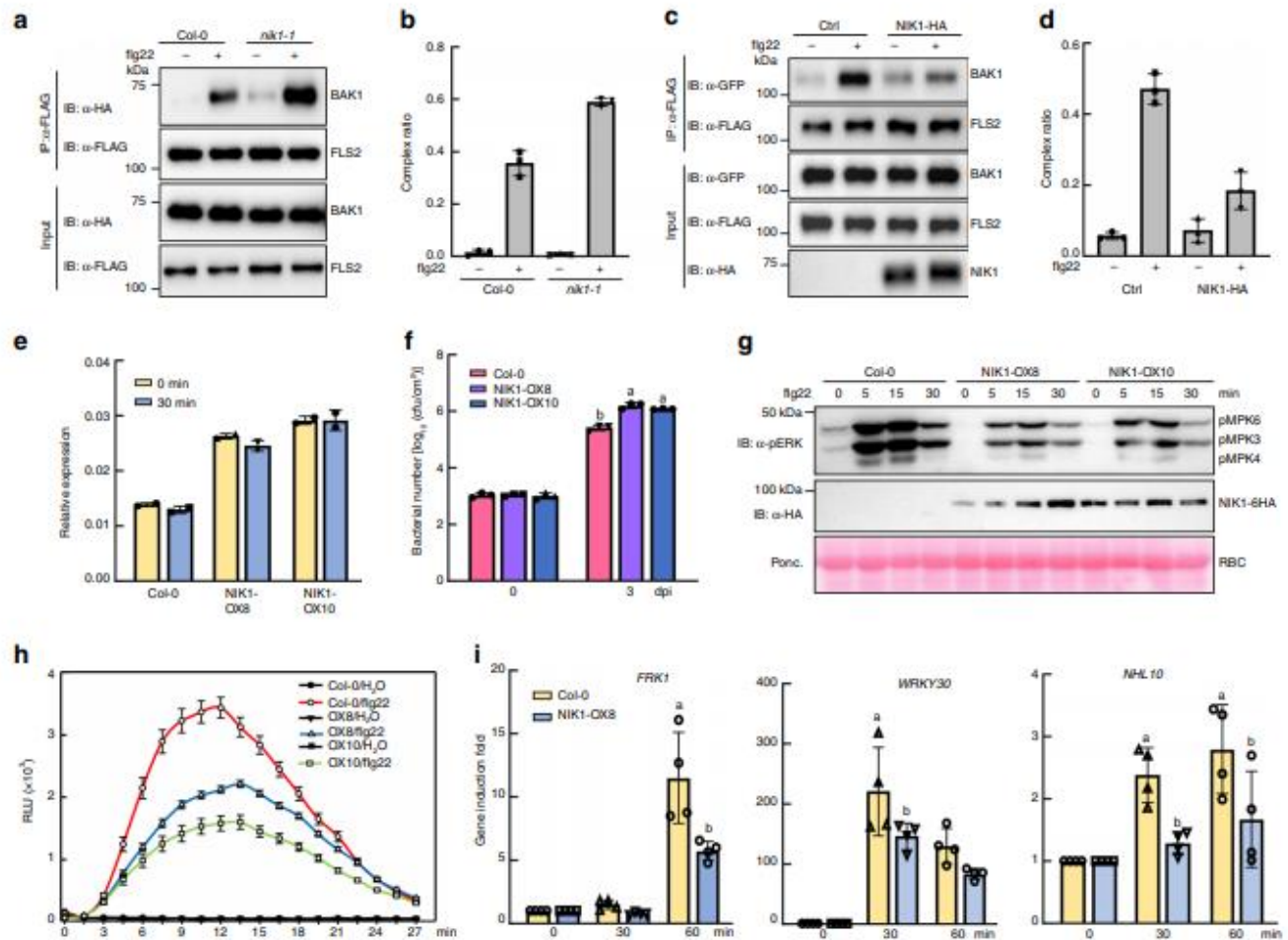


Fig. 4 NIK1 negatively modulates the flg22-induced FLS2/BAK1 complex formation. **a** Flg22-induced FLS2 and BAK1 interaction is reinforced in *ntk1-1* mutants. BAK1-HA and FLS2-FLAG were co-expressed in Col-0 or *ntk1-1* mutant protoplasts, and samples were treated with flg22 for 10 min before Co-IP was performed. **b** Quantitative data for **a**. Co-IP images were quantified using the ImageJ software, and values represent the mean \pm SD ($n = 3$). **c** Overexpression of NIK1 impairs FLS2/BAK1 immune complex formation. BAK-GFP and FLS2-FLAG were co-expressed with or without NIK1-HA in Col-0 protoplasts; protoplasts were treated with flg22 before Co-IP was performed. Immunoprecipitation was carried out with an α -GFP antibody (IP: α -GFP), and the proteins were analysed using immunoblots with α -FLAG, α -GFP or α -HA antibodies. **d** Quantitative data for **c**. Co-IP images were quantified using the ImageJ software, and values represent the mean \pm SD ($n = 3$). **e** NIK1 expression level in WT and overexpression lines. Total RNA was isolated from Col-0 and overexpression lines and the expression of NIK1 was monitored by qRT-PCR. **f** *Pst* DC3000 bacterial growth in WT and NIK1-OX lines. Four-week-old plants were hand-inoculated with pathogens, and bacterial populations were monitored at 0 and 3 dpi. Different letters denote significant differences among bacterial number of distinct genotypes by the one-way ANOVA test ($n = 3$, $p < 0.05$). **g** Flg22-induced MAPK activation in Col-0 and NIK1-OX lines. Ten-day-old seedlings from half MS plates were treated with flg22 and MAPK activation was monitored with an α -pERK antibody. **h** ROS burst is suppressed in NIK1-overexpressing transgenic lines. Leaf discs from soil grown plants were treated with water or 100 nM flg22 for 30 min, and RLU was measured. **i** qPCR analysis of PTI early response genes induction in NIK1-overexpressing plants. Ten-day-old seedlings were treated with flg22 for 30 and 60 min, and total RNA was extracted for qRT-PCR analysis. Values represent the mean \pm SE of three biological replicates. Different letters denote significant differences by the one-way ANOVA test ($n = 3$, $p < 0.05$). Source data are provided as a Source Data file

the resulting levels with those from Col-0 plants in the presence and absence of flg22. Under normal conditions, BAK1 and FLS2 are weakly bound to NIK1 in both the Col-0 and *fls2* or *bak1-4* lines (Fig. 3g, i). In Col-0, flg22 treatment increased the efficiency of interaction between NIK1 and BAK1. In contrast, flg22 did not increase NIK1 binding to BAK1 in *fls2* mutant lines (Fig. 3g, h) or to FLS2 in the *bak1-4*-knockout lines (Fig. 3i, j), suggesting that NIK1 may be a downstream target for FLS2-BAK1-mediated phosphorylation. This hypothesis was further examined using different approaches.

We first observed that NIK1 shows a rapid mobility shift upon flg22 treatment, which was displayed by the presence of multiple bands on a 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel (Fig. 5a). This mobility shift was

reversed by phosphatase (λ PP) treatment, indicating that the band shift was due to NIK1 phosphorylation (Fig. 5b). In addition, pretreatment with the kinase inhibitor K252a blocked the flg22-induced band shift (Fig. 5c). Importantly, the NIK1 band shift was not observed in *fls2* and *bak1-4* mutant backgrounds, but was restored by expression of FLS2, but not of a FLS2 kinase mutant (*km*), in *fls2* mutants (Fig. 5d, e). Flg22-induced phosphorylation of NIK1 was further demonstrated by probing immunoprecipitated NIK1-HA with anti-pThr, pSer and pTyr antibodies after flg22 treatment (Fig. 5f). Collectively, these results establish that flg22 induces phosphorylation of NIK1, which is dependent on the formation of an active BAK1-FLS2 complex.

To identify the kinase that is responsible for NIK1 phosphorylation, an *in vitro* kinase assay was performed using

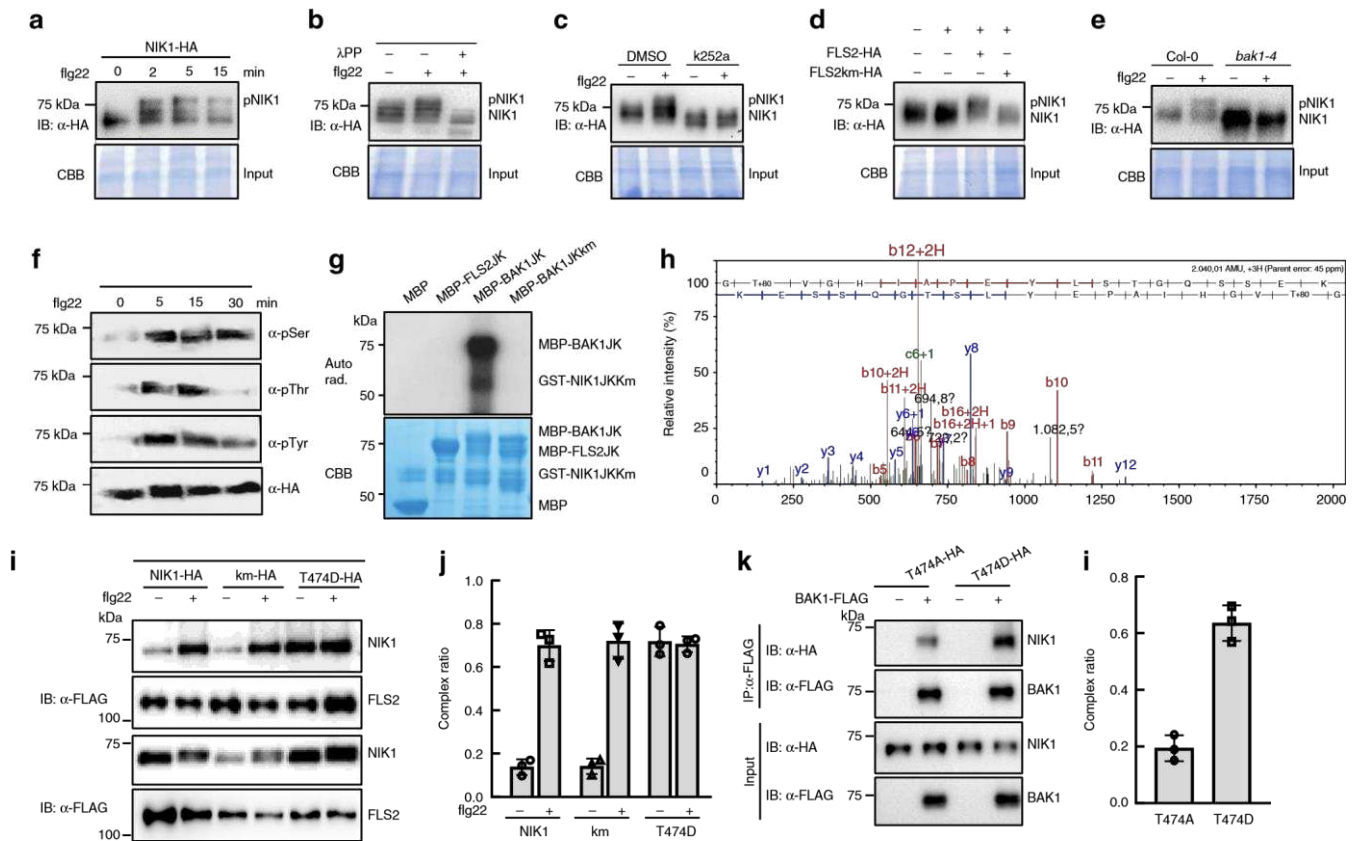


Fig. 5 Flg22 induces BAK1-mediated NIK1 phosphorylation, which enhances NIK1's affinity for receptors. **a** Flg22 perception triggers NIK1 rapid mobility shift. Protoplasts were transfected with NIK1-HA and treated with 100 nM flg22 for the indicated time points. Total input proteins were stained with Coomassie brilliant blue staining (CBB). **b** Verification of NIK1 *in vivo* phosphorylation by λ PP treatment. Protein extracts from protoplasts transfected with NIK1-HA were treated with λ PP following the standard protocol. **c** The kinase inhibitor K252a blocks flg22-induced NIK1 mobility shift. K252a was applied 1 h before flg22 treatment. Controls were solvent (DMSO) treatment. **d** Flg22-induced NIK1 phosphorylation requires FLS2 and its kinase activity. Protoplasts isolated from *fls2* mutants were transfected with NIK1-HA and empty vector control, FLAG-tagged FLS2 or FLS2 kinase mutant (FLS2km). **e** Flg22-mediated NIK1 phosphorylation requires BAK1. NIK1-HA was expressed in protoplasts of Col-0 or *bak1-4* mutants and flg22 was applied 10 min before samples collection. **f** Flg22-induced *in vivo* phosphorylation of NIK1 detected by different phospho-antibodies. Seedlings of NIK1-HA-overexpressing lines were treated with 100 nM flg22 for the indicated time points. NIK1-HA was immunoprecipitated from total protein extracts, fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with α -phosphoserine (α -pSer), α -phosphothreonine (α -pThr), α -phosphotyrosine (α -pTyr) and α -HA antibodies. **g** BAK1, but not FLS2, directly phosphorylates the NIK1 cytosolic domain. An *in vitro* kinase assay was performed using MBP-FLS2JK or MBP-BAK1JK as a kinase and GSTNIK1JKkm as the substrate. Phosphorylation was analysed by autoradiography (Upper), and the protein loading was shown by CBB (Lower). **h** NIK1 Thr474 is phosphorylated by BAK1 *in vitro* as shown by MS analysis. **i** Phosphorylation of NIK1 promotes its interaction with FLS2. FLS2-FLAG was co-expressed with NIK1-HA, NIK1km-HA or NIK1-T474D-HA in protoplasts. Co-IP was performed with α -FLAG Agarose (IP: α -FLAG), and the proteins were immunoblotted with an α -HA antibody (IB: α -HA). **j** Quantitative data ($n = 30$ for **h**, **k**). **k** A NIK1 phosphomimetic form shows stronger interaction with BAK1. Co-IP assay was performed with the sample co-expressing BAK1-FLAG and T474A-HA or T474D-HA using α -FLAG Agarose. **l** Quantitative data from three biological replicates for **j**. Source data are provided as a Source Data file

juxtamembrane domain and kinase domain of FLS2(FLS2JK) or BAK1JK as the kinase and NIK1JKkm as the substrate. The results demonstrated that BAK1JK directly phosphorylates NIK1JKkm (Fig. 5g). FLS2 is a non-RD kinase whose kinase activity is difficult to detect *in vitro*. As previously demonstrated, NIK1 undergoes dimerization and autophosphorylation on Thr474 to activate NIK1-mediated antiviral signalling¹⁸. We first showed that a peptide from the NIK1 activation loop is phosphorylated on T474 using purified recombinant GSTNIK1JK protein (Supplementary Fig. 7a–c), as determined by mass spectrometry analysis (Supplementary Fig. 7d, e). Likewise, the purified GST-BAK1JK fusion protein, but not a GST-FLS2JK fusion, phosphorylated the NIK1 A-loop peptide on the Thr474 residue, as determined by mass spectrometry (Fig. 5h, Supplementary Fig. 7f). These data suggest that BAK1 may directly phosphorylate NIK1 at Thr474 in the FLS2 signalling pathway.

The higher affinity of NIK1 for the FLS2/BAK1 immune receptor complex may be facilitated by phosphorylation on the Thr474 residue, as a phosphomimetic mutant NIK1-T474D displayed stronger association with FLS2 than NIK1 in the absence of flg22 stimulation (Fig. 5i, j). Similarly, increased levels of a phosphomimetic variant were co-immunoprecipitated by BAK1 compared to non-phospho variant (Fig. 5k, l). Interaction of NIK1-T474D with BAK1 and FLS2 was also monitored by BiFC (Supplementary Fig. 6). The reconstituted YFP signal mediated by T474D interactions with the receptors was consistently stronger than those mediated by NIK1 interactions.

We also generated a NIK1 kinase dead mutant by replacing the conserved Arg340 with Ala (hereafter NIK1^{km}) in the ATP binding pocket, which is no longer capable of autophosphorylation (Supplementary Fig. 8a). Interestingly, NIK1^{km} displayed an unaltered flg22-triggered band shift (Supplementary Fig. 8b) and

enhanced association with the FLS2/BAK1 immune complex similar to the WT form (Fig. 5i, Supplementary Fig. 8c). Furthermore, NIK1^{km} maintains suppression of FLS2/BAK1 receptor complex formation when co-expressed in *Arabidopsis* protoplasts (Supplementary Fig. 8d). Furthermore, MAPK activation and FRK1 reporter gene induction were suppressed in response to NIK1^{km} expression in *nik1-1*-null alleles, further indicating that the biological function of NIK1 in attenuating the FLS2 immune responses is not affected by its kinase activity (Supplementary Fig. 8e, f). Therefore, autophosphorylation of NIK1 is not required for its high affinity for the immune complex FLS2/BAK1 or its regulatory roles in FLS2 signalling. Collectively, these results indicate that NIK1 serves as a downstream target of the flg22-induced BAK1-FLS2 complex, which phosphorylates NIK1 to enhance NIK1's affinity for FLS2 and BAK1.

Flg22-induced NIK1 phosphorylation elicits antiviral defence.

We demonstrated that flg22 induces NIK1 Thr474 phosphorylation, which is mediated by an active immune complex, FLS2/BAK1. As Thr474 phosphorylation of NIK1 is critical for NIK1-mediated antiviral immunity, we then examined whether flg22-induced phosphorylated NIK1 activates the downstream translational control branch. Both flg22 treatment and NIK1-T474D expression induced RPL10 phosphorylation as shown by an antiphosphoserine antibody that was eliminated by phosphatase treatment (Fig. 6a). T474D-induced phosphorylation of RPL10 was used as a positive control¹⁶. As expected, flg22 treatment did not trigger RPL10 phosphorylation in the *nik1-1* mutant, but it was also not triggered in *bak1-4*, *fls2* mutants or *nik1-1/bak1-4* double mutants, confirming that flg22-induced activation of NIK1 antiviral signalling depends on FLS2/BAK1-mediated phosphorylation of NIK1 (Fig. 6b). This interpretation was further substantiated by analysing flg22-mediated regulation of the downstream components of NIK1-mediated antiviral signalling.

Downregulation of ribosomal protein (RP) genes is the downstream output of NIK1/RPL10/LIMYB-mediated defence signalling¹⁸; therefore, we speculated that flg22-induced NIK1 and RPL10 phosphorylation might also suppress RP gene expression. Based on published flg22 transcriptional profiles³³, we found RP genes were progressively downregulated by flg22 in a time-dependent manner post treatment (Supplementary Fig. 9a). To further confirm the flg22-mediated suppression of RP expression, we treated Col-0, *nik1-1*, *fls2* and *bak1-4* seedlings with flg22 and monitored expression of RP marker genes 30 min and 3 h post-treatment. While flg22 treatment for 30 min did not induce downregulation of RP genes (Supplementary Fig. 9b), in 3 h post-treatment, the expression of the RP marker genes RPL13A, RPL28A, RPS13B, RPS25B and RPL4A was suppressed in Col-0 plants (Fig. 6c–f and Supplementary Fig. 9c). However, flg22-mediated inhibition of marker genes was completely abolished in *nik1-1* seedlings and *nik1-1/nik2-1* double mutants. Likewise, flg22 treatment did not repress expression of RP marker genes in *fls2* and *bak1-4* or *nik1-1/bak1-4* mutants, confirming that FLS2/BAK1 is required for NIK1 and RPL10 phosphorylation (Fig. 6c–f and Supplementary Fig. 9c). Flg22 did not promote further repression of RP gene expression in T474D-overexpressing lines, demonstrating that NIK1 phosphorylation is downstream of the flg22-induced FLS2/BAK1 complex formation. Consistent with this interpretation, ectopic expression of the NIK1-T474D mutant in two independently transformed *bak1-4* lines (Supplementary Fig. 9f) and one transformed *fls2* line (Supplementary Fig. 9e) suppressed expression of RP marker genes to the same extent as the T474D expression in stably transformed Col-0 lines (Fig. 6g–i, Supplementary Fig. 9d). Collectively, our results indicate that flg22 activates NIK1-mediated

antiviral defence through BAK1-mediated phosphorylation of NIK1, establishing potential interplay between two innate immune pathways.

Discussion

As the first line of innate immunity, PTI is rapidly activated upon pathogen perception primarily to defeat host non-adapted or non-host pathogens^{4,34}. PRRs are ligand-dependent receptors with a high affinity for PAMPs; thus, receptor activation, which often includes association with a co-receptor, must be tightly controlled, because constitutive activation of defence responses adversely affects plant fitness and growth³⁵. Thus, the immune system is negatively controlled by several layers of regulation, including ubiquitin-mediated degradation of immune receptor PRRs³⁶, inhibition of active immune complex formation³², modulation of PRR phosphorylation³⁷ and negative regulation of downstream components³⁸. Here, we gained new insight into the mechanisms underlying the attenuation of PRR activation by preventing these receptors from constitutively signalling. We provided several lines of evidence that conclusively implicate the positive antiviral immune component NIK1 as a negative regulator of FLS2 and BAK1 receptor complex formation both before and after flg22 perception. First, we showed that loss of NIK1 function constitutively activates SA-related plant defences, conveying additional resistance to bacterial pathogens. Second, NIK1 inactivation enhanced PTI responses to flg22 treatment, as determined by increased ROS production, enhanced MAPK activation, induction of PTI-associated marker genes and increased callose deposition in *nik1-1* plants relative to WT plants. Third, under normal conditions, NIK1 interacts constitutively with FLS2 and BAK1, which seems to prevent activation of an autoimmune response. Finally, we showed that NIK1 controls FLS2/BAK1 heterodimerization, as the efficiency of complex formation and the immune responses depend on basal concentrations of NIK1. However, we also showed that NIK1 is not released from BAK1 and FLS2 upon flg22 treatment, instead it remained tightly associated with FLS2 and BAK1. This unprecedented mechanism of PTI inhibition contrasts sharply with previously described mechanisms of PTI inhibition by RLKs, such as BIR2³² and BIR3³⁹, which interact with BAK1 under normal conditions but is released from BAK1 upon flg22 perception.

We also provided several lines of evidence indicating that the higher affinity of NIK1 for the FLS2/BAK1 complex may be a result of BAK1-mediated NIK1 phosphorylation. We first showed that flg22-induced higher affinity of NIK1 for the immune receptor or its co-receptor requires the presence of the other signalling partner, indicating the need for formation of an active immune complex. Next, we demonstrated that flg22 induces NIK1 phosphorylation *in vivo*, which requires BAK1 and FLS2, and BAK1 phosphorylates NIK1 on the Thr474 residue *in vitro*. Finally, we showed that the phosphomimetic NIK1 variant T474D interacts more strongly with BAK1 and FLS2 than does WT NIK1, whereas the NIK1 mutant NIK1^{km}, which is no longer capable of autophosphorylation, retains the NIK1 standard binding profile. This latter result rules out the possibility that a higher NIK1 affinity for BAK1 and FLS2 is due to NIK1 autophosphorylation.

Furthermore, in this investigation, we showed that *nik1-1*-knockout mutants were more resistant to *Pst* and *Psm*, which differed from the previously reported phenotype displayed by the *nik1-2* alleles²⁶. Under our experimental condition, the *nik1-2* mutant displayed modest enhanced resistance to *Pst* compared with *nik1-1*, which was further supported by stronger PTI responses compared with WT. Our results suggest that *nik1-2* mutant is a relatively weak allele compared with *nik1-1* mutant,

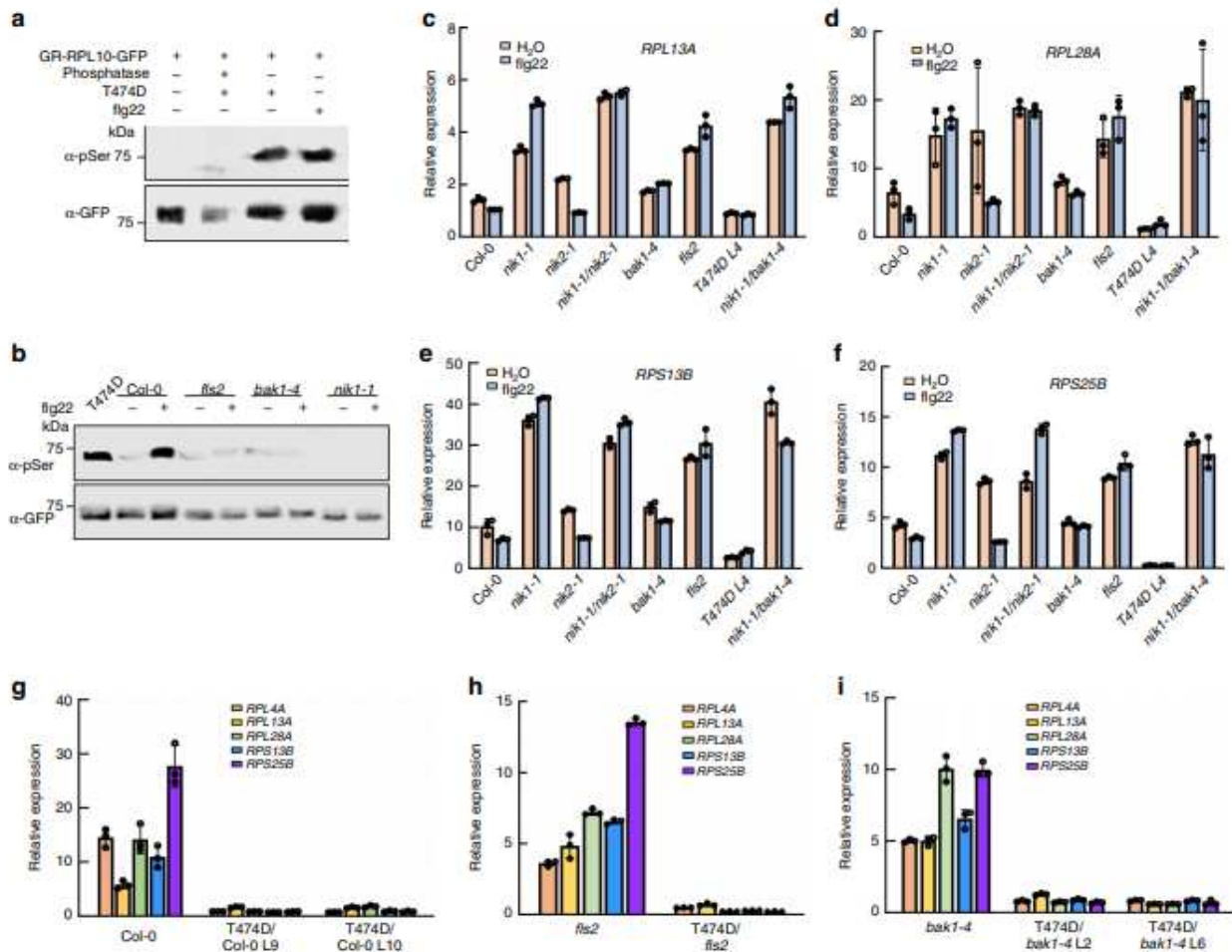


Fig. 6 Flg22 induces RPL10 phosphorylation and the translation control branch of antiviral signalling in a NIK1-, FLS2/BAK1-dependent manner. **a** Flg22 treatment induces RPL10 phosphorylation. RPL10 phosphorylation was detected by immunoblotting with an α -phosphoserine (α -pSer) antibody (top) and RPL10 protein is shown using an α -GFP antibody. The experiment was repeated three times with identical results. **b** RPL10 phosphorylation requires the FLS2/BAK1 receptor complex. RPL10 was expressed in protoplasts isolated from Col-0, *fls2*, *nik1-1* or *bak1-4* mutants for 12 h, and then flg22 treatment was performed. T474D-mediated RPL10 phosphorylation was used as a positive control. The experiment was repeated twice with similar results. **c–f** Flg22-induced downregulation of *RPL13A*, *RPL28A*, *RPS13B* and *RPS25B* is dependent on NIK1 and FLS2/BAK1. Seedlings of indicated plants were treated with flg22 for 3 h, and expression of ribosomal genes was analysed by qRT-PCR. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). **g** Overexpression of NIK1-T474D in WT Col-0 suppresses expression of ribosomal genes. qRT-PCR analysis of RP expression levels in Col-0- and T474D-overexpressing lines. **h, i** FLS2 and BAK1 are not required for the suppression of ribosomal genes by NIK1-T474D overexpression. Ribosomal marker gene expression levels were detected in *fls2*, *bak1-4* mutants and NIK1-T474D-overexpressing lines. The respective 95% confidence interval limits were estimated based on bootstrap resampling replicates of three independent ($n = 3$) experiments and three technical repeats. Source data are provided as a Source Data file

which may be due to differences in T-DNA insertion within the *NIK1* locus (Supplementary Fig. 1a). Precedents in the literature have shown that homozygous T-DNA insertion lines within the same locus display phenotypic variation with respect to several traits⁴⁰. In the case of the *nik1-1* alleles, we further demonstrated by complementation assays that the enhanced resistance phenotype to *Pst* was a result of *NIK1* disruption. We also showed that *nik1-1* alleles display enhanced SA content and develop cell death constitutively. Based on network-centric analyses of the leucinerich repeat (LRR)-based cell-surface interaction (CSI^{LRR}) network, NIK1 is predicted to function broadly in different layers of plant defences and to bind to BIR1 (Fig. 1c), a negative regulator of SOBIR1 and cell death⁴¹.

Our current findings, together with previous results^{16,18}, suggest a mechanistic model for the interaction of the NIK1-mediated antiviral signalling pathway with the antibacterial immunity

system (Fig. 7). In the absence of bacterial and viral infection, NIK1 is bound to FLS2 and BAK1 to prevent activation of an autoimmune response. NIK1 may control FLS2/BAK1 complex formation, as the efficiency of the immune response depends on basal concentrations of NIK1. Upon bacterial infection, flg22 is sensed by the FLS2 extracellular domain, which in turn recruits BAK1 into an active immune complex that phosphorylates NIK1 on its crucial Thr474 residue. This modification may result in two important effects in innate immunity. First, NIK1 more effectively binds to the FLS2/BAK1 receptor complex, thus inhibiting constant signalling activation and preventing immoderate immunity. Furthermore, the flg22-induced phosphorylation activates NIK1 to initiate the transduction of an antiviral signal through RPL10 phosphorylation and suppression of translational machinery-related gene expression. Therefore, flg22 treatment may promote plant resistance to viroses in a NIK1-dependent manner.

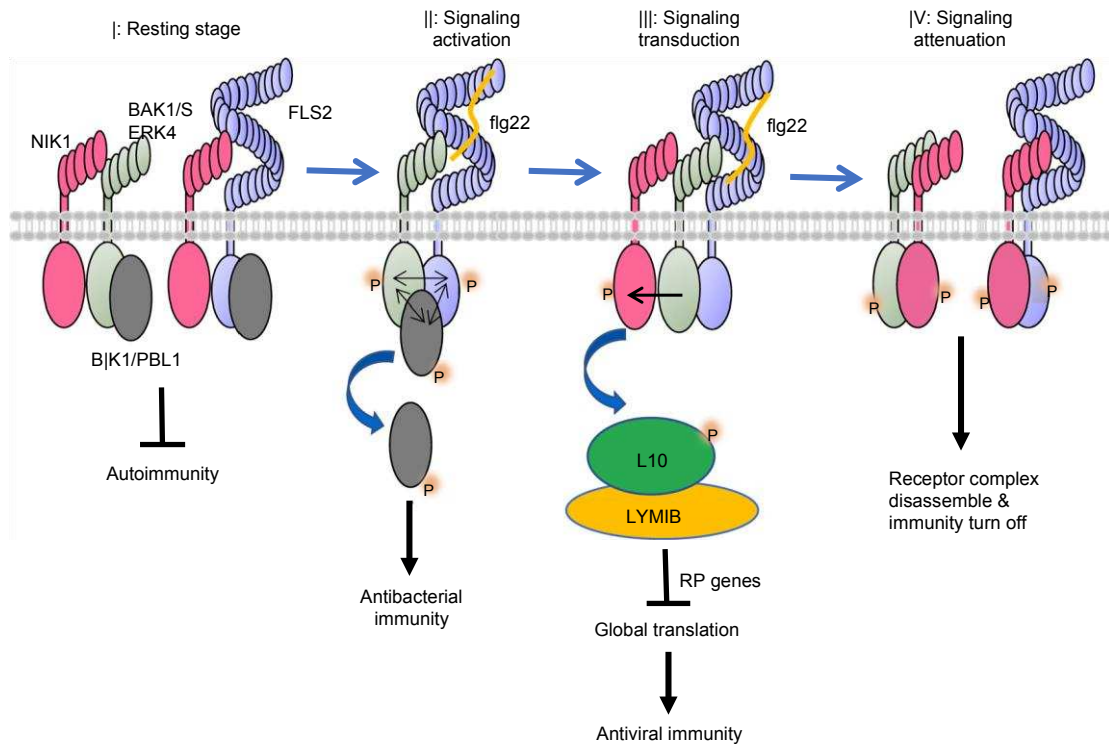


Fig. 7 Working model for NIK1 roles in FLS2 signalling pathway and flg22-induced translational control of NIK1 signalling. (I) At the resting stage, NIK1 associates with FLS2 or BAK1 to prevent autoimmunity without pathogen invasion. (II) Upon bacterial infection, flg22 is perceived by the immune receptor FLS2, which induces the heterodimerization with BAK1, also including RLCK BIK1 and its homologues. Phosphorylation events initiates the immune signalling, and BIK1 is released from the membrane to activate downstream signal. (III) During signalling transduction, BAK1 may phosphorylate NIK1 on Thr474 residues. Phosphorylated NIK1 leads to activation of an antiviral signal through RPL10 phosphorylation and suppression of translational machinery-related gene expression. (IV) At signalling attenuation stage, phosphorylated NIK1 exhibits higher affinity to FLS2 and BAK1, and these interactions may lead to receptor complex instability or disassembly, followed by FLS2 ubiquitination and degradation

As begomovirus infection has been previously demonstrated to suppress NIK1 antiviral function through the viral NSP suppressor, the sequential order of events may invoke a suppression-dependent mechanism to relieve NIK1-mediated negative modulation of the immune response. Therefore, viral infection prior to bacterial attack may prime the host for enhanced resistance against bacteria. The potential interaction and mechanism between these two innate immune pathways are worth additional study in the future.

A pitfall in these crosstalk studies, however, may be the finding that viral infection inhibits PTI directly via viral protein suppressors^{39,42,43}. Compelling evidence has invoked the classic transmembrane PRR-mediated PTI as part of the plant defence arsenal against viruses^{41,44,45}. Mutation of the PTI co-receptors BAK1 or BKK1 enhances susceptibility to RNA virus infection, demonstrating that they are required to build an effective defence against RNA viruses in *Arabidopsis*^{41,46}. Likewise, *serk1*-knockout lines are more susceptible to virus infection⁴⁵, and the *Arabidopsis* double mutant *bak1-5/bkk1* displays increased viral accumulation when inoculated with *Plum pox virus* (PPV)⁴². Therefore, it is not surprising that viral suppressors of PTI have been identified recently, including the PPV coat protein⁴², *Cauliflower mosaic virus* P6³⁹ and the movement protein (MP) from *Cucumber mosaic virus*⁴³. Although a negative role of the begomovirus NSP in PTI has not been addressed yet, NSP has also been shown to interact with BAK1¹². Therefore, viral protein-mediated suppression of PTI may impact the positive effect of sequestering the PTI inhibitor NIK1 into an antiviral mechanism during virus infection. These opposing effects of virus infection on PTI may complicate the attempts to

prove our model immediately. Recently, we have demonstrated that begomovirus-derived nucleic acids function as viral PAMPs to activate the translational control branch of the NIK1-mediated antiviral signalling⁴⁷. These virus-derived PAMPs may provide the means to eliminate the side effects of viral protein suppressors in studies designed to demonstrate positive and negative interactions between antiviral and antibacterial immunity.

Methods

Plant materials and growth conditions. The *Arabidopsis thaliana* Col-0 accession and *nik1-1* (SALK_060808), *nik2-1* (SALK_044363), *nik3-1* (SALK_034037), *fls2* (Salk_141277), *bak1-4* (Salk_116202) and *sid2-5* (SAIL_112_G09) mutants were obtained from the ABRC and have been described previously^{10,38}. The NIK1_C5 and NIK1_C8 complementation transgenic lines, which harbour a 35S:NIK1-GFP construct in the *nik1-1* mutant background, have been described previously^{15,18}. Plants were grown in soil (Metro Mix 366) in a growth room at 23 °C, 45% humidity, and 75 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^1$ light with a 12-h-light/12-h-dark photoperiod. Four-week-old plants were used for protoplast isolation, pathogen infection, callose deposition, and ROS production assays. Seedlings were germinated on half-strength Murashige and Skoog (MS) plates containing 1% (w/v) sucrose and 0.8% (w/v) agar, grown under the same conditions described above for 10 days, transferred to a six-well tissue culture plate with 2 mL water overnight, and then treated with 100 nM flg22 or H₂O for the indicated time periods for MAPK and qRT-PCR assays.

Plasmid constructs for transient expression in protoplasts. The *AtNIK1* open reading frame (ORF) was amplified from *Arabidopsis* Col-0 cDNA using AtNIK1*NcoI* and AtNIK1-*StuI* primers (Supplementary Table 1). *NcoI*/*StuI*-digested NIK1 ORF was cloned into *NcoI*/*StuI* previously digested pHBT-FLAG or pHBT-HA vectors. The resulting clones contain NIK1 fused to HA or to FLAG epitope tags at the C terminus and were confirmed using Sanger sequencing. The point mutations of NIK1km were generated by site-directed mutagenesis with primers as listed in Supplementary Table 1. The generation of T474D and T474A mutants has been previously described¹⁴.

Plant transformation. The *bak1-4* and *fls2* lines were transformed with pK7F-NIK1T474D¹⁵ using the floral dip method. For overexpressing lines, Col-0 were transformed with 2×35S::NIK1-6HA-containing pH7m34GW, generating NIK1OX8 and NIK1-OX10 lines. Transgene incorporation was monitored with PCR. Transgene expression was confirmed by real-time PCR with NIK1 qPCR primers (Supplementary Table 1). For quantification of gene expression, we used actin as an internal control gene. Independently transformed Col-0 lines expressing the T474D transgene (T474D/Col-0 L9, T474D/Col-0 L10) have been previously described¹⁸.

CaLCuV infection and quantification of viral DNA load. *Arabidopsis thaliana* plants at the seven-leaf stage were inoculated with plasmids containing partial tandem repeats of CaLCuV DNA-A¹⁰ and DNA-B using biolistic delivery. Inoculated plants were transferred to a growth chamber and examined for symptom development (leaf necrosis, chlorosis, leaf epinasty, curly leaves, young leaf death and stunted growth), and infection was confirmed by conventional PCR using CaLCuV DNA-B-specific primers (Supplementary Table 1). In each experiment, 20 plants from each line (Col-0, *nik1-1* and NIK1_C5) were inoculated with 2 µg of tandemly repeated DNA-A plus DNA-B per plant. The course of infection was examined using data from three independent experiments. Viral DNA accumulation was quantified by qPCR using viral DNA-B-specific primers (Supplementary Table 1). Genomic copies of CaLCuV were normalized against an internal control (18S rDNA). For viral DNA quantification, standard curves were prepared using serial dilutions of CaLCuV DNA-B (100 to 10⁶ copies of viral genome per reaction).

TRV infection and quantification of viral RNA accumulation. *Agrobacterium* cultures containing TRV-RNA1 (pTRV1) and TRV-RNA2 (pTRV2) T-DNA constructs⁴⁸ were infiltrated onto the lower leaf of four-leaf stage *N. benthamiana* plants using a 1-mL needleless syringe. Infected leaves were confirmed by conventional RT-PCR using TRV-RNA2-specific primers (Supplementary Table 1). TRV was mechanically inoculated to *A. thaliana* Col-0, *nik1-1* and NIK1_C5 lines by rubbing the leaves with sap (K₂HPO₄ 0.05 M, pH 7.2, Na₂SO₃ 0.01 M) from infected *N. benthamiana* leaves. After 2 weeks of inoculation, viral RNA accumulation was quantified by qRT-PCR using the comparative cycle threshold method, TRV-RNA2-specific primers and actin as an internal control gene.

Bacterial pathogen infection assay. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000 and *P. syringae* pv. *maculicola* (Psm) ES4326 strains were cultured overnight at 28 °C in KB medium with 50 µg/ml rifampicin or streptomycin. Bacteria were harvested by centrifugation, washed and adjusted to the desired density with 10 mM MgCl₂. Leaves of 4-week-old plants were hand infiltrated with the bacterial suspension using a 1-mL needleless syringe and collected to measure bacterial growth. Six leaf discs separated as three repeats were ground in 100 µL H₂O, and serial dilutions were plated onto TSA medium (1% Bacto tryptone, 1% sucrose, 0.1% glutamic acid, 1.5% agar) with the appropriate antibiotics. Bacterial colonyforming units were counted after incubation at 28 °C for 2 days.

SA determination. *Arabidopsis* seedlings were germinated and grown for 10 days on half-strength MS plates at 22 °C, 16 h of light. Two hundred and twenty milligrams of fresh seedling were crushed in liquid nitrogen and SA was extracted with a mix of 400 µL of 79% (v/v) isopropanol, 20% (v/v) methanol and 1% (v/v) acetic acid using tungsten beads (30 Hz/s for 2 min). The plant extract was sonicated twice for 10 min at 4 °C. After incubation for 30 min on ice, the extract was purified by centrifugation for 10 min at 13,000 × g and 4 °C. The supernatant was filtered (syringe filters, 0.45 µm) and 300 µL of the supernatant were injected into an LCMS system (ultra-performance liquid chromatography, model 1200 infinity series, coupled to a quadrupole sequential mass spectrometer, model 6430, Agilent). The mobile phase was 2% (v/v) acetonitrile and 98% (v/v) water. The mass of the precursor ion was determined (137/92) and the absolute quantity of free hormone was determined based on calibration curves and standards. Data were analysed using the software Skyline[®]. The ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assays were performed with three biological replicates and the data were analysed with t test, *p* < 0.05.

ROS assay. ROS burst was evaluated with a luminol-based assay. Leaves from 4-week-old *Arabidopsis* plants of each genotype were excised into leaf discs of 0.25 cm² and incubated overnight in 96-well plates with 100 µL of H₂O to eliminate the wounding effect. H₂O was replaced with 100 µL reaction solution containing 50 µM luminol and 10 µg/mL horseradish peroxidase (Sigma, USA) with or without 100 nM flg22 supplementation. Measurement was completed with a luminometer (Perkin Elmer, 2030 Multilabel Reader, Victor X3) immediately after adding the solution with 1.5 min interval reading times for a period of 30 min ROS production values from 20 leaf discs per treatment are expressed as the mean relative light units.

MAPK assays. Ten-day-old seedlings germinated on half-strength MS plates were transferred to 2 mL H₂O in a 6-well plate to recover overnight and then treated with 100 nM flg22 for 5, 15 or 45 min. Seedlings were ground in IP buffer (20 mM

Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, and 1% Triton X-100), and supernatants were collected after centrifugation. The cleared lysate was incubated with SDS sample buffer and loaded onto 12.5% SDS-PAGE gels. Activated MAPKs were measured by immunoblotting with an α-pErk1/2 antibody (Cell Signaling #9101, USA, 1:2000) and a secondary antibody, goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, cat # sc-2004, 1:10,000). AtMPK3 and AtMPK6 were directly immunoblotted from total protein extracts with α-AtMPK3 (Sigma-Aldrich, cat # M8318, 1:4000) and α-AtMPK6, (Sigma-Aldrich, cat # 7104, 1:4000).

RNA isolation and qRT-PCR analysis. For RNA isolation, 10-day-old seedlings grown on half-strength MS plates were transferred to 2 mL H₂O in a 6-well plate to recover overnight and then treated with 100 nM flg22 for 30 or 90 min. RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) and quantified with a NanoDrop spectrophotometer. Total RNA was treated with RQ1 RNase-free DNase I (Promega, USA) for 30 min at 37 °C and then reverse transcribed with M-MuLV Reverse Transcriptase (NEB, USA). Real-time PCR was performed using iQV Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA) and a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Expression of each gene was normalized to expression of UBQ10. The primers used to detect specific transcripts for realtime RT-PCR are listed in Supplementary Table 1.

Callose deposition assays. The leaves of 6-week-old plants grown in soil were hand inoculated with 0.5 µM flg22 or H₂O for 24 h. Leaves were then transferred into FAA solution (10% formaldehyde, 5% acetic acid and 50% ethanol) for 12 h and de-stained in 95% ethanol for 6 h. Cleared leaf disks were washed two times with 70% ethanol and then three times with distilled water, followed by incubation in 0.01% aniline blue solution (150 mM KH₂PO₄, pH 9.5) for 15 min. Callose deposits were visualized with a fluorescence microscope. Callose deposits were counted using ImageJ 1.43U software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Yeast two-hybrid assay. Different combinations of NIK1K, BAK1K, and FLS2K kinase domains in pGADT7 and pGBKT7 vectors were co-transformed into the yeast AH109 strain as indicated in the figures. Polyethylene glycol/LiAc-mediated yeast transformation was performed according to the Yeastmaker Yeast Transformation System 2 (Clontech) protocol. Protein-protein interactions were tested by growing yeast colonies on synthetic defined medium without histidine, leucine, and tryptophan and supplemented with 1 mM 3-amino-1,2,4-triazole.

BiFC analysis. For the biochemical complementation assay of YFP, FLS2, BAK1, NIK1 and NIK1-T474D were fused to the N terminus or C terminus of the YFP gene. Then, constructs expressing NIK1-cYFP, NIK1-nYFP, BAK1-cYFP, FLS2nYFP and other indicated fusion proteins were co-agro-infiltrated into tobacco leaves in the presence of the suppressor of silencing HC-Pro in different combinations. YFP fluorescence was observed using confocal microscopy.

Co-IP assay. *Arabidopsis* protoplasts were transfected with a pair of constructs (empty vector was used as a control) and incubated for 12 h. Samples were collected by centrifugation and lysed with Co-IP buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail) by vortexing. For the Co-IP assay, protein extracts were pre-incubated with protein G agarose beads for 1 h at 4 °C with gentle shaking. Immunoprecipitation was performed with an α-FLAG agarose for 3 h and at 4 °C (α-FLAG M2 Affinity gel, Sigma-Aldrich, Cat # 2220). Beads were collected and washed three times with washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Triton X-100). Immunoprecipitated and input proteins were analysed by immunoblotting with the antibodies, as indicated in the figures and listed here (α-FLAG M2-peroxidase, Sigma-Aldrich, Cat # A8592, 1:2000; α-HA-peroxidase, Roche, Cat # 12013819001, 1:2000; α-GFP, Roche, Cat # 11814460001, 1:1000; goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz, Cat # sc-2005, 1:10,000).

In vitro pull-down and kinase assay. Fusion proteins including GST, GSTNIK1JK (juxtamembrane domain and kinase domain), GST-NIK1JKkm, GSTFLS2JK, GST-BAK1JK, MBP, MBP-FLS2JK and MBP-BAK1JK in vector pGEX4T-1 (Pharmacia) or pMAL-c2 (New England Biolabs) were expressed in the *E. coli* BL21 strain and purified through affinity chromatography with glutathione agarose or amylose resin. For pull-down assay, MBP-FLS2JK and MBP-BAK1JK fusion proteins (tagged with HA) as preys were pre-incubated with 5 µL prewashed glutathione agarose for 0.5 h at 4 °C. The agarose was spin down and the supernatant was collected and incubated with GST or GST-NIK1JK beads for another 1 h. The pull-down proteins were detected with an α-HA antibody by immunoblot. For kinase assay, GST-NIK1JKkm was used as substrate and MBP-FLS2JK or MBPBAK1JK as the kinase, which were mixed in kinase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 100 mM NaCl, and 1 mM dithiothreitol (DTT)) with 0.1 mM cold ATP and 5 µCi [³²P]γ-ATP at room temperature for 3 h. The phosphorylation of fusion proteins was analysed by autoradiography after separation with 10% SDS-PAGE.

Phosphorylation assay. RPL10-GFP was transiently expressed in protoplasts for 16 h, and then the protoplasts were treated with 100 nM flg22 for 3 h. RPL10-GFP was immunoprecipitated with α -GFP antibodies and sepharose-A beads, fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with a α -phosphoserine antibody (α -phosphoserine peroxidase, Sigma-Aldrich, Cat # SAB5200087, 1:5000) and a α -GFP antibody (α -GFP, Roche, Cat # 11814460001, 1:1000; goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz, Cat # sc-2005, 1:10,000). Likewise, NIK1-HA was immunoprecipitated from protein extracts prepared from flg22-treated and non-treated NIK1-HA-overexpressing seedlings with α -HA antibodies (α -HA, Thermo Fisher, Cat # 71-5500, 1:50) and sepharose-A beads (Protein A-Sepharose 4B, Thermo Fisher, Cat # 10-1041), fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with a α -phosphoserine antibody (α -phosphoserine peroxidase, Sigma-Aldrich, Cat # SAB5200087, 1:5000); α -phosphotyrosine antibody (α -phosphotyrosine, Thermo Fisher, Cat # 61-5800, 1:2000) and α -phosphothreonine antibody (α -phosphothreonine, Thermo Fisher, Cat # 71-8200, 1:250) and goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Thermo Fisher, Cat # 65-6120, 1:10,000).

RNA-seq method and data analysis. For RNA-seq experiments, we used three biological replicates of a pool of 10-day-old Col-0 and *nik1-1* seedlings and examined differences between Col-0 and *nik1-1* lines using the Deseq2 differential gene expression method⁴⁹. RNA-seq data were obtained using an Illumina Hi-seq 2000. The paired-end 100-bp protocol was used with the following quality filter parameters: 5 bases trimmed at the 3' and 5' ends of the reads and a minimum average Phred score of 30. Differentially expressed (DE) genes were stored using SQL tables in the PostgreSQL relational database (<http://inctipp.bioagro.ufv.br/Arabidopsismik0/>), which listed corresponding \log_2 FC (fold change) and p values corrected by false discovery rate (q value) for all DE genes. RNA-seq data were then analysed using the eigenvector centrality method²⁶ to identify upregulated genes in *nik1-1* plants that represented relevant protein hubs in the plant–pathogen interactome network based on protein–protein and genetic interactions. By considering a fold change >1.5 as the major criterion for eigenvector centrality metrics, *nik1-1* upregulated genes, which were retrieved from the *Arabidopsis* pathogen interactome network database (http://interactome.dfc.harvard.edu/A_thaliana), were classified by gene ontology categories.

Rearrangement of the LRR-RLK interaction network. The RLK extracellular interactome network (CSI^{LRR}) was obtained from Smakowska-Luzan et al.²⁸. The network was created by Cytoscape 3.6.1⁵⁰. The approximation of maximum cut algorithm was adapted from Goemans–Williamson Algorithm⁵¹.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper and in Supplementary Information files. The source data underlying Figs. 1a, b, 1d, 1f, 1h, 1i, 2a, e, 2g, 3c, j, 4a, i, 5a, g, 5i, l, 6a–i and Supplementary Figs. 1d–g, 2b, c, 3b–h, 4a–i, 5a–f, 8a–f, 9b–f are provided as Source Data files. The pipeline of RNAseq analysis and data can be found at <http://inctipp.bioagro.ufv.br/Arabidopsismik0> and SRA accession number PRJNA573716.

Received: 10 February 2017; Accepted: 4 October 2019;

Published online: 01 November 2019

Reference

- Bigeard, J., Colcombet, J. & Hirt, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant* **8**, 521–539 (2015).
- Couto, D. & Zipfel, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 537–552 (2016).
- Tsuda, K. & Katagiri, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 459–465 (2010).
- Macho, A. P. & Zipfel, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* **54**, 263–272 (2014).
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329 (2006).
- Calil, I. P. & Fontes, E. P. B. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Ann. Bot. Lond.* **119**, 711–723 (2017).
- Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A. & Fontes, E. P. B. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Front. Microbiol.* **7**, 2139 (2017).
- Machado, J. P. B., Calil, I. P., Santos, A. A. & Fontes, E. P. B. Translational control in plant antiviral immunity. *Genet. Mol. Biol.* **40**, 292–304 (2017).
- Machado, J. P. B., Brustolini, O. J. B., Mendes, G. C., Santos, A. A. & Fontes, E. P. B. NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? *BioEssays* **37**, 1236–1242 (2015).
- Fontes, E. P. B., Santos, A. A., Luz, D. F., Waclawovsky, A. J. & Chory, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Gene Dev.* **18**, 2545–2556 (2004).
- Mariano, A. C. et al. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* **318**, 24–31 (2004).
- Sakamoto, T. et al. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biol.* **12**, <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-229> (2012).
- Zhang, X. R. S., Choi, J. H., Heinz, J. & Chetty, C. S. Domain-specific positive selection contributes to the evolution of *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR RLK) genes. *J. Mol. Evol.* **63**, 612–621 (2006).
- Santos, A. A., Carvalho, C. M., Florentino, L. H., Ramos, H. J. O. & Fontes, E. P. B. Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. *PLoS ONE* **4**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007137> (2009).
- Santos, A. A., Lopes, K. V. G., Apfata, J. A. C. & Fontes, E. P. B. NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling. *J. Exp. Bot.* **61**, 3839–3845 (2010).
- Carvalho, C. M. et al. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathog.* **4**, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000247> (2008).
- Rocha, C. S., Santos, A. A., Machado, J. P. B. & Fontes, E. P. B. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology* **380**, 165–169 (2008).
- Zorzatto, C. et al. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* **520**, 679–U227 (2015).
- Brustolini, O. J. B. et al. Sustained NIK-mediated antiviral signalling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 1300–1311 (2015).
- Dievart, A. & Clark, S. E. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* **131**, 251–261 (2004).
- Chinchilla, D. et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–U412 (2007).
- Heese, A. et al. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12217–12222 (2007).
- Roux, M. et al. The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **23**, 2440–2455 (2011).
- Wang, Y. L. et al. Assessment of BAK1 activity in different plant receptor-like kinase complexes by quantitative profiling of phosphorylation patterns. *J. Proteom.* **108**, 484–493 (2014).
- Ma, X. Y., Xu, G. Y., He, P. & Shan, L. B. SERKING coreceptors for receptors. *Trends Plant Sci.* **21**, 1017–1033 (2016).
- Ahmed, H. et al. Network biology discovers pathogen contact points in host protein–protein interactomes. *Nat. Commun.* **9**, 673–681 (2018).
- Bonacich, P. Power and centrality: a family of measures. *Am. J. Sociol.* **92**, 1170–1182 (1987).
- Smakowska-Luzan, E. et al. An extracellular network of *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinases. *Nature* **553**, 342–+ (2018).
- Yi, S. Y., Shirasu, K., Moon, J. S., Lee, S. G. & Kwon, S. Y. The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PLoS ONE* **9**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088951> (2014).
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J. D. & Katagiri, F. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J.* **53**, 763–775 (2008).
- Beckers, G. J. M. et al. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**, 944–953 (2009).
- Halter, T. et al. The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. *Curr. Biol.* **24**, 134–143 (2014).
- Stringlis, I. A. et al. Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *Plant J.* **93**, 166–180 (2018).
- Schwessinger, B. & Ronald, P. C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**, 451–482 (2012).
- Dominguez-Ferreras, A., Kiss-Papp, M., Jehle, A. K., Felix, G. & Chinchilla, D. An overdose of the *Arabidopsis* co-receptor brassinosteroid insensitive1 associated receptor kinase1 or its ectodomain causes autoimmunity in a suppressor of BIR1-1-dependent manner. *Plant Physiol.* **168**, 1106–+ (2015).
- Lu, D. P. et al. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* **332**, 1439–1442 (2011).

37. Segonzac, C. et al. Negative control of BAK1 by protein phosphatase 2A during plant innate immunity. *EMBO J.* **33**, 2069–2079 (2014).
38. Li, B. et al. Phosphorylation of Trihelix transcriptional repressor ASR3 by MAP KINASE4 negatively regulates *Arabidopsis* immunity. *Plant Cell* **27**, 839–856 (2015).
39. Zvereva, A. S. et al. Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants. *New Phytol.* **211**, 1020–1034 (2016).
40. Valentine, M. E., Wolyniak, M. J. & Rutter, M. T. Extensive phenotypic variation among allelic T-DNA inserts in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **7**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044981> (2012).
41. Korner, C. J. et al. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **26**, 1271–1280 (2013).
42. Nicaise, V. & Candresse, T. Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. *Mol. Plant Pathol.* **18**, 878–886 (2017).
43. Kong, J. et al. The cucumber mosaic virus movement protein suppresses PAMP-triggered immune responses in *Arabidopsis* and tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498**, 395–401 (2018).
44. Liu, J. Z. et al. Soybean homologs of MPK4 negatively regulate defense responses and positively regulate growth and development. *Plant Physiol.* **157**, 1363–1378 (2011).
45. Niehl, A., Wyrtsch, I., Boller, T. & Heinlein, M. Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol.* **211**, 1008–1019 (2016).
46. Yang, H. et al. BAK1 and BKK1 in *Arabidopsis thaliana* confer reduced susceptibility to turnip crinkle virus. *Eur. J. Plant Pathol.* **127**, 149–156 (2010).
47. Teixeira, R. M. et al. Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. *Mol. Plant Pathol.* **20**, 1196–1202 (2019).
48. Liu, Y. L., Schiff, M., Marathe, R. & Dinesh-Kumar, S. P. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30**, 415–429 (2002).
49. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
50. Shannon, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
51. Goemans, M. X. & Williamson, D. P. A general approximation technique for constrained forest problems. *SIAM J. Comput.* **24**, 296–317 (1995).

Acknowledgements

This research was supported by Natural Science Foundation of China (Grant no. 31770278 to B.L.), Fundamental Research Funds for the Central Universities, Huazhong Agricultural University Scientific & Technological Self-innovation Foundation (Grant no. 2017RC001 to B.L.), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant no. 408810/2018-1 to E.P.B.F.) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (Fapemig Grants no 408810/2018-1, APQ-03350-15 and APQ-01282-17 to E.P.B.F.), National Institutes of Health (NIH) (R01GM092893 to P.H.), National Science Foundation (NSF) (MCB-1906060 to P.H.), NIH (R01GM097247 to L.S.) and the Robert A. Welch Foundation (A-1795 to L.S.). B.L. is supported by the Thousand Youth Talents Plan (Grant no. D1318027), M.A.F. is supported by a graduate fellowship from Capes. R.M.T. and L.G.C.M. are supported by a Fapemig and CNPq graduate fellowships, respectively. G.C.M., P.A.C. and O.J.B.B. were supported by CNPq

postdoctoral fellowships associated with the INCT in plant–pest interactions. C.E.M.D. is a PNPd/Capes fellow.

Author contributions

B.L. co-wrote the manuscript and performed the Co-IP assays, bacterial growth, PTI-related assays and NIK1 phosphorylation. M.A.F. co-wrote the manuscript, designed and performed the virus infection assays and viral quantification, prepared and performed the experiments with the double mutants, RPL10 phosphorylation and suppression of RP genes. M.H. performed the PTI assay with overexpression lines and assisted some assays with double mutants. L.F.C. and R.M.T. assisted experiments with double mutants. X.Y. edited the draft and assisted the NIK1 phosphorylation assay, Y2H and in vitro kinase assay. G.C.M., B.P.M. and P.A.C. assisted experiments related to PTI characterization and performed BiFC assays. B.C.G.-M. performed real-time PCR for the suppression of RP gene expression. C.L. assisted in the nik1 mutant complementation assays. C.S.L.P. and L.G.C.M. purified receptors and assisted in protein phosphorylation assay. C.E.M.D. performed NIK1 phosphorylation assay. O.J.B.B. performed the bioinformatics analysis of the RNA-sequencing data and the statistical analysis of the data. L.S. and P.H. conceived the experiments and edited the final draft. E.P.F.B. co-wrote the manuscript, designed the experiments and directed the project.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467019-12847-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.L. or E.P.B.F.

Peer review information Nature Communications thanks Kenji Nakahara and Vardis Ntoukakis and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

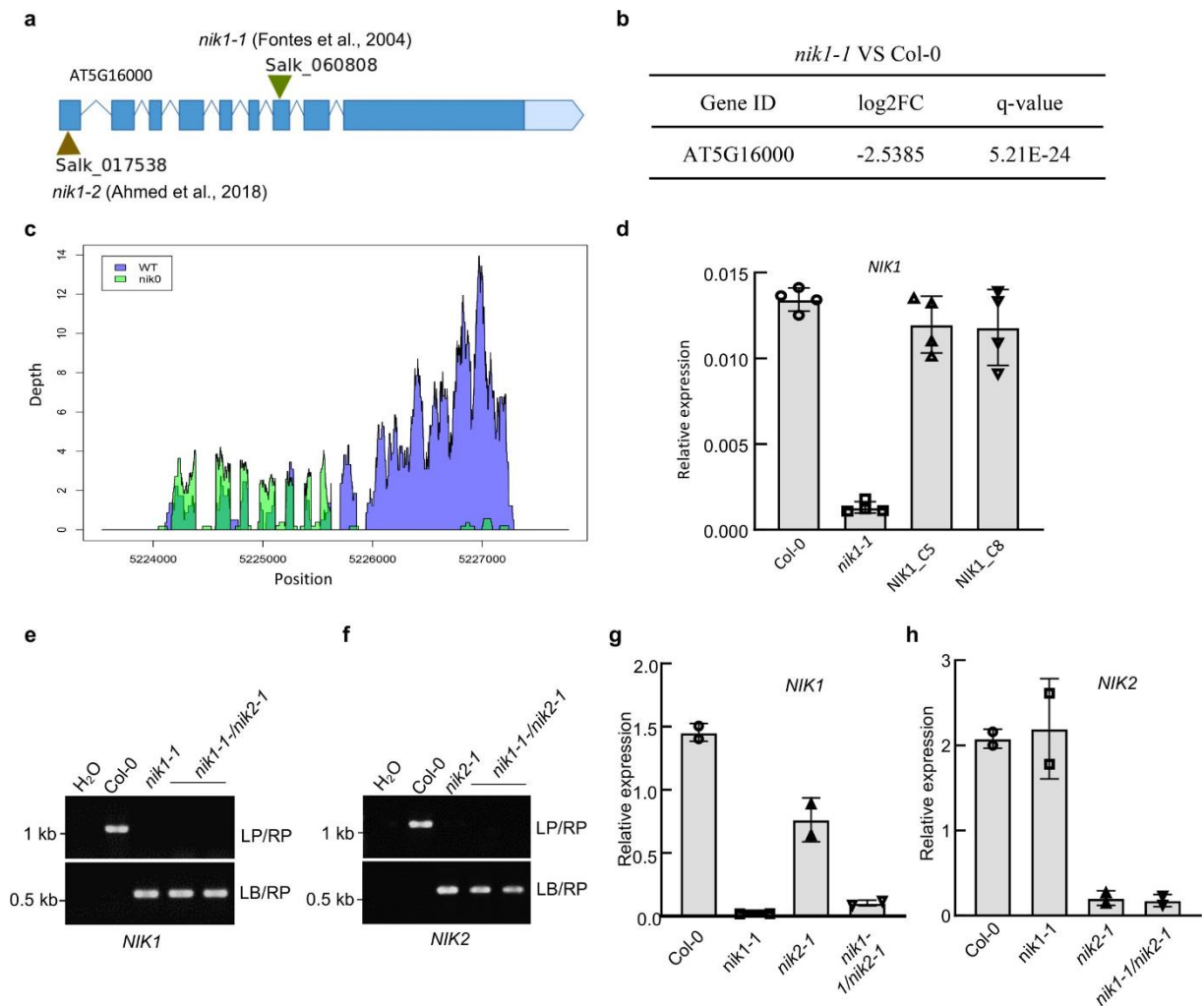
© The Author(s) 2019

Supplementary Information (Supplementary Figures / Table)

**The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex
and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity**

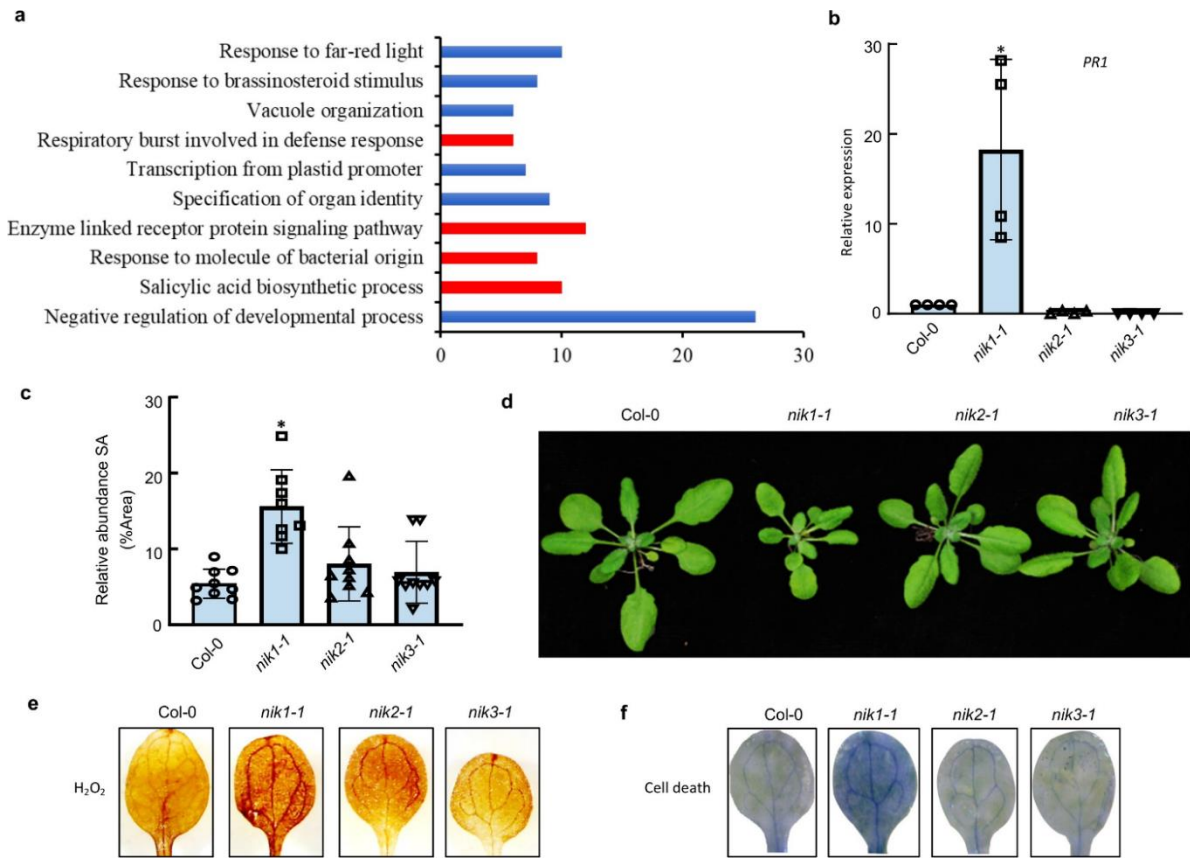
Li et al, 2019

Supplementary Figure 1



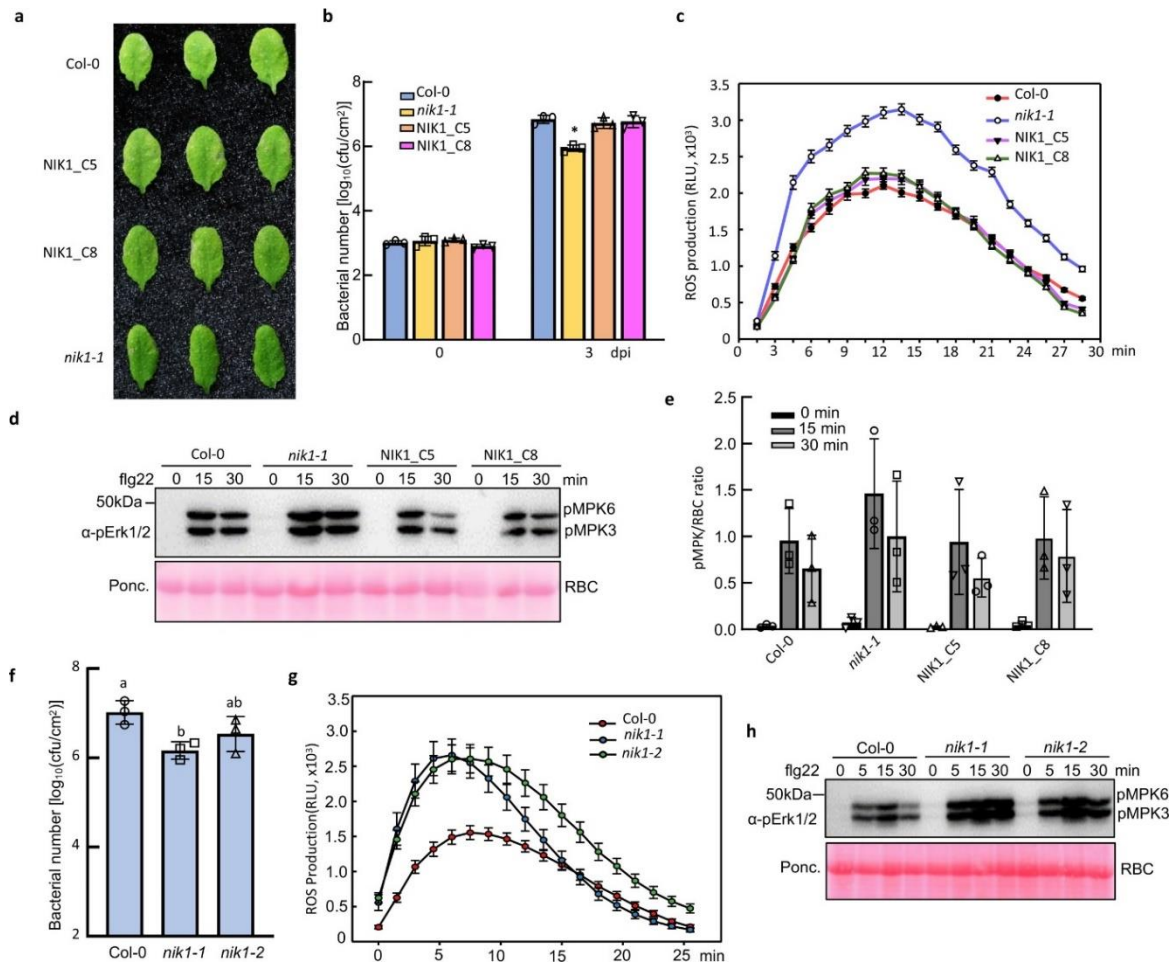
Supplementary Fig. 1 Characterization of *nik1-1* and *nik2-1* T-DNA insertional mutants. a Schematic structure of the annotated AT5G1600 (*NIK1*) locus and T-DNA insertional mutants. Blue boxes indicate exons and curve lines represent introns. Triangles indicate the positions of the T-DNA insertions in the *nik1-1* and *nik1-2* mutants. **b** *NIK1* relative expression level in *nik1-1* mutant compared to Col-0 as determined by RNA-seq. **c** High throughput sequencing reads mapped to *NIK1* in *nik1-1* mutant. **d** *NIK1* transcript accumulation in *nik1-1* and in complemented lines (R4 generation). Total RNA was isolated from Col-0, *nik1-1*, *35S:NIK1-GFP/nik1-1* lines NIK1_C5 and NIK1_C8 leaves and the expression of *NIK1* was monitored by quantitative RT-PCR. Mean \pm 95% confidence intervals based on bootstrap resampling replicates of three independent experiments. **e** Genotyping of *nik1-1/nik2-1* double mutant for a T-DNA insertion in *NIK1*. PCR was carried out with genomic DNA using either the LB/*NIK1*_RP primers for T-DNA or *NIK1*_LP/ *NIK1*_RP primers for gDNA. **f** Genotyping of *nik1-1/nik2-1* double mutant for a T-DNA insertion in *NIK2*. PCR was carried out with genomic DNA using either the LB/*NIK2*_RP primers for T-DNA or *NIK2*_LP/ *NIK2*_RP primers for gDNA. **g** and **h** Relative *NIK1* or *NIK2* expression levels in double mutants. Total RNA was isolated from the indicated lines, and the relative gene expression was quantified by qRT-PCR and *UBQ10* as an internal control. The values are mean \pm SE (n=3).

Supplementary Figure 2



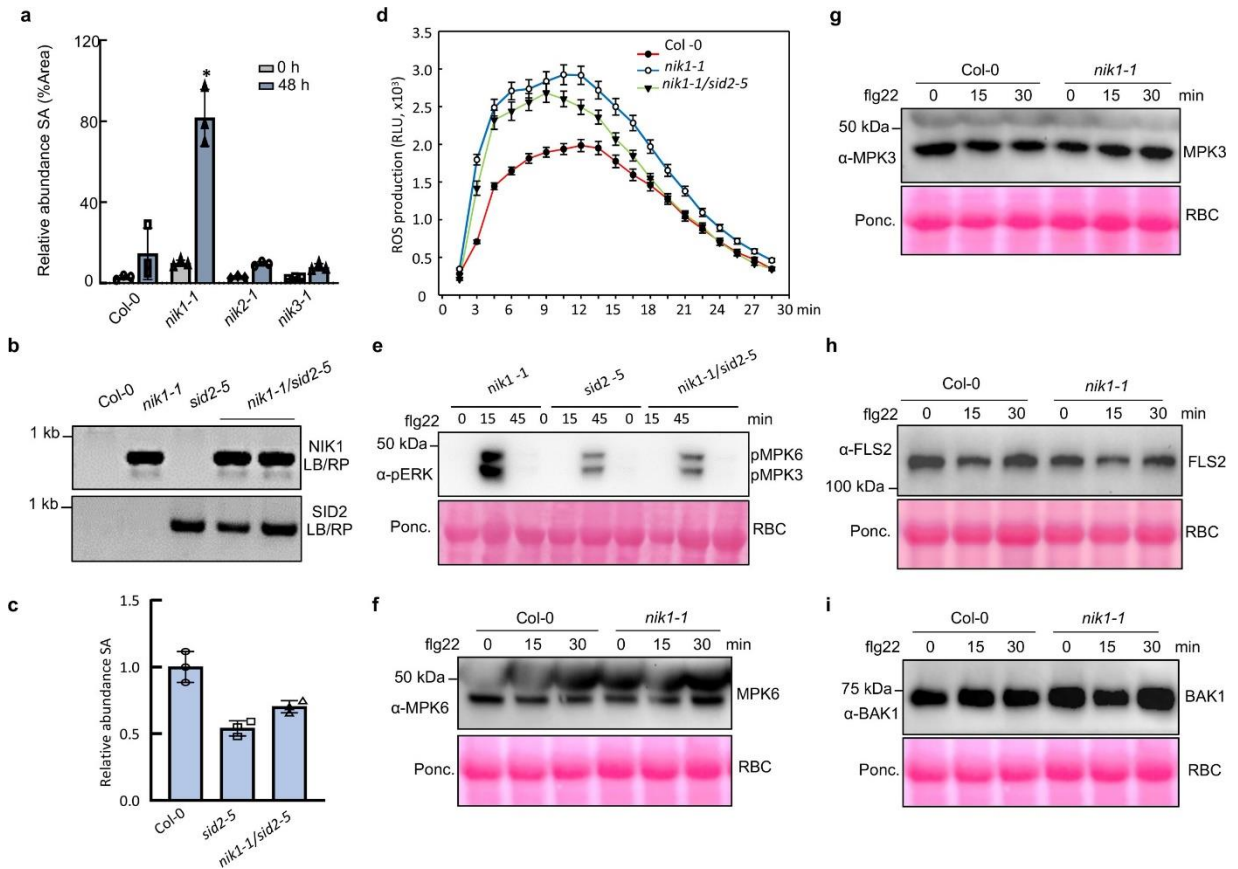
Supplementary Fig. 2 Constitutive activation of SA-related defence responses in the *nik1-1* knockout line. a Functional categorization of up-regulated genes in *nik1-1* mutant by RNA-seq. The bar graphs illustrate the distribution of up-regulated genes that represent relevant hubs across functional categories as defined by the Gene Ontology (GO) biological process. The numbers represent the percentage of genes up-regulated in *nik1-1* relative to the WT control that represent relevant hubs in each category. **b** PR1 is constitutively up-regulated in the *nik1-1* mutant. Total RNA was isolated from Col-0, *nik1-1*, *nik2-1* and *nik3-1* lines, and the relative PR1 expression was quantified by qRT-PCR and UBQ10 as an internal control. The mean values are relative to the wild-type (n=3). Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$). **c** Enhanced accumulation of SA in *nik1-1* plants. The relative SA content was determined in leaf extracts from the Col-0 and NIKs mutants. Values are the mean \pm SD of three replicates. Statistical significance is indicated by asterisks (t-test, $p < 0.05$). **(d)** Plant growth phenotype of different NIKs mutants. The Col-0, *nik1-1*, *nik2-1* and *nik3-1* plants grown under normal conditions. Images were taken four weeks post germination. **(e)** H₂O₂ production in Col-0 and *niks* mutants. DAB staining for H₂O₂ production is shown in the leaves of knockout lines and Col-0. **(f)** Cell death in Col-0 and *niks* mutants. Trypan blue staining for cell death is shown in leaves of knockout lines and Col-0.

Supplementary Figure 3



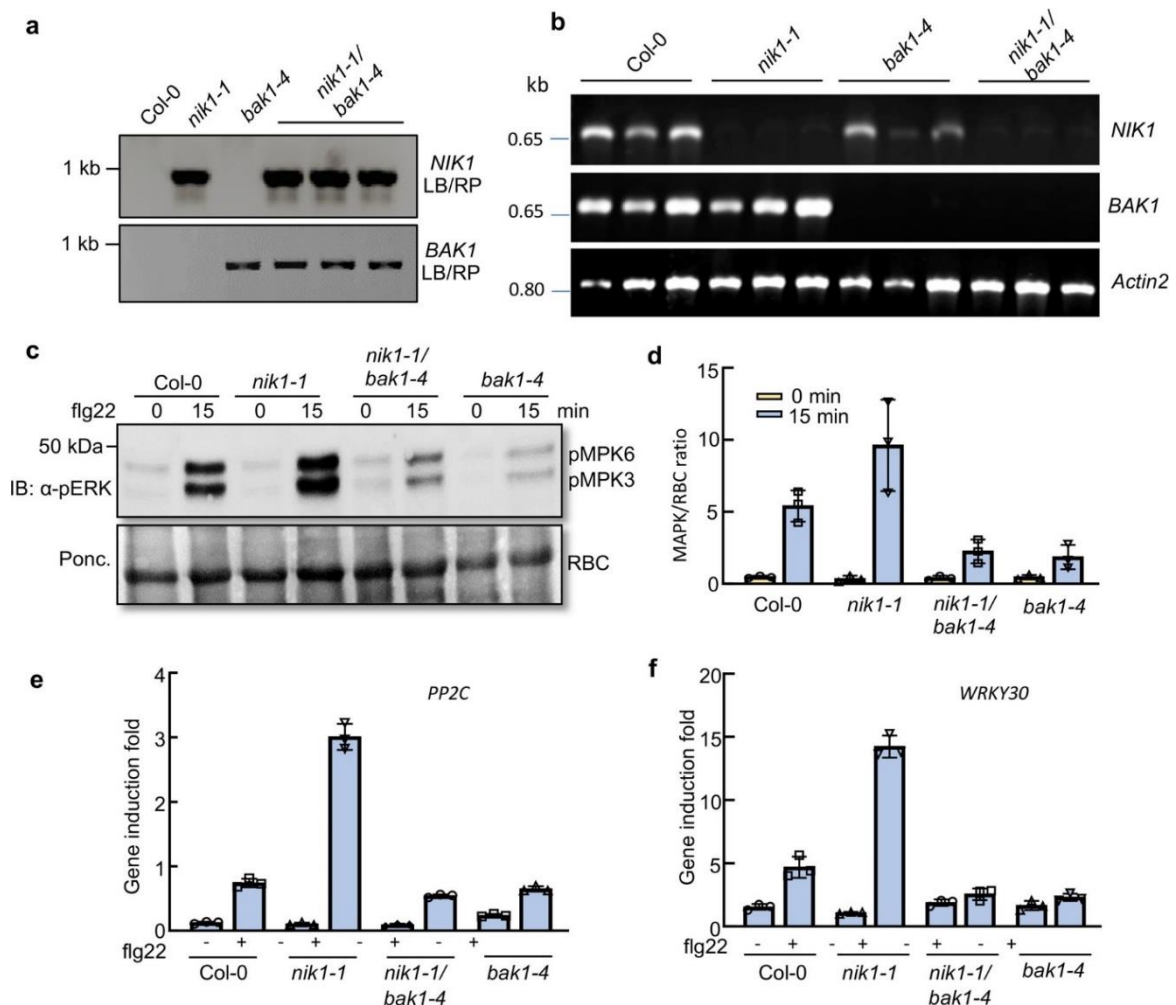
Supplementary Fig. 3 NIK1 reintroduction restores the *nik1-1* mutant disease phenotype. a Disease symptom caused by *Pst* DC3000 infection. Images were taken at 4 dpi. **b** Bacterial growth of *Pst* DC3000 4 days post inoculation. Four-week-old plants Col-0, *nik1-1* and *nik1-1*- complementing lines were hand-inoculated with bacterial suspensions of *Pst* DC3000 at a density of 5×10^5 cfu/mL, and bacterial populations were quantified at 0 and 4 dpi. **c** Flg22-induced ROS burst in *nik1-1*-complementing lines. Leaf discs from 5-week-old plants were treated with water or 100 nM flg22 and the relative light units (RLU) were detected. Values are the mean \pm SE ($n > 15$). **d** Flg22-induced MAPK activation in *nik1-1*-complementing lines. Ten-day-old seedlings of the indicated lines were treated with 100 nM flg22. MAPK activation was detected with an α -pERK antibody (top panel). Total protein input was evaluated by Ponceau S staining for Rubisco (RBC) (bottom panel). **e** Quantitative data for MAPK activation in (**d**). IB images were analysed by ImageJ and the values are the mean \pm SD of three replicates. **f** Growth of *Pst* DC3000 four days post-infection. Four-week-old plants of Col-0, *nik1-1*, and *nik1-2* mutants were hand-inoculated with *Pst* DC3000. **g** Flg22-induced ROS burst in WT, *nik1-1* and *nik1-2* plants. Leaf discs from 5-week-old plants were treated with water or 500 nM flg22 for 30 min, and the relative light units (RLU) were detected. Values represent the mean \pm SE ($n > 10$). **h** Flg22-induced MAPK activation in WT, *nik1-1* and *nik1-2* plants. MAPK activity was assayed as described in Fig. 2b.

Supplementary Figure 4



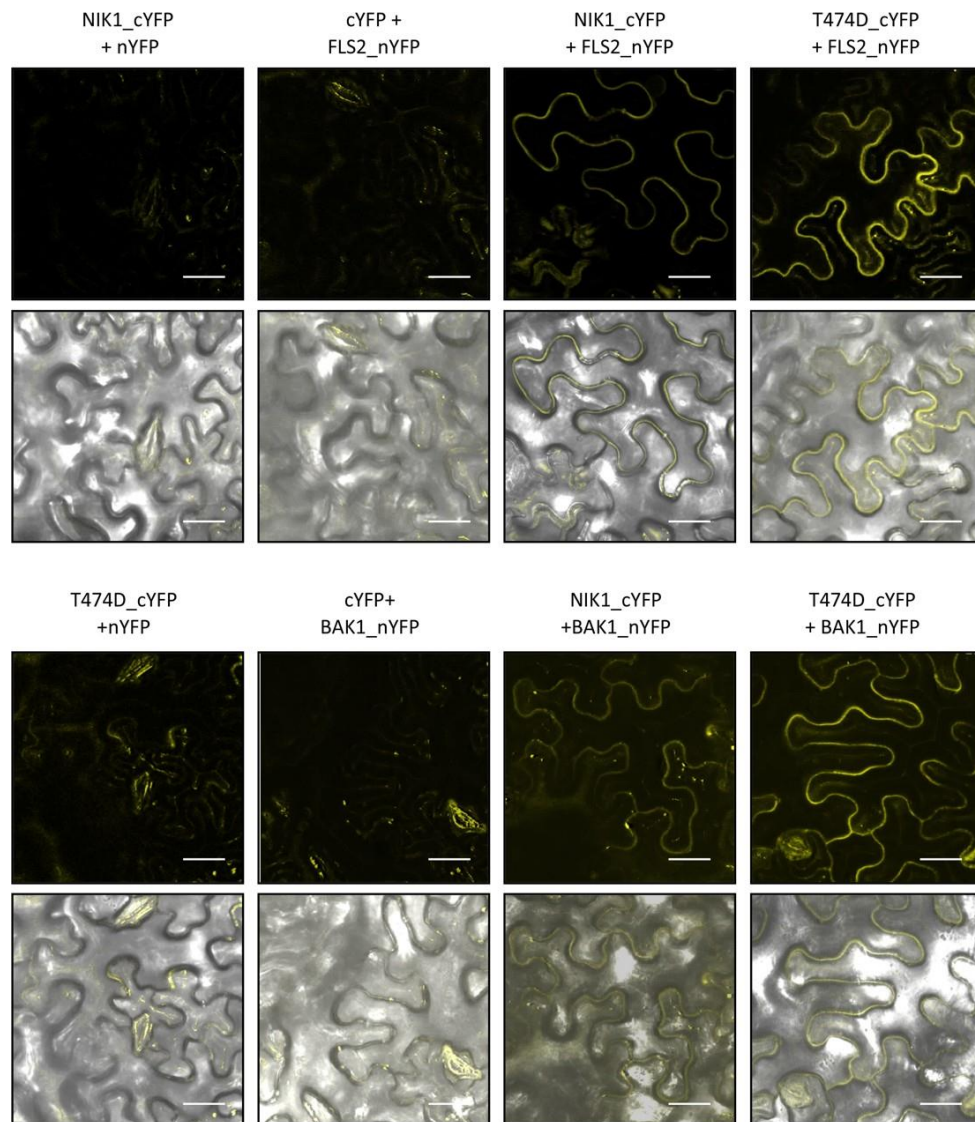
Supplementary Fig. 4 The resistant phenotype of *nik1-1* mutants is independent of high SA accumulation. **a** Relative SA accumulation level in *Col-0* and *nik* mutants post bacterial infection. The bars indicate 95% confidence intervals based on the t test ($p < 0.05$, $n = 3$). Asterisks indicate significant differences relative to the same treatment in *Col-0*. **b** Genotyping *nik1-1/sid2-5* double mutants. PCR was carried out with genomic DNA using either the LB/*NIK1*_RP primers for *NIK1* T-DNA or LB/*SID2*_RP primers for *SID2* T-DNA. **c** Relative SA accumulation level in *nik1-1*, *sid2-5* and *nik1-1/sid2-5*. The relative content of salicylic acid (SA) was determined in leaf extracts from four-week-old plants. The error bars indicate 95 % confidence intervals based on t-tests ($p < 0.05$, $n = 3$). **d** Total ROS production in response to flg22 treatment. Leaf discs from 5-week-old plants were treated with water or 100 nM flg22 and the relative light units (RLU) were detected. Values are the mean \pm SE ($n > 15$). **e** Flg22-induced MAPK activity in *nik1-1*, *sid2-5* and *nik1-1/sid2-5*. **f** and **g** Endogenous MPK6 and MPK3 protein levels in *nik1-1* mutant. Ten-day-old seedlings of indicated lines were treated with 100 nM flg22 for 15 and 30 min. MPK protein levels were detected by α -MPK6 and α -MPK3 antibodies. **h** Endogenous FLS2 protein levels in *nik1-1* mutants. FLS2 protein levels were detected with an α -FLS2 antibody (top panel). Total protein input was showed by Ponceau S staining for RBC (bottom panel). **i** Endogenous BAK1 protein levels in *nik1-1* mutants. BAK1 protein levels were detected using an α -BAK1 antibody.

Supplementary Figure 5



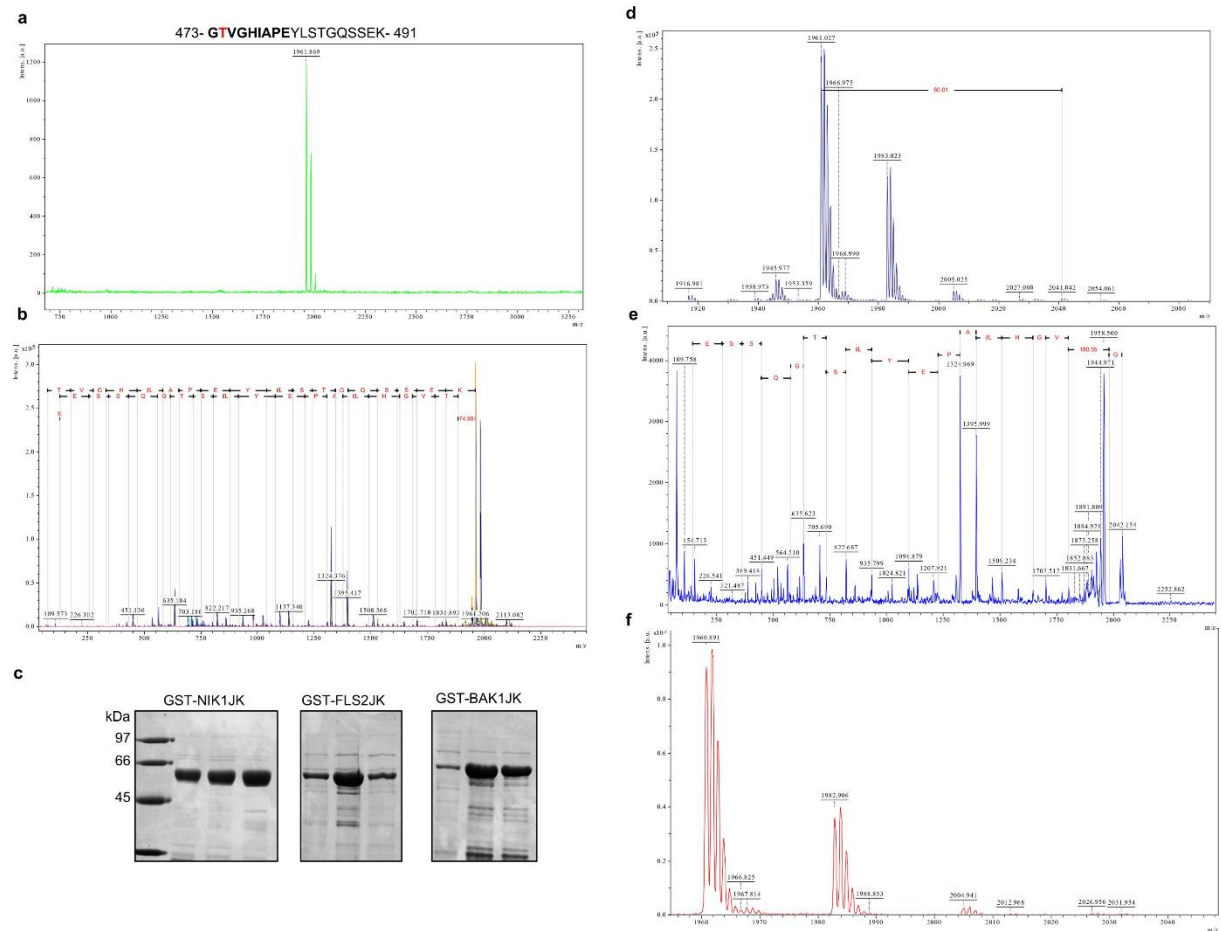
Supplementary Fig. 5 BAK1 is required by NIK1 to suppress flg22-mediated immunity. a Genotyping analysis of *nik1-1/bak1-4* double mutants. PCR was performed with genomic DNA using either the LB/*NIK1*_RP primers for *NIK1* T-DNA or LB/*BAK1*_RP primers for *BAK1* T-DNA. **b** Gene expression levels in *nik1-1/bak1-4* double mutant. RT-PCR analysis of *NIK1* and *BAK1* gene expression with cDNA from the indicated plants. *ACTIN2* served as an internal control. **c** Flg22-induced MAPK activation in Col-0, *nik1-1*, *bak1-4* and *nik1-1/bak1-4*. Ten-day-old seedlings from half MS medium were treated with 100 nM flg22 for 15 min and MAPK activity was detected by immunoblotting (IB) with an α -pERK antibody (top panel). Total input proteins were showed by Ponceau S staining for RBC (bottom panel). **d** Quantitative data for MAPK activation in (c). IB signals were analysed using ImageJ, and the values represent the mean \pm ED of three repeats. The error bars indicate 95 % confidence intervals based on t-tests ($p < 0.05$). **e** and **f** *PP2C* and *WRKY30* induction in response to flg22 treatment. Total RNA was extracted from 10-day old seedlings with or without flg22 treatment for 30 min. qPCR was performed with cDNA from the indicated lines. Values are the mean \pm SD of three repeats.

Supplementary Figure 6



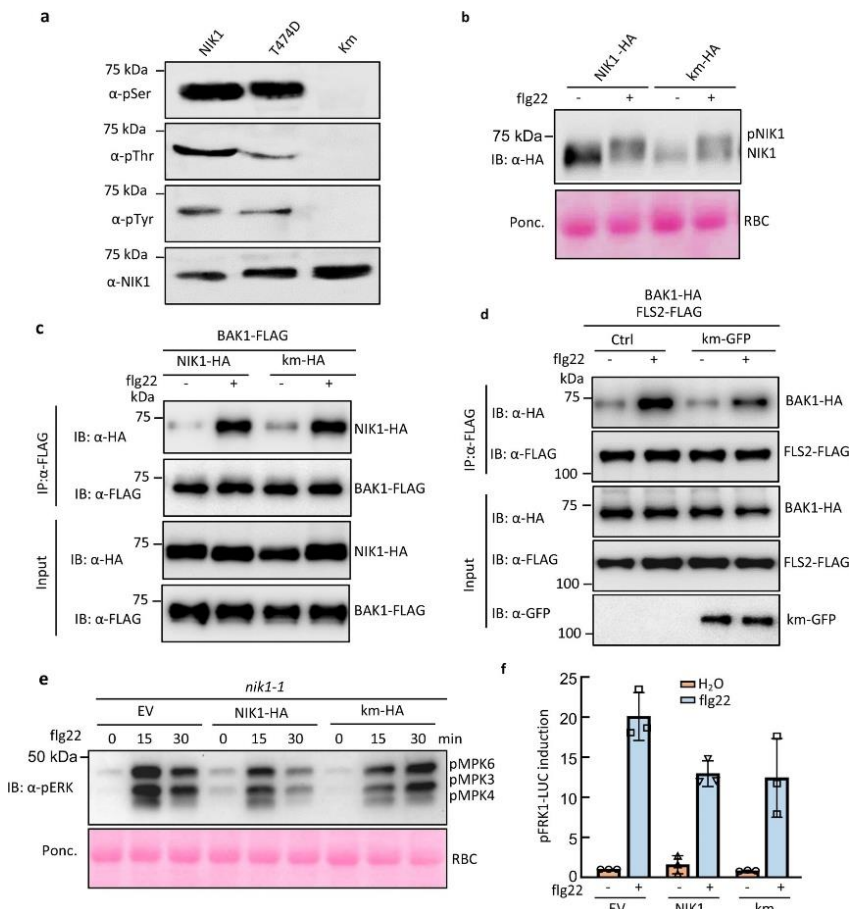
Supplementary Fig. 6 In vivo interactions between NIK1-T474D and FLS2 or BAK1 by BiFC assays. Different combinations of nYFP, NIK1-cYFP, T474D-cYFP, FLS2-nYFP or BAK1-nYFP were co-expressed in *N. benthamiana* leaf through agrobacterial-infiltration in the presence of HC-Pro suppressor. Fluorescence (YFP) signal and bright field images were taken of epidermal cells of tobacco with a Confocal microscopy. Scale bars = 20 μ m.

Supplementary Figure 7



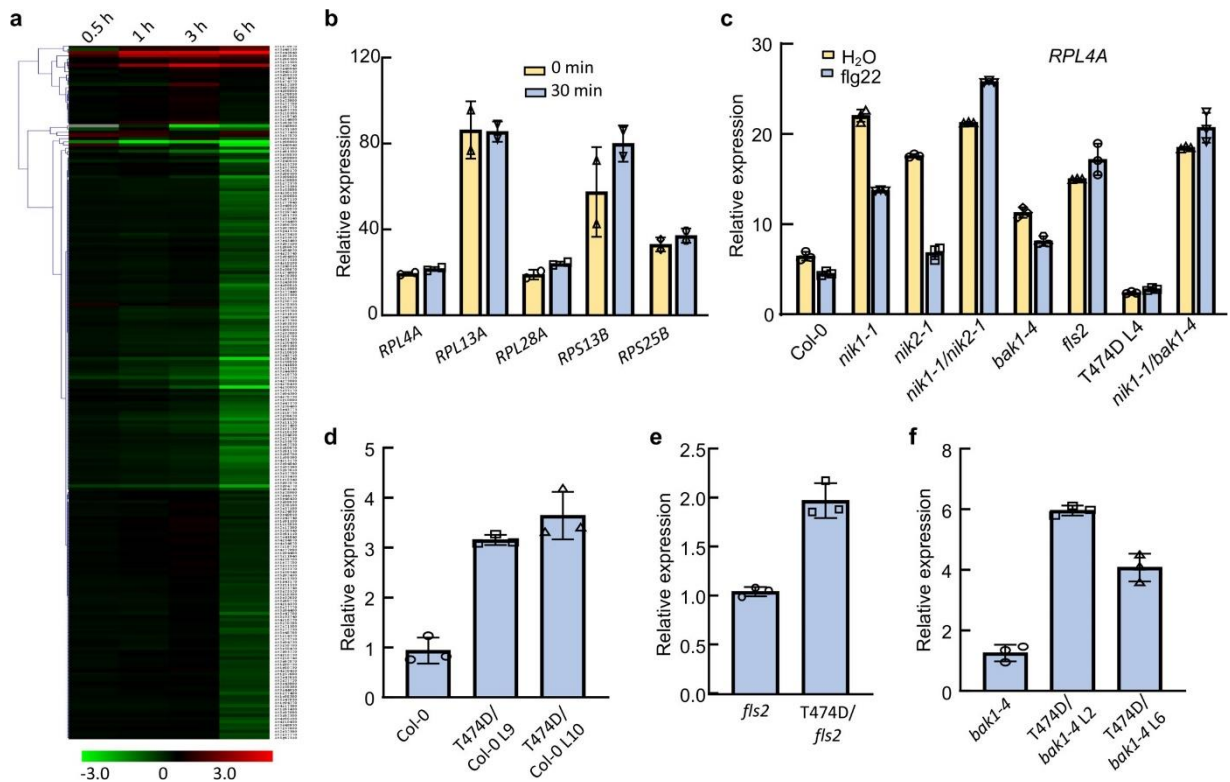
Supplementary Fig. 7 The Thr474 residue is one important site of NIK1 phosphorylation activity. **a** and **b** Mass spectrum analysis confirms the *in vitro* synthesized Thr474-containing NIK1 peptide sequence from the NIK1 activation loop. **c** *E. coli*-produced GST fusion proteins of NIK1JK (juxtamembrane domain and kinase domain), BAK1JK and FLS2JK were separated by SDS-PAGE and Coomassie blue-stained. **d** and **e** NIK1 autophosphorylation on Thr474 residue. MS spectrum of the *in vitro* synthesized peptide used as substrate in an *in vitro* kinase assay with GST-NIK1JK. The MS/MS spectrum of the phosphorylated peptide is shown in (**e**). **f** FLS2 does not phosphorylate NIK1 Thr474 in an *in vitro* kinase assay. The substrate peptide molecular weight monitored by MS spectrum from reaction with FLS2JK.

Supplementary Figure 8



Supplementary Fig. 8 NIK1 kinase activity is dispensable for the NIK1 negative regulatory role in the FLS2 signalling pathway. **a** Kinase activity of different NIK1 variants. NIK1 phosphorylation levels were detected by immunoblotting with α -phosphoserine (α -pSer), α -phosphothreonine (α -pThr) antibodies or an α -phosphotyrosine (α -pTyr) antibody. NIK1 proteins were detected using an α -NIK1 antibody as loading controls. **b** Flg22-induced mobility shift of NIK1 and NIK1 kinase mutant (km). Protoplasts were transfected with NIK1-HA or NIK1km-HA. Flg22 treatment was performed for 15 min before samples collection. Total proteins were shown by Ponceau S staining for RBC (bottom panel). **c** Flg22-induced association of BAK1 with NIK1 and NIK1km. BAK1-FLAG was co-expressed with NIK1-HA or NIK1km-HA in *Arabidopsis* protoplasts treated with 100 nM flg22. Co-IP assays were performed with α -FLAG agarose beads and with α -HA or α -FLAG for IB (top two panels). The input control is shown on the bottom two panels. **d** Flg22-induced BAK1/FLS2 complex formation was inhibited by NIK1km. BAK1-HA and FLS2-FLAG were co-expressed with NIK1km-GFP in *Arabidopsis* protoplasts treated with 100 nM flg22 for 10 min. Co-IP was performed as in (c). **e** Flg22-induced MAPK activation in *nik1-1* protoplasts expressing empty vector (EV), NIK1-HA or NIK1km-HA. Protoplasts were treated with 100 nM flg22 for 15 and 30 min, and MAPK activity was detected by IB with an α -pERK antibody (top panel). Total input proteins were shown by Ponceau S staining for RBC (bottom panel). **f** NIK1 and NIK1km suppress pFRK1::LUC induction. The pFRK1::LUC was co-transfected with vector control or NIK1 variants in protoplasts. UBQ10-GUS was included as a control and the luciferase activity was normalized with GUS activity. The data are shown as the mean \pm SD from three independent biological replicates.

Supplementary Figure 9



Supplementary Fig. 9 Flg22-induced suppression of ribosomal gene expression in a NIK1 and FLS2/BAK1 dependent manner. **a** Expression profiles of the *Arabidopsis* ribosomal protein gene family in response to flg22 treatment. Heatmap was generated based on the fold change after log₂ normalization with Mev software. **b** Transcript accumulation of selected RB genes 30 min after flg22 treatment. Gene expression of the indicated RB genes was determined by quantitative RT-PCR and *ACTIN2* as an internal control. **c** Flg22-induced suppression of *RPL4A* expression in different mutants. qRT-PCR analysis of *RPL4A* gene expression was performed with cDNA from indicated plants treated with or without flg22 treatment. *ACTIN2* served as an internal control. **d**, **e** and **f** *NIK1* expression levels in Col-0, *fls2*, *bak1-4* and T474D-overexpressing lines as determined by qRT-PCR. The respective 95% confidence interval limits were estimated based on bootstrap resampling replicates of three independent (n=3) experiments and three technical repeats.

Supplementary Table 1

Supplementary Table 1- Primers used in methods		
Primers for qRT-PCR		
	Fwd Primer	Rvs Primer
NIK1 qPCR	AGGCACGGTGGGTCACATT	TCCCGAAGCCAAAAACATCT
NIK2 qPCR	CCAATGGCAGTGTGCGTTCT	TGCTCCTAATGCTATTCGCTTTC
FRK1 qPCR	GCCAACGGAGACATTAGAG	CCATAACGACCTGACTCAT
WRKY30 qPCR	AGCCAAATTTCCAAGAGGAT	GCAGCTTGAGAGCAAGAATG
PP2C qPCR	CGTGTTGGGGATTGATTG	AGAGCTCGGGCGGTTATG
PR1 qPCR	GTTAGCGAGAAGGCTAACTAC	CATCCGAGTCTCACTGACTTTC
NHL10	TTCTGTCCGTAACCCAAAC	CCCTCGTAGTAGGCATGAGC
PHI1	TTGGTTTAGACGGGATGGTG	ACTCCAGTACAAGCCGATCC
UBQ10 qPCR	AGATCCAGGACAAGGAAGGTATTC	CGCAGGACCAAGTGAAGAGTAG
ACTIN2 qPCR	ATGTCGTGAGCCATCCTGTC	ACACCGGATTCGTGCGGCATAGAAG A
At2G19730 RPL28A	AAGCACTCTGGTCTTGCAAACA	GTGGTGGCGAGCACAACAG
At2G21580 RPS25B	CCGATCGTTACTCCGTCGAA	AGATTTGGCCGGCTTTGAT
At3G07110 RPL13A	GGCTGATCCAGAGCTGAGTGAAA	GTGGTGACGAGCATCAACCA
At3G09630 RPL4A	GTCACTGTTAGCTGAAGCACAGAG A	CCTCCTTGTAACGGTTTTCC
At4G00100 RPS13B	TCAGGCTCATCTTGTTGAGA	CAGACGGGAGGGAGCTTCTT
qRT-TRV2	TGCAGTGGCGGTGTTACAA	GTCGAGCCAGTGTTGCGCTT
Primers for qPCR		
CaLCuV DNA-B qPCR	GGGCCTGGGCCTGTTAGT	ACGGAAGATGGGAGAGGAAGA
18S rDNA qPCR	TAATTTGCGCG CCTGCTGCC	TGTGCTGGCGACGCATCATT
Primers for RT-PCR		
NIK1 RT	AAAAAGCAGGCTTACAATGGGA GCTGCAAGAGGG	AGA AAG CTG GGT CTC ATC TAG GACCAG AGA GCT C
NIK2 RT	CCAATGGCAGTGTGCGTTCT	TGCTCCTAATGCTATTCGCTTTC
BAK1 RT	AAAAAGCAGGCTTACAATGGACC CAGAAGTTCA	AGAAAGCTGGGTCTTCATTAAGCA TTCTTACAAC
ACTIN2 RT	GGCTGGATTTGCAGGAGATG	ACCATCACCAGAATCCAGCAC
Primers for point mutations		
NIK1Km	GTGGTTGCAGTGGAAAGGCTTAAA GAT	ATCTTTAAGCCTTTCCACTGCAACC AC
Primers for conventional PCR		
CaLCuV DNA-B	GGCGTGGGGTATCTTACTC	GACAT AGCATCGGACATCC
Primers for cloning		
AtNIK1- NcoI	CCATGCCATGGAGAGTACTATTGTT ATGATG	
AtNIK1- StuI	GAAGGCCTTCTAGGACCAGAGAGC TCCATTG	

Primers for genotyping		
LB b1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
NIK1 LP	GATACACAAGCCCTCTTGCAG	
NIK1 RP	TGTTGTGTATCATCAGGAGGC	
NIK2 LP	CCAAAGAAGAAAACCAAAGCC	
NIK2 RP	AGAGAAGCTCCAAGCCAAAAC	
BAK1 LP	CATGACATCATCATCATTTCGC	
BAK1 RP	ATTTTGCAGTTTTGCCAACAC	
SID2 LP	AAGACACAATCCGATTTGCTG	
SID2 RP	TCTGATGGATCTCCAATCGTC	

CAPÍTULO III

Caracterização funcional de *NIK3*, um novo elo entre desenvolvimento e imunidade em plantas

RESUMO

Os RLKs são proteínas de membrana e desempenham uma infinidade de funções moduladoras de respostas a estímulos, como estresses, ataque de patógenos, hormônios, e moléculas sinalizadoras. Inseridos na subfamília LRR-LRK II, as proteínas NIKs foram identificadas por interagirem com a proteína viral NSP (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN*) de geminivirus. Composto por três membros o subgrupo NIK é formado por NIK1, NIK2 e NIK3. NIK3 atua na via de resposta a infecção bacteriana e também modula a via de desenvolvimento mediada pelo peptídeo CLAVATA. Visando expandir a compreensão da função de NIK3 no desenvolvimento e em vias de resposta imune em *Arabidopsis*, foram feitas análises de sequenciamento do RNA de uma linhagem superexpressando NIK3 (RNA-seq). Com o objetivo de buscar interferências de NIK3 na via de resposta a brassinosteróides (BR), um dos principais fitormônios que regulam o crescimento e desenvolvimento de plantas, a linhagem superexpressando NIK3 assim como Columbia foram crescidas *in vitro* em meio MS puro e suplementado com BR. O resultado das análises RNA-seq mostraram que NIK3 está envolvida com o desenvolvimento de plantas regulando a percepção e sinalização a citocininas (CK), descartando a hipótese de atuação sobre a via de percepção e resposta a BR. Não houve grandes diferenças entre o grupo de genes induzidos ou reprimidos pelo tratamento com BR na linhagem superexpressando NIK3 quando comparado com Columbia. No entanto a superexpressão de NIK3 reprimiu 9 genes que se relacionam com a percepção e homeostase da resposta a CK, e induziu a expressão de 6 genes relacionados com a resposta negativa a CK. Dos 9 genes reprimidos por NIK3 que se relacionam com a via de CKs, dois codificam receptores específicos para CKs, AHK4 e AHK5, duas AHPs, AHP1 e AHP5 ambas proteínas sinalizadoras de CK que fosforilam ARRs (Reguladores de resposta em *Arabidopsis*) do tipo B, que também foram reprimidos por NIK3. Os ARR4 e ARR8 ambos ARRs do tipo B levam o sinal de citocininas do citoplasma para o núcleo e induzem a transcrição destes genes. Atuando como reguladores negativos da resposta a CK, ARR15, um ARR tipo B, que induz uma resposta de *feedback* negativo a CK, foi regulado positivamente por NIK3. Os transportadores de purinas e moléculas derivadas de purinas PUP1, PUP2 e PUP14 foram regulados negativamente por NIK3, sendo PUP14 comprovadamente um regulador negativo da percepção de CKs por transportar CKs do aploplasto para o citoplasma impedindo que AHKs percebam CKs e ativem a via de sinalização a estas moléculas. Genes relacionados com a resposta imune contra bactérias foram regulados negativamente pela superexpressão de NIK3. Estes incluem PRR-RLKs FLS2 e EFR responsáveis por perceberem os PAMPs bacterianos

fls2 e EF-Tu, e iniciar a resposta imune do tipo PTI, MAPK, e fatores de transcrição WRKY que ativam genes relacionados à resposta imune. Os genes *R RRS1* e *RPM1* foram regulados negativamente por NIK3, juntamente como o gene modulador da resposta imune *FRK1*. Apesar da superexpressão de NIK3 regular negativamente estes genes, aparentemente a PTI não foi prejudicada, visto que em um ensaio de infecção com *Pst* DC3000 em plantas superexpressando NIK3 o crescimento bacteriano e os sintomas da infecção não diferiram de Col-0. Assim sendo, é justificável afirmar que NIK3 atua regulando principalmente ETI não apresentando interferências significativas em PTI. Coletivamente estes resultados colocam NIK3 como o regulador negativo do crescimento por meio da regulação negativa da percepção e sinalização a CK, o mesmo pode ser afirmado a respeito da resposta imune contra bactérias, onde NIK3 parece regular negativamente ETI.

INTRODUÇÃO

A proteína NIK1, (*NSP- INTERACTING KINASE*), foi identificada por sua capacidade de interagir com a proteína NSP (NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN) de geminivírus que infectam tomateiros, sendo designado LeNIK (*Lycopersicum esculatum NSP-Interacting Kinase*) (Mariano et al., 2004). Homólogos da proteína NIK1 em *Arabidopsis thaliana*, NIK2 e NIK3, e soja (*Glycine max*), GmNIK1, também mostraram capacidade de interagir com NSPs de diferentes begomovirus, demonstrando que a interação de NIK1-NSP não é específica de espécies vegetais e tampouco específica das espécies de begomovírus (Fontes et al., 2004).

Funcionando como um típico receptor de membrana, as proteínas NIKs são LRR-RLKs (*LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASE*) do tipo Serina/Treonina cinase, sendo NIK1 a mais bem caracterizada funcionalmente. NIK1 induz uma resposta imune contra a infecção causada por begomovirus e, recentemente, foi demonstrado que NIK1 também funciona como um regulador negativo da resposta imune antibacteriana mediada por FLS2 e BAK1 (Li et al., 2019). Os mecanismos moleculares pelos quais NIK1 é ativada não são conhecidos, sabe-se que sua ativação é mediante a infecção viral. O reconhecimento do vírus parece estar relacionado com a percepção de ácidos nucleicos virais (Teixeira et al., 2019), porém os mecanismos de percepção dessas moléculas não estão bem estabelecidos. Por ser uma proteína antiviral de passagem única na membrana, NIK1 compartilha com PTI (*PAMP-triggered immunity*) similar mecanismo de ativação por fosforilação dependente de ligantes (PAMPs bacterianos) mas transmite uma resposta imune totalmente diferente de PTI (Zorzatto et al., 2015; Teixeira et al., 2019).

Baseado nas propriedades bioquímicas de NIK1 e características comuns de membros da família LRR-RLK, na qual estão inseridas as proteínas NIKs, um modelo foi proposto para a via de sinalização e sua interação com a proteína NSP de geminivírus. O modelo atual da via antiviral mediada por NIK1 sustenta que, na presença do vírus que fornece ácidos nucleicos como PAMPs (Teixeira et al., 2009), o domínio extracelular LRR de um receptor NIK1 sofre oligomerização com o domínio LRR de outro receptor NIK1 ou NIK2 ou outro RLK desconhecido, permitindo a aproximação dos respectivos domínios cinases, e fosforilação da treonina 474 presente no domínio intracelular de NIK1 (Santos et al., 2009). A fosforilação nessa posição é essencial para a ativação de NIK1 e se inicia a amplificação da cascata de sinalização que induz a fosforilação indireta da proteína ribossomal RPL10A e promove sua translocação para o núcleo da célula (Carvalho et al., 2008). No núcleo, RPL10 fosforilada

interage com o fator de transcrição LIMYB que atua na supressão da expressão de genes relacionados à maquinaria de tradução, e assim ocasionando diminuição da tradução global na célula (Zorzatto et al., 2015). Contrapondo esse mecanismo, NSP se liga ao domínio cinase de NIK1 impedindo a oligomerização e a fosforilação da treonina 474 (Fontes et al., 2004; Santos et al., 2009). Como consequência, RPL10 é mantida no citoplasma, impedindo que a via antiviral seja ativada (Carvalho et al., 2008). Desta forma a proteína viral NSP age suprimindo a defesa vegetal contra a infecção causada pelos geminivírus (Carvalho et al., 2008; Santos et al., 2009), estabelecendo um ambiente mais favorável à infecção viral, sendo NSP considerada um fator de virulências dos geminivírus (Carvalho et al., 2008; Santos et al., 2010). Embora componentes da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 tenham sido identificados, o mecanismo pelo qual leva à supressão de tradução global não é totalmente conhecido. Por exemplo, não se sabe se a translocação de RPL10 para o núcleo por si só causa desestabilização dos ribossomos e contribui assim para supressão precoce de tradução, ou se esse evento é totalmente dependente da associação de RPL10 com LIMYB.

Baseado nestas descobertas foi construído um mutante de AtNIK1-T474D, cuja treonina 474 foi substituída por um resíduo de ácido aspártico, introduzindo assim uma carga negativa permanente de forma a mimetizar a carga negativa do fosfato adicional da enzima em seu estado ativado (Santos et al., 2009). Esse mutante AtNIK1-T474D apresentou uma hiperatividade de cinase quando comparado à atividade normal de NIK1. A mutação também diminuiu o efeito inibitório imposto por NSP na atividade de transautofosforilação de NIK1, e plantas AtNIK1-T474D apresentam maior resistência à infecção causada por geminivírus, e menor acúmulo de DNA viral quando comparadas com plantas selvagem (Zorzatto et al., 2015; Brustolini et al., 2015). Outra evidência que reforça o papel de NIK1 na ativação de uma resposta imune contra a infecção viral é o fato de que o mutante nulo *nik1-1*, tem susceptibilidade aumentada a infecção viral, o mesmo foi observado para o mutante nulo *nik3-1*, mas não para *nik2-1* (Fontes et al., 2004). Estes resultados foram posteriormente confrontados, utilizando mutantes duplos que demonstraram que as proteínas NIK1 e NIK2 funcionam como receptores antivirais, sendo considerados parálogos (Teixeira et al., 2019).

Enquanto a planta nocaute *nik1-1* é mais susceptível a infecção causada por geminivírus, alelos nulos de *NIK1* (*nik1-1* e *nik1-2*) conferem uma maior resistência à infecção bacteriana, sugerindo que NIK1 modula inversamente as respostas imunes antiviral e antibacteriana (Fontes et al., 2004; Ahmed et al., 2018; Li et al., 2019). Esta hipótese foi recentemente

comprovada e o mecanismo de supressão de PTI por NIK1 decifrado (Li et al., 2019). Foi demonstrado que a inativação de *NIK1* aumenta e a hiperexpressão de *NIK1* diminui a amplitude da resposta imune mediada por PTI. Em condições normais NIK1 interage com o receptor da PAMP bacteriana flagelina, FLS2 (*FLAGELLIN-SENSITIVE 2*), e seu co-receptor BAK1 para prevenir autoimunidade. A afinidade das interações de NIK1 é aumentada após a percepção do peptídeo bacteriano flg22 por FLS2 (Li et al., 2019). Tratamento de plantas com o peptídeo ativo de flagelina, flg22, promove formação de um complexo imune ativo pela dimerização e fosforilação de FLS2 e BAK1 (Ma et al., 2016). NIK1 serve como substrato de BAK1, sendo então fosforilada no resíduo Thr-474. Consequentemente, flg22 também induz a fosforilação de NIK1 *in vivo*, um processo que requer BAK1 e FLS2. NIK1 fosforilada se liga mais eficazmente ao complexo de receptor FLS2/BAK1, regulando assim negativamente a via imune desencadeadas pelo complexo. A fosforilação de NIK1, induzida por flg22, inicia a transdução de um sinal antiviral levando à fosforilação de LIMYB e supressão da tradução global. Portanto, o tratamento com flg22 pode promover a resistência das plantas a geminivirus de uma maneira dependente de NIK1 (Li et al., 2019). Como a infecção por begomovirus já demonstrou suprimir a função antiviral de NIK1 através do supressor viral NSP, a ordem sequencial de eventos, pode invocar um mecanismo dependente de supressão para aliviar a modulação negativa mediada por NIK1 da resposta imune em condições normais.

Com relação à infecção por bactérias, em comparação com as plantas de tipo selvagem, observou-se uma redução significativa no crescimento bacteriano de *Pst* DC3000 hrcC- nos mutantes *nik1-2* (SALK_017538C) e *nik2-1* (SALK_044363C) indicando que NIK1 e NIK2 regulam negativamente a indução de PTI, uma vez que esta cepa não possui um sistema de secreção funcional tipo III necessário para o reconhecimento da proteína efetora nas células hospedeiras e ativação de ETI (*effector-triggered immunity*). Crescimento de *Pst* DC3000 (estirpe totalmente virulenta) em *nik1-2* e *nik2-1* não apresentou diferenças significativas quando comparado com plantas selvagem (Ahmed et al., 2018). Em outro estudo, a infecção com *Pst* DC3000 foi reduzida em *nik1-1* (SALK_060808), mas não em *nik2-1*, e permaneceu inibida no duplo mutante *nik1-1/nik2-1* na mesma extensão que em *nik1-1*, indicando que NIK2 não afeta resistência a *Pst* DC3000 (Ahmed et al., 2018). Na infecção de *Pto* DC3000 hrcC- não foi observada diferença de crescimento bacteriano em *nik1-1* quando comparado com o duplo mutante, porém foi observada uma maior susceptibilidade em *nik2-1*. Notavelmente, os mutantes *nik2-1* mostraram mais suscetibilidade à cepa não patogênica hrcC- (Li et al., 2019; Ahmed et al., 2018). Embora a redundância parcial entre esses genes parálogos possa

existir em relação à modulação de PTI, esses resultados sugerem que NIK1 e NIK2 podem regular a resposta imune contra bactérias de maneiras distintas (Li et al., 2019). Com relação a participação de NIK3 na modulação de mecanismos de defesa contra bactérias, foi observado um significativo aumento de crescimento da bactéria patogênica *Pto* DC3000 e também da estirpe *Pto* DC3000 hrcC– no mutante *nik3* (SALK_092902), indicando divergência funcional na resposta à infecção bacteriana diferente daquela de NIK1 e NIK2.

BAK1 e NIK1 são proteínas de membrana com grande similaridade estrutural (Sakamoto et al., 2012). Baseado em análise filogenéticas de domínio cinase e domínio extracelular, estas duas proteínas foram incluídas na subfamília II de LRR-RLKs, devido a presença de cinco repetições ricas em leucina (LRRs) em seus domínios extracelulares e um domínio de cinase altamente conservado (Sakamoto et al., 2012). Embora NIK1 e BAK1 sejam estruturalmente relacionadas, duas linhas de evidência indicam que estes receptores de membrana sejam funcionalmente divergentes. Primeiro, o mecanismo que fundamenta a via de defesa antiviral mediada por NIK1 é absolutamente divergente do mecanismo de imunidade desencadeada por PAMPs mediada pelo co-receptor BAK1 (Jordá et al., 2016; Zorzatto et al., 2015). Em segundo lugar, o transcriptoma induzido por inativação de *NIK1* no mutante *nik1-1* parece estar em perfeito contraste com as respostas moleculares induzidas pela ativação de BAK1 (Machado et al., 2015; Zorzatto et al., 2015).

Por meio de análise de RNA-seq, que permite avaliar diferencialmente a expressão gênica global, foi observado que no mutante de *nik1-1*, genes relacionados com a resposta a BR são regulados positivamente (Machado et al., 2015). Tais genes foram sub-categorizados como centros de controle na diferenciação celular, desenvolvimento da floração e desenvolvimento pós embrionário. Com relação aos genes envolvidos com mecanismos imunológicos dos vegetais, foi possível observar a expressão diferencial de genes induzidos que participam da resposta ao ácido salicílico (SA) e sinalização em resposta a bactérias (Machado et al., 2015). Estas observações sugerem que NIK1 possa atuar como um regulador negativo da resposta a brassinosteróides (BR), desempenhando um papel oposto ao de BAK1 na via de desenvolvimento mediada pelo receptor de BR, BRI1 (*BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1*). Além disso, também sugerem que BAK1 e NIK1 desempenham um papel inverso na via de resposta a estresses bióticos e resposta a SA. Esta última interpretação foi comprovada pelos estudos conduzidos em linhagens nocautes de NIK1 e crescimento de bactérias (Li et al., 2019). Embora a função moduladora de NIK1 em vias de desenvolvimento não tenha sido demonstrada

por genética reversa, provavelmente devido à redundância de função dos parálogos de NIK1 em *Arabidopsis*, algumas linhas de evidência indicam que NIK1 regula negativamente a sinalização por BR. Foi demonstrado, por meio de ensaio de duplo híbrido em leveduras, que o domínio cinase de NIK1 interage com o domínio cinase de BRL1 e BRL3, (BRI1-like), fundamentando a hipótese para a transdominância negativa de NIK1 por BR (Smakowska-Luzan et al., 2018). Além disso foi demonstrado que NIK1 também interage com BAK1, o coreceptor de BRI1 (Li et al., 2019). Baseado nestes resultados, torna-se razoável propor que NIK1 e seu parálogo NIK2 atuem regulando negativamente a via de desenvolvimento desencadeada pelo fitormônio BR.

Recentes resultados derivados de análises cêtricas da rede de interações de receptores LRR (*leucine-rich repeat*) indicaram NIK1 como sendo um alvo importante de efetores de diferentes patógenos e um dos 35 receptores mais influentes na transmissão de informações (Smakowska-Luzan et al., 2018, Ahmed et al., 2018). Foi também demonstrado, utilizando a rede de interações entre os RLKs de *Arabidopsis*, que NIK1 e NIK2 estão mais próximas funcionalmente e NIK3 parece se agrupar com outras RLKs divergindo de NIK1 e NK2. Este fato é um forte indício de que as proteínas NIKs possam atuar em vias de crescimento e desenvolvimento de diferentes formas. Assim como NIK1, é possível que NIK2 regule também a via imune e de resposta a BRs. Este fato é sustentado pela interação de NIK1 com BRI1 e BAK1, o qual também interage com NIK2 e FLS2 (Pontes, 2017). A rede de interações dos receptores transmembrana demonstra que NIK1 e NIK2 interagem com outras proteínas que modulam vias de crescimento e desenvolvimento como BRL3 e ERECTA (Smakowska-Luzan et al., 2018).

A participação de NIK3 em eventos de desenvolvimento tem sido mais bem caracterizada. Foi demonstrado que NIK3 regula negativamente o desenvolvimento mediado por CLAVATA, sendo que a interação de NIK3 foi comprovada com RPK2 (*RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2*), necessária para o desenvolvimento precoce de anteras (Mizuno et al., 2007) e BAM1/2 (*BARELY ANY MERISTEM1*), ambas LRR-RLKs, as quais interagem entre si regulando esta via de desenvolvimento (Hord et al., 2006). RPK2 é uma proteína semelhante ao receptor de CLV2 que está envolvida na percepção do sinal CLV3 para reprimir a expressão do fator de transcrição *WUS* (*Wuschel*). *WUS*, ativa diretamente a expressão de *CLV3* e promove atividade de células tronco no meristema apical do caule (Hu et al., 2018). A regulação desta via ocorre por meio da formação de um complexo para controlar a

divisão celular arcosporial, sendo que NIK3 pode participar desta via de resposta, por interagir diretamente com BAM1/2 e RPK2, a qual pode ser fosforilada por estas duas cinases (Hu et al., 2018). Neste estudo NIK3 foi designada CIK1 (*CLAVATA3 INSENSITIVE RECEPTOR KINASES*) e em um estudo anterior mostrou que BAM1 pode interagir com o RPK2 (Shimizu et al., 2015). Desta forma, fica claro o papel de NIK3 na via de resposta ao peptídeo CLAVATA, por meio da formação de complexos com outras proteínas. Com base na similaridade de sequências entre as proteínas NIKs, apesar de NIK1 e NIK2 serem funcional e filogeneticamente divergentes de NIK3 (Li et al., 2019; Cui et al., 2018), é possível que tanto NIK1, NIK2 e NIK3 regulem vias de crescimento e desenvolvimento e BR, por meio da formação de complexos proteicos com outras proteínas parceiras de interação.

Embora se tenha conhecimento de que as proteínas NIKs estejam envolvidas em mecanismos de resposta imune e o desenvolvimento do vegetal, os dados precedentes ainda são desconexos e fragmentados, exigindo um maior esforço de investigação para melhor compreender o papel destes receptores. A identificação de parceiros de interação com as proteínas NIKs, estudos de genética reversa, modificações bioquímicas e transcricionais induzidas por estes receptores são ferramentas que podem esclarecer a função deste grupo de receptores. O sequenciamento do transcriptoma (RNA-seq), é uma maneira eficiente de expandir os conhecimentos a respeito da função de uma proteína, gerando um grande volume de dados relacionados com o transcriptoma induzido por uma modificação genética ou condição ambiental, e juntamente com técnicas de bioinformática, permite a descoberta de alterações em vias de sinalização e na expressão de genes específicos, remontando perspectivas a respeito da funcionalidade de genes e proteínas (Grattapaglia et al., 2012).

Assim sendo, com o objetivo de expandir os conhecimentos relativos a processos moleculares e vias de sinalização moduladas por NIK3, foi conduzida uma análise de RNA-seq envolvendo plantas selvagem (Col-0) e plantas superexpressando NIK3 (OxNIK3-L1), submetidas ao tratamento com BR. As análises dos transcriptomas induzidos por NIK3 e pela interação de NIK3 com brassinosteróides permitiram uma melhor compreensão do papel de NIK3 na fisiologia e metabolismo envolvendo BR, e também seu envolvimento em outras vias moleculares em *Arabidopsis*. Mais especificamente, foi demonstrado que NIK3 pode estar envolvido diretamente na modulação negativa da sinalização por citocinina, um envolvimento de NIK3 em uma via de sinalização conectada ao desenvolvimento ainda não explorado na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e obtenção de linhagens transgênicas

Foram utilizadas sementes de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0), e o mutante *nik3-1* (Salk_034037), descrito por Fontes et al.; (2004), ambos disponíveis no Laboratório Molecular de Plantas/Bioagro. A confirmação de homozigose para a inserção do T-DNA no locus de interesse foi conduzida por PCR, utilizando os oligonucleotídeos desenhados pelo Salk Institute (Tabela 1). A transformação genética do mutante *nik3-1* e WT com o gene *NIK3-GFP* foi feita pelo método de mergulhia floral, utilizando a construção de DNA, designada 35S::NIK3_GFP (pK7FWG2-NIK3) (Fontes et al., 2004). Para isso, a construção pK7FWG2-NIK3 foi usada para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV 3101, por eletroporação utilizando um eletroporador Bio-Rad^R, a uma voltagem de 2000 V. As colônias transformantes foram selecionadas em placa de petri em meio LB sólido suplementado com espectinomicina (100 mg/μl), marca de seleção do vetor pK7FWG2 utilizado nas construções gênicas, e gentamicina (50 mg/l), para seleção da estirpe de Agrobactéria GV 3101. O método de mergulhia floral está descrito em Bent (2006).

A seleção de transformantes em T0 foi feita em placas de *petri* contendo meio MS 1/2 força suplementado com Canamicina (100 mg/μl). A confirmação da transgenia foi feita por PCR de DNA genômico extraído, segundo a metodologia de Dellaporta et al. (1983), com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os transgenes (Tabela 1). As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento a 21°C, com fotoperíodo 10h luz/14h escuro. A expressão do transgene foi avaliada por RT-qPCR.

Os mutantes *nik1-1*, *nik2-1*, *nik3-1*, *bak1-4*, alelos nulos obtidos por mutagênese insercional por T-DNA, previamente descritos (Fontes et al., 2004; Li et al., 2009), o duplo mutante *nik1-1/nik2-1* (Teixeira et al., 2019) e a linhagem complementada NIK1-5 (Zorzatto et al., 2015), foram disponibilizados pelo laboratório de Biologia Molecular de Plantas/Bioagro/UFV.

Crescimento de raiz e hipocótilo

Nestes ensaios de determinação de parâmetros de desenvolvimento, foram utilizados os genótipos Columbia (Col-0), *nik1-1*, *nik2-1*, *nik3-1*, *bak1-4*, *nik1-1/nik2-1* e a linhagem complementada NIK1-5. As sementes foram desinfestadas com solução contendo etanol 75% (V/V) e hipoclorito de sódio 10% (V/V), durante 15 minutos, e posteriormente lavadas duas

vezes com etanol 100%. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em placas de *petri* contendo meio MS 1/2 força (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 1% de sacarose. Em todas as placas, o efeito da ativação da via de sinalização por BR, foi avaliado com a adição de brassinosteróide sintético (brassinolídeo, BL) na concentração de 1 μ M (Hwang et al., 2007; Minami, et al., 2019). As placas contendo as sementes foram armazenadas a 4 °C por 72 h para quebra de dormência, e, posteriormente, expostas à luz por uma hora em câmara de crescimento a 22 °C. Após este período de exposição, as placas foram envoltas em duas folhas de papel alumínio para proporcionar a condição de ausência de luz, e a um segundo grupo de placas crescidas no escuro foi adicionado ao meio MS o inibidor da síntese de brassinosteróide brazilazole (BRZ) a 2 μ M (Assami et al., 2000; Xiong et al., 2019). Como controle, placas sem a adição de BL ou BRZ ficaram expostas à luz. Para todas as condições descritas, as placas ficaram expostas verticalmente, sob um fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro a 22 °C. As medições do comprimento do hipocótilo e da raiz foram feitas com o uso de paquímetro digital, após 7 dias de crescimento em câmara de crescimento. Para todos os genótipos e condições, foram tomadas as medidas da raiz e do hipocótilo de pelo menos 25 plantas.

Alongamento de pecíolo

A medição dos pecíolos foi realizada em folhas dos genótipos Columbia (Col-0), *nik1-1*, *nik2-1*, *nik3-1*, *bak1-4*, *nik1-1/nik2-1* e NIK1-5. As plantas foram cultivadas em solo por 30 dias em câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro a 22 °C. Folhas totalmente expandidas foram destacadas da roseta e seus pecíolos colocados em contato com meio MS líquido contendo BL na concentração de 1 μ M. Como controle, folhas destacadas da roseta também foram colocadas em contato com meio MS, porém sem a adição de BR. A medição dos pecíolos foi feita com o uso de paquímetro digital. Após 24h, as folhas foram destacadas da roseta e colocadas em meio MS líquido. Para cada genótipo foram medidos os pecíolos de 10 folhas.

Extração de proteínas, imunoprecipitação de NIK3-GFP e *western blot*

A expressão do transgene NIK3-GFP foi verificada por *western blot*. As proteínas totais foram extraídas das linhagens transformantes com tampão de extração de proteínas tris-HCL (Sigma) pH 8, 5 mM, Igepal (Sigma) a 2% e PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma) a 2 mM. Plântulas inteiras de 10 dias de idade, crescidas em meio MS estéril foram trituradas em

cadinho com nitrogênio líquido, seguido da adição do tampão de extração, pulso em sonificador de haste por 15 segundos e purificação das proteínas por centrifugação a 14.000 g por 15 min.

Por se tratar de uma proteína de membrana, a baixa rentabilidade da extração foi contornada precipitando NIK3-GFP com *beads* de Agarose-A (Invitrogen) e anticorpo anti-GFP (Life). No processo de precipitação de NIK3-GFP, o extrato proteico foi incubado com 5 µl do anticorpo anti-GFP por 8h a 4°C sob agitação lenta. Após este período, foram adicionados 50 µl de *beads* de agarose e incubados por mais 4h a 4° C sob agitação lenta, seguido de centrifugação e lavagem das *beads* com o tampão de extração por duas vezes. As proteínas imunoprecipitadas foram desligadas do complexo *beads*/anticorpo/proteína pela adição de tampão de amostra contendo betamercaptaenol e fervura em banho a 100° C por 10 minutos. Após centrifugação, as proteínas foram resolvidas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, contendo dodecil sulfato de sódio (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis SDS-PAGE 10%). Em seguida, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, posteriormente bloqueada em TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 140 mM) contendo 5% (p/v) de caseína, e então incubada com anticorpos anti-GFP (Life 1:10000) por cinco horas à temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad), conforme recomendações do fabricante, e a fluorescência foi captada em ChemiDoc MP Imaging System Bio-Rad.

Quantificação de zeatina

Foi realizada a quantificação dos fitormônios totais visando avaliar o efeito sinérgico dessas moléculas nos mutantes *nik1-1*, *nik2-1*, *nik3-1* e Col-0, uma vez que o crescimento e desenvolvimento vegetal sobre forte influência de efeito individual e sinérgico dos fitormônios como brassinosteróide, auxina e citocininas. Os metabólitos secundários foram extraídos de 220 g de tecido vegetal fresco, com uma solução de metanol:isopropanol:ácido acético na proporção de 20:79:1. O material vegetal foi triturado em nitrogênio líquido e misturado à solução extratora. Após ser levado ao vórtex por 1 min, os tubos contendo as misturas foram centrifugados a 14 000 g por 10 min a 4° C e o sobrenadante transferido para tubo novo. Todos os passos listados anteriormente foram repetidos com o precipitado resultante da centrifugação e o segundo sobrenadante foi filtrado juntamente com o primeiro em filtro de nitrocelulose de 0,2 mm. Após estas etapas, as amostras foram injetadas em espectrômetro de massas Q – TOF micro TOF QII, Bruker Daltonics, e o perfil de cada fitormônio foi obtido, sendo que os picos

foram analisados e corrigidos com o programa Sky Line. A concentração relativa do fitormônio e correção dos valores foram obtidos com o programa MetaboAnalyst 4.0.

Extração de RNA e preparo de cDNA

Os tecidos vegetais foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C. Para a extração do RNA total, foram utilizados aproximadamente 100 mg de tecido vegetal, macerado em cadinho com nitrogênio líquido e homogeneizados com 500 µL TRIZOL (Invitrogen). Após a extração, o *pellet* de RNA foi seco em temperatura ambiente por 15 a 20 min e ressuspendido em 40 µL de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro Bio Spec-Nano Shimadzu Biotech, a 260 nm, e sua concentração expressa em ng/µl. Na sequência 4000 µg de RNA foram tratados com 1 µl de DNase I (Invitrogen), por 25 minutos a 37 °C. Após este período, a enzima foi inativada pela adição de 1 µl de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a 25 mM, seguido por incubação a 65 °C por 10 minutos. A integridade do RNA tratado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão NBC (NaOH 5 mM, Ácido Bórico 50 mM, Citrato de Sódio 1 mM), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

Para preparo do cDNA, aproximadamente 3000 µg do RNA total foi utilizado como molde, juntamente com 4 µM do oligonucleotídeos oligo dT, 1 µl de dNTPs 10 mM, 4 µl do tampão da enzima transcriptase reversa (Invitrogen: Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 3 mM, MgCl₂ 75 mM) e 1 µl de M-MLV RT Transcriptase Reversa (Invitrogen) em um volume final de 20 µl, de acordo com as recomendações do fabricante.

Análises de qRT-PCR

A fim de avaliar/confirmar a ativação da via de BR das amostras tratadas e não tratadas com BR, e, subsequentemente enviadas para o sequenciamento, a expressão de genes marcadores da via de sinalização por BR foi avaliada por RT-qPCR (PCR em tempo real).

Nas análises de expressão gênica por RT-qPCR, o acúmulo de transcritos foi detectado utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). As reações de RT-qPCR foram realizadas em ABI7500 (Applied Biosystems) usando 500 fmols dos oligonucleotídeos com SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad). As condições de amplificação foram 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O gene de actina foi utilizado como

controle endógeno para a normalização dos dados. O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para a quantificação da expressão gênica.

Sequenciamento de RNA (Seq), plataforma illumina Hi-Seq 2000

O RNA total, após tratamento com DNase foi enviado para sequenciamento em uma solução de acetato de sódio 3 M (NaOAc, pH 5,5) e etanol absoluto na proporção de 0,1:2 respectivamente, contendo uma concentração total de RNA superior a 2000 ng por amostra. O sequenciamento das amostras de RNA, foi realizada na empresa Macrogen Seul Koreaia, utilizando a plataforma Illumina HiSeq™ 2500, no modelo *paired-end*, com o comprimento de sequenciamento de moléculas de cDNA de 35 a 100 pares de base. Para o sequenciamento foram utilizadas duas réplicas biológicas compostas cada uma por um *pool* de aproximadamente 10 plântulas (100 mg de tecido vegetal) da linhagem superexpressando NIK3-GFP (NIK3-L1) e o mesmo peso para Col-0, desenvolvidas por 10 dias em placa de *petri* com meio MS puro e suplementado com BL a 1 μ M, foram utilizadas para o sequenciamento.

Análises de bioinformática

As análises de controle de qualidade das sequências obtidas pelo sequenciamento foram realizadas por meio da trimagem das sequências de adaptadores e com qualidade de base inferior a 20 (“*Phred score*”). As sequências foram alinhadas no genoma de referência de *Arabidopsis* versão atual Araport 11 (Cheng et al., 2017), usando algoritmo de alinhamento Bowtie2 (Langmead et al., 2012 - <http://www.arabidopsis.org>).

A contagem das *reads* mapeadas por gene foi realizada usando o pacote Rsubread (Liao et al., 2013), disponível no programa R/Bioconductor e HTseq count (Anders et al., 2015). A normalização da matriz de contagem foi realizada usando fator de normalização TMM disponível no R/Bioconductor. A análise de expressão diferencial de genes (“*Differential genes expression*”-DGE) foi mensurada por meio do pacote DESeq2 R/Bioconductor (Love et al, 2014) com *p* valor 0.05 ajustado pela taxa de descoberta falsa (“*Falso discovery rate*”- FDR). Os genes diferencialmente expressos foram selecionados utilizando o critério do *p*-valor menor que 0.05, $\log_2FC < 1$ para genes regulados negativamente, e $\log_2FC > 1$ para identificar genes regulados positivamente.

As análises de enriquecimento gênico de genes diferencialmente expressos (negativa e positivamente) foram realizadas utilizando-se os pacotes R/Bioconductor GSEABase e GOstats

do R/Bioconductor (Falcon e Gentleman r, 2007). A expressão diferencial de genes considerados potencialmente relevantes por meio da análise de biologia sistêmica foi confirmada por meio de RT-qPCR.

Tabela 1: Oligo nucleotídeos utilizados em reação de PCR e RT-qPCR.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequencia 5' - 3'	Uso
Lbb 1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC	Confirmação de <i>nik3-1</i> , Salk_034037
nik3-034037-LP	CTTGGTTTCTCGGGAAAATTC	
nik3-034037-RP	GGTGAGGTTTCCGATTCTAGG	
NIK3BAMHI - Fwd	CGGGATCCATGGAAGGTGTGAGATTTGTGGTG	Confirmação de linhagens complementadas e superexpressando <i>NIK3</i>
NIK3STUI-Rvs	GAAGGCCTTCGAGGACCCGAGAGCTCAATGGC	
ACTINA3-Fwd	ATGTCGTGAGCCATCCTGTC	Controle endógeno usado nas reações de RT-qPCR
ACTINA3-Rvs	ACACCGGATTCGTGCGGCAT	
qPCR-NIK3-Fwd	AGCCTCTCACGCTTCCACAA	Quantificação da expressão de <i>NIK3</i> por RT-qPCR, nas linhagens transgênica, Col-0 e <i>nik3-1</i>
qPCR-NIK3-Rvs	GGCAAATGCAAGAGCAACGT	
XTR6483QRT-Fwd	TACTCTATCCTCTGGAACCCACA	Quantificação da expressão de <i>XTR6</i> por RT-qPCR, para verificar ativação da via de resposta a BR
XTR6580QRT-Rvs	CATTCTCATTGGCTGGTTCTTAG	
EXLA2-526QRT-Fwd	ACGTGAGAGTTGAAGAATCAAGC	Quantificação da expressão de <i>EXLA</i> por RT-qPCR, para verificar ativação da via de resposta a BR
EXLA2-632QRT-Rvs	GTCATGTA ACTCCAATGTGACGA	
FRK1-Fwd	ATCTTCGCTTGGAGCTTCTC	Quantificação da expressão de <i>FRK1</i> por RT-qPCR, validação do RNA-seq
FRK1-Rvs	TGCAGCGCAAGGACTAGAG	
PR1-Fwd	GTTAGCGAGAAGGCTAACTAC	Quantificação da expressão de <i>PR1</i> por RT-qPCR, validação do RNA-seq
PR1-Rv	CATCCGAGTCTCACTGACTTTC	

RESULTADOS

NIK3 regula processos de crescimento e desenvolvimento não relacionados com brassinosteróides

Baseado nas características fenotípicas dos mutantes das proteínas NIKs, resultados do transcriptoma do mutante *nik1-1* e parceiros de interações das proteínas NIK, levantou-se a hipótese de que este grupo de LRR-RLKs poderiam estar relacionados com o crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis*. Foi observado que quando desenvolvido em solo, o mutante *nik3-1*, apresentava características fenotípicas diferentes dos mutantes *nik1-1*, *nik2-1* e Col-0, apresentando crescimento sutilmente maior quando comparado com estes genótipos (Figura 1 e 9). Assim sendo, esta investigação ocupou-se de caracterizar o papel de NIK3 em vias de desenvolvimento.

Dada a similaridade estrutural entre as proteínas NIKs (1, 2 e 3) e BAK1, e ainda, levando-se em consideração que NIK1 e NIK2 interagem com BAK1 (Li et al., 2019), o principal correceptor do fitormônio brassinosteróide, inicialmente foram avaliados o alongamento do pecíolo, crescimento do hipocótilo e da raiz dos mutantes *nik1-1*, *nik2-1*, *nik3-1* e o duplo mutante *nik1/nik2* na presença de brasinolídeo (BL) ou inibidor da biossíntese de BR, brazilazole (BRZ). O tipo selvagem Columbia (Col-0) e os mutantes *bak1-4* e NIK1-5 foram utilizados como controle experimental. O alongamento de pecíolo foi avaliado após 24h de exposição de folhas a BL. Tratamento com BL induziu um maior alongamento do pecíolo no duplo mutante *nik1/nik2* quando comparado com Col-0 (Figura 1a). Mesmo as folhas não tratadas de *nik1/nik2* apresentaram maior alongamento de pecíolo do que Col-0, sendo este fenótipo também observado em *nik3-1*.

Foi também avaliado o crescimento do hipocótilo no claro e escuro, em meio suplementado com BL e BRZ. Nesse ensaio, foi observado maior crescimento no mutante *nik3-1* quando comparado com o tipo selvagem Col-0 tanto em meio MS puro, quanto em meio suplementado com BL (Figura 1b). No mutante *bak1-4* foram observadas diferenças significativas em plântulas crescidas no escuro e em resposta a BL, apresentando taxa de crescimento menor quando comparadas com Col-0. O efeito de BL na luz também foi menor em *nik1-1* do que em Col-0. Para os demais genótipos, desenvolvidos no escuro ou em meio contendo BRZ, não houve diferença significativa quando comparados com o tipo selvagem Col-0. O efeito inibitório do crescimento do hipocótilo por BRZ foi observado em todas as linhagens estudadas,

quando comparado o crescimento em meio MS puro e com BRZ.

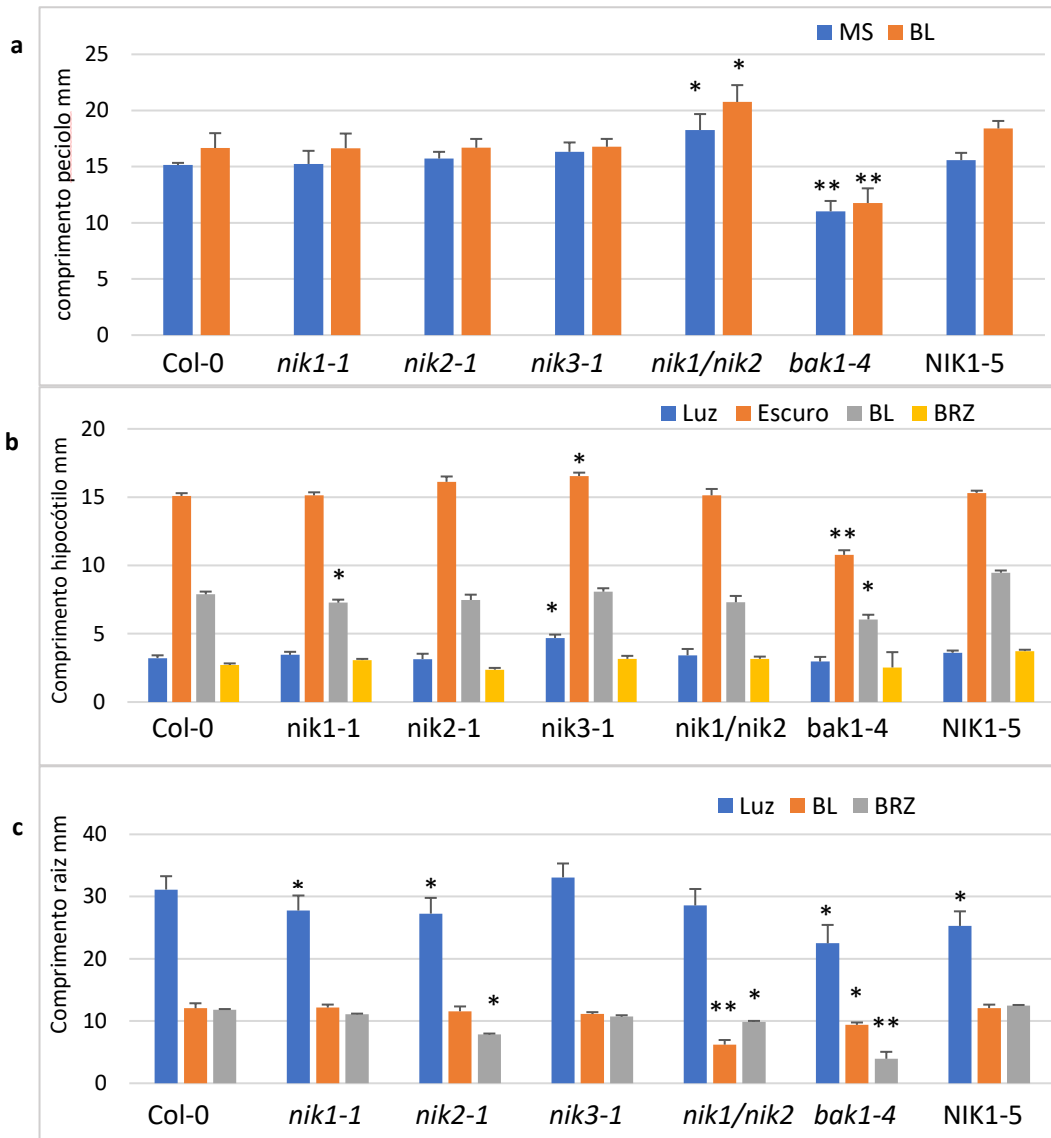


Figura 1: Alongamento do pecíolo, crescimento do hipocótilo e raiz nos mutantes *nik1-1*, *nik2-1*, *nik3-1*, o mutante *bak1-4*, Col-0 e a linhagem complementada NIK1-5 foram utilizados como controle. **a.** Alongamento do pecíolo. Folhas totalmente expandidas foram destacadas de plantas crescidas por 30 dias em solo e colocadas em meio MS líquido com BL na concentração de 2 μ M por 24 h, como controle o mesmo número de folhas foram também colocados em meio MS líquido sem a adição de BL. Todas as medições foram feitas com o uso de paquímetro eletrônico. **b.** Crescimento do hipocótilo. O crescimento de hipocótilo foi avaliado em diferentes condições de crescimento por 7 dias, em meio MS puro na luz e escuro, em meio MS suplementado com BL a 1 μ M na luz e em meio MS suplementado com BRZ a 2 μ M no escuro. **C.** Crescimento da raiz. O crescimento da raiz foi avaliado em diferentes condições de crescimento por 7 dias, em meio MS puro e suplementado com BL a 1 μ M e BRZ a 2 μ M. As barras representam o erro padrão com 95 % de significância, a variância entre os genótipos foi calculada e o asterisco representa o p valor $< 0,05$.

Nos experimentos de crescimento da raiz (Figura 1c), os mutantes *nik1-1* e *nik2-1* apresentaram redução no crescimento quando comparado com Col-0, o mutante *bak1-4*. O tratamento com BL inibiu o crescimento da raiz, apesar de estimular o crescimento do hipocótilo (Figura 1b e 1c). Este fenótipo induzido por BL já é descrito na literatura, sendo que a concentração de BL exógeno superior a 1 nM inibe o crescimento da raiz principal e induz a formação de raízes laterais por meio de uma ação sinérgica entre a ativação da via de BR e auxina. No entanto, o crescimento do hipocótilo só é estimulado em concentrações superiores a 10 nM atingindo resultados melhores na concentração de 1 μ M (Müssig & Altmann, 2003; Hwang et al., 2007; Minami, et al., 2019). O efeito inibitório do crescimento da raiz principal pelo BL foi observado em todos os genótipos estudados quando comparado com os mesmos genótipos crescidos em meio sem BL, apresentando significância estatística quando comparado com Col-0 somente em *nik1/nik2* e *bak1-4*.

A fim de examinar a participação de NIK3 na regulação do desenvolvimento e crescimento de Arabidopsis, foi obtido o transcriptoma induzido pela superexpressão de NIK3 na presença e ausência de BL. Para isso, o RNA total de plântulas de uma linhagem superexpressando NIK3-GFP (NIK3-L1) e Col-0 foram enviados para sequenciamento (RNA-seq) utilizando o protocolo Illumina. Os níveis de expressão de *NIK3* em NIK3-L1 enviada para sequenciamento e demais linhagens independentes podem ser observadas na Figura 2a. Como controle positivo e negativo, a expressão de *NIK3* foi também verificada em Col-0 e *nik3-1*. A inserção do T-DNA em *NIK3* no nocaute *nik3-1* e homozigose do genótipo foi confirmada por PCR Figura 2d. O acúmulo de NIK3-GFP sondado com anti-GFP nas linhagens complementadas e superexpressando NIK3-GFP é apresentado na Figura 2b. Para examinar se o transgene NIK3-GFP manteve a localização na membrana plasmática, a fluorescência das proteínas recombinantes nas raízes das linhagens transformadas foi avaliada por microscopia confocal, que certificou a concentração de fluorescência na membrana plasmática de células da raiz de NIK3-L1, NIK3-L2 e NIK3-L3 (Figura 2c). Foram enviados também para sequenciamento os RNAs das linhagens NIK3-L1 e Col-0 desenvolvidas em meio MS suplementado com BL, a fim de verificar se NIK3 está envolvido com o crescimento e desenvolvimento mediado pelo fitormônio brassinosteróide (BR). Os genes *XTR6* e *EXLA*, foram utilizados como marcadores da ativação da via de BR, certificando que a via foi de fato ativada, como observado na Figura 3. Observou-se que em todos os genótipos enviados para sequenciamento, o tratamento com BR induziu a expressão de *XTR6* e *EXLA*.

O transcriptoma induzido pela superexpressão de NIK3, compôs um conjunto de 1332 genes regulados positivamente e 1569 genes regulados negativamente, levando-se em consideração o ponto de corte ($\log_2 -1$ e 1 para *down* e *up* regulados respectivamente, $q=0,05$; p -valor ajustado). O tratamento com BL induziu a expressão de 1277 genes em NIK3-L1 e 1528 genes em Col-0, e reprimiu a expressão de 468 e 630 genes em NIK3-L3 e Col-0 respectivamente (Figura 4).

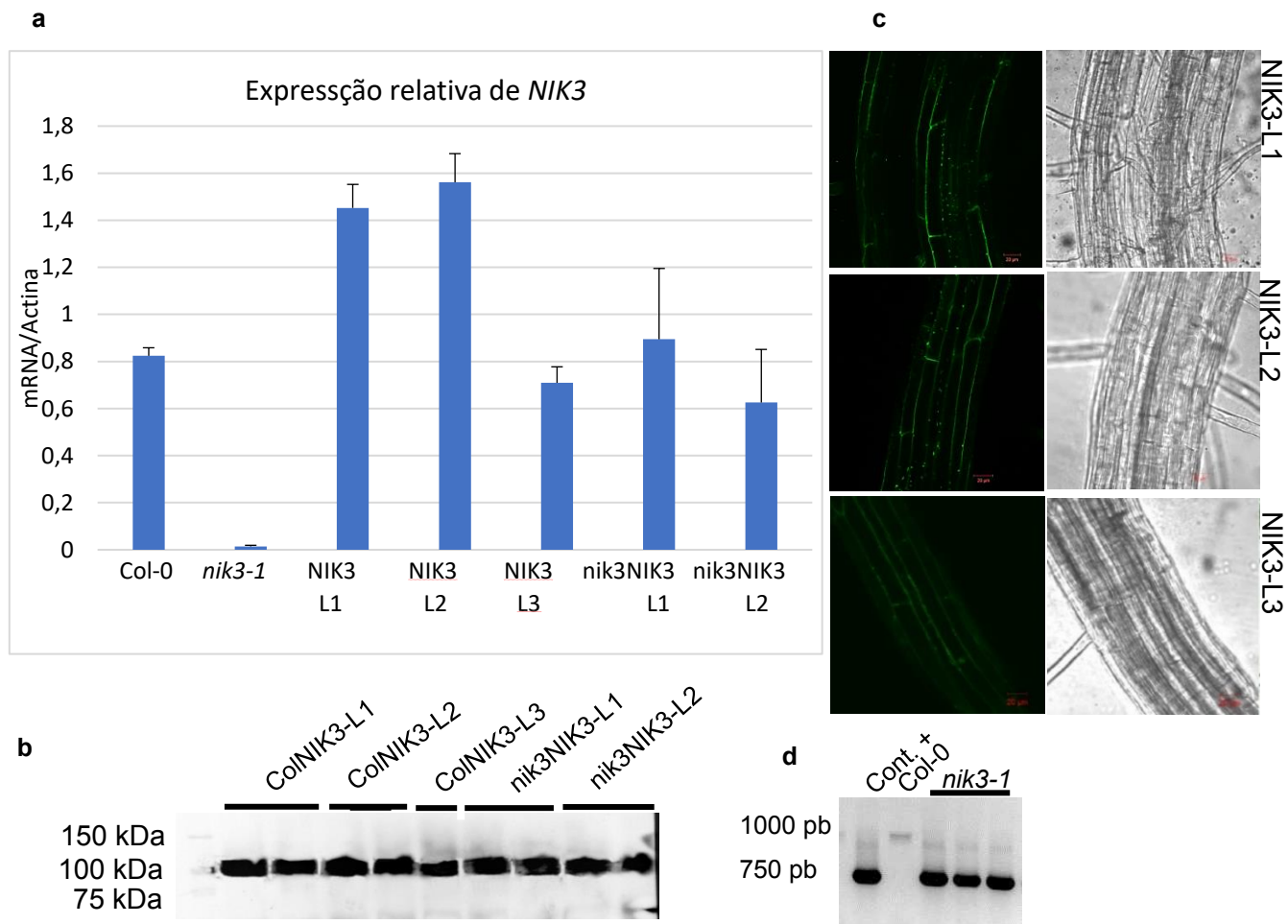


Figura 2: Expressão de NIK3 nas linhagens transgênicas superexpressando NiK3, *nik1-3* e complementadas com NIK3-GFP. **a.** Acúmulo do transcrito de NIK3 nos genótipos indicados na figura. A construção 35S_NIK3_GFP foi inserida no genoma de Arabidopsis Columbia (três linhagens independentes) e *nik3-1* (duas linhagens independentes), os níveis relativos de transcritos de NIK3 foi monitorado por qRT-PCR, os genótipos Columbia e *nik3-1* foram utilizados como controle o gene da actina foi usado como controle endógeno. As barras de erro representam intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). **b.** Os níveis de expressão de NIK3_GFP foi confirmado por western blot com o uso de anti-GFP. **c.** Microscopia confocal das linhagens superexpressando NIK3_GFP, mostrando a expressão da proteína quimérica na membrana plasmática. Foi utilizado o Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss LSM510 META, a proteína GFP foi excitada com laser de argônio com um comprimento de onda de 498 nm e a fluorescência capturada numa faixa de 320 a 390 nm, barras de escala correspondem a 20 μ m. **d.** Confirmação da inserção do T-DNA no gene de NIK3 (confirmação de *nik3-1*) por PCR o conjunto de iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1.

O resultado da expressão diferencial de genes mostrou que NIK3 não se relaciona diretamente com a regulação do crescimento induzido por BR. A superexpressão de NIK3 não induziu diferenças significativas em genes relacionados com a percepção e sinalização a BR, NIK3 se relaciona com o desenvolvimento modulando outras vias de crescimento e desenvolvimento.

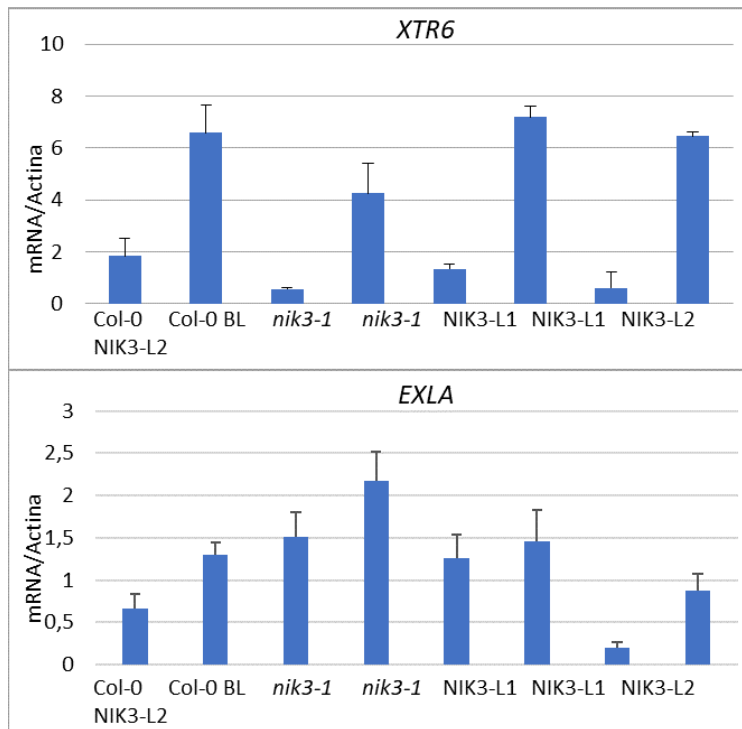


Figura 3: Confirmação da ativação da via de BR de plântulas crescidas em meio MS suplementado com BL. Os RNAs totais de Col e NIK3-L1 foram enviados para sequenciamento, sendo que a ativação da via foi previamente confirmada pela alteração da expressão dos genes XTR6, EXLA marcadores de sinalização por BR. O gene da actina foi usado como controle endógeno, as barras de erro representam intervalo de confiança (alfa=0,05).

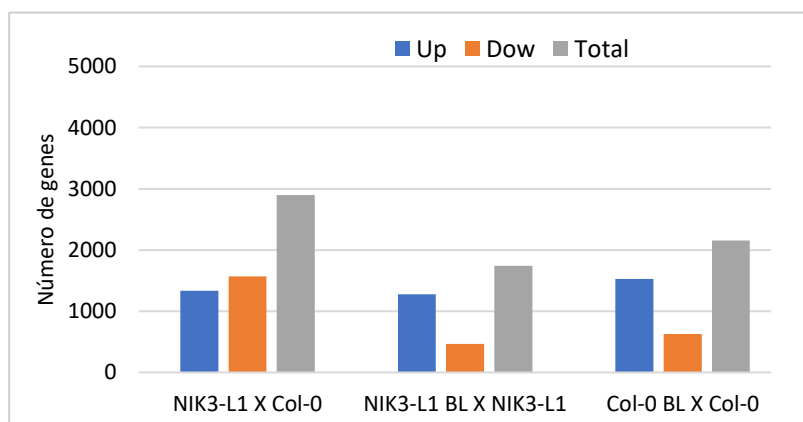


Figura 4: Variação global na expressão gênica induzida por NIK3 nos contrastes NIK3 X Col-0 e por BL nos contrastes NIK3 BL X NIK3 e Col BL X Col-0. O eixo x, indica o número de genes diferencialmente expressos e o eixo y os contrastes analisados.

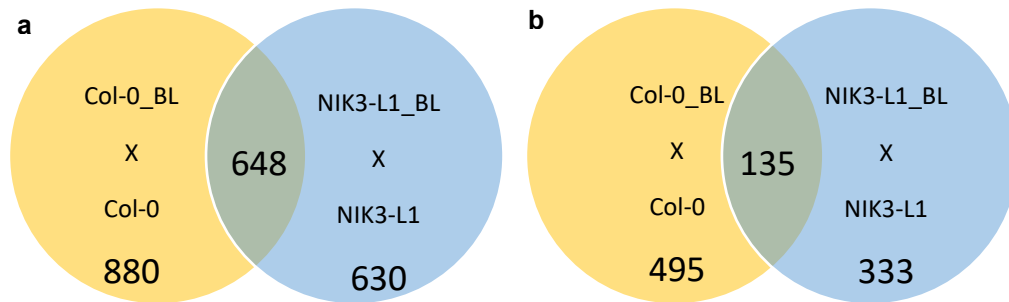


Figura 5: Diagramas de Venn representando uma distribuição de respostas conservadas e específicas induzida por BR em Col-0 e NIK3-L1. **a.** Genes regulados positivamente por BR no contraste Col-0 BR - Col-0 x NIK3L1 BR - NIK3L1. **b.** Genes regulados negativamente por BR nos contrastes acima.

O resultado do RNA-seq mostrou que a superexpressão de NIK3 regula negativamente vias de grande importância para o desenvolvimento de Arabidopsis e resposta imune contra bactérias. A superexpressão de *NIK3* promoveu a regulação negativa da via de resposta a zeatina (citocinina) (Figura 6). Adicionalmente, os genes *UGT85A5* e *UGT85A1* que codificam enzimas pertencentes a família uridina difosfato glicosiltransferase (UDP-glicosiltransferase) que catalisam reações de glicosilação de citolisinas (CK) e participam da homeostase hormonal, foram regulados positivamente (Figura 7). As enzimas *UGT85A5* e *UGT85A1* atuam na glicosilação de citocininas e outros fitormônios que se relacionam com estresse biótico e abiótico (Jackson et al., 2002). No entanto, o substrato de *UGT85A5* ainda não foi identificado (Sun et al., 2013). Já *UGT85A5*, influencia a homeostase CK por glicosilação, pelo menos a *trans*-zeatina, a forma mais funcional desse regulador de crescimento em Arabidopsis (Jin et al., 2013).

Para os mutantes *nik1-1*, *nik2-1* e *nik3-1* foi feita a quantificação de fitormônios, e foi observado um maior acúmulo de *trans*-zeatina no mutante *nik3-1* (Figura 8), quando comparado com Col-0, *nik1-1*, *nik2-1*. Para *cis*-zeatina, foi observado o inverso, onde observou-se acúmulo dessa molécula no tipo selvagem Col-0, seguido por *nik1-1*, *nik3-1*, com o menor acúmulo observado em *nik2-1*. Tais resultados indicam, que a maior taxa de acúmulo de *trans*-zeatina em *nik3-1* pode estar relacionada com processos de glicosilação, uma vez que em NIK3-L1, dois genes que codificam enzimas relacionadas com a glicosilação de fitormônios foram regulados positivamente.

Genes relacionados com a percepção e resposta a citocininas (CKs) se mostraram regulados negativamente em NIK3-L1 quando comparados com Col-0, (Tabela 2). Dentre os genes

reprimidos em NIK3-L1, merece destaque *AHP1*, *AHP5*, *AHK3* e *AHK5*, sendo todos codificadores de proteínas do tipo histidina cinase relacionadas com a percepção de CK e outros hormônios como ácido abscísico (ABA) e etileno (ET).

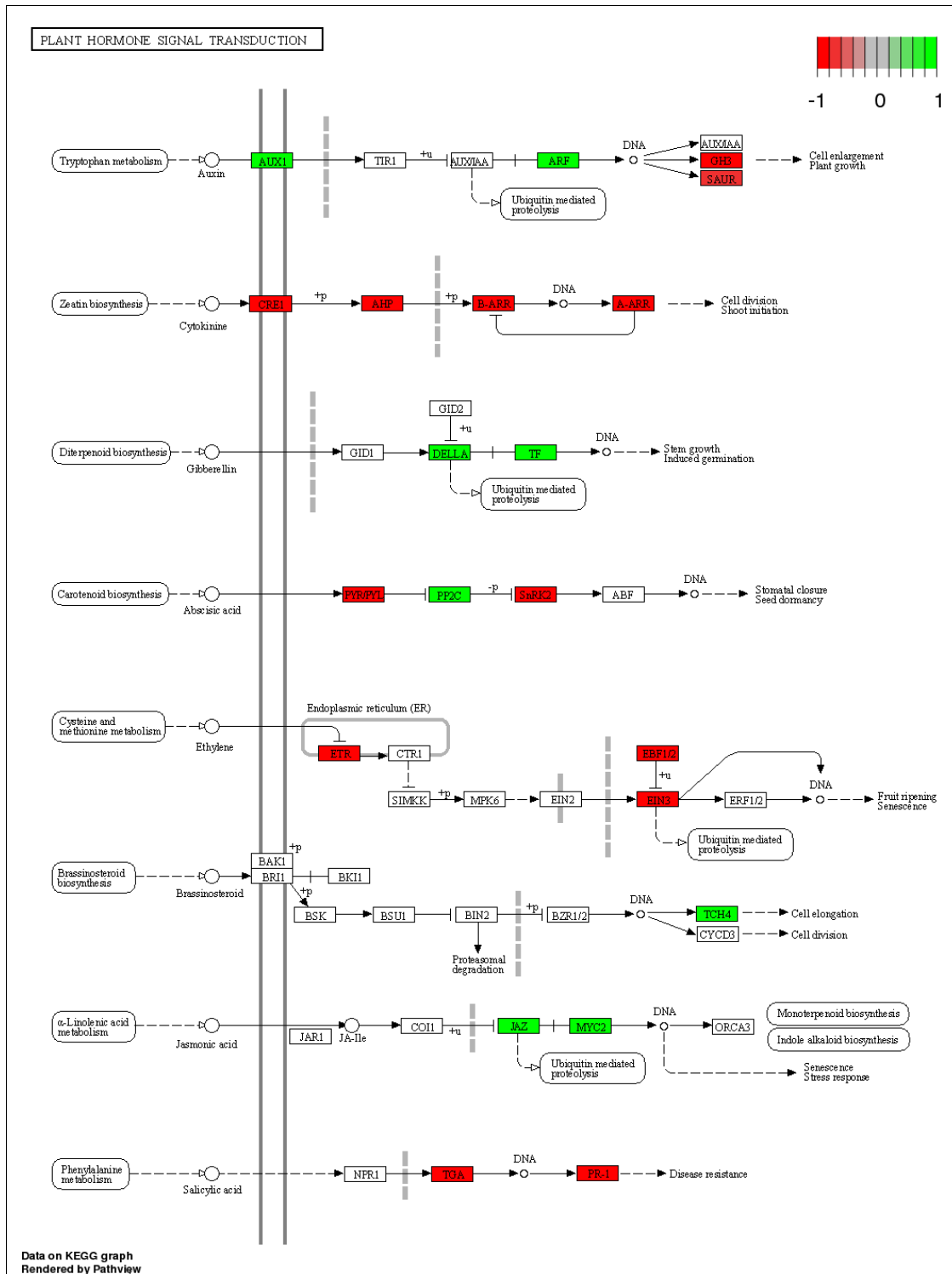


Figura 6: Genes envolvidos na percepção e sinalização de hormônios. Em verde genes induzidos e em vermelho genes reprimidos pela superexpressão de NIK3. Destaque para a via de Zeatina onde todos os genes foram regulados negativamente. Dados baseados em de $\log_2 \text{fold change} = 1$ e p -valor de 0.05.

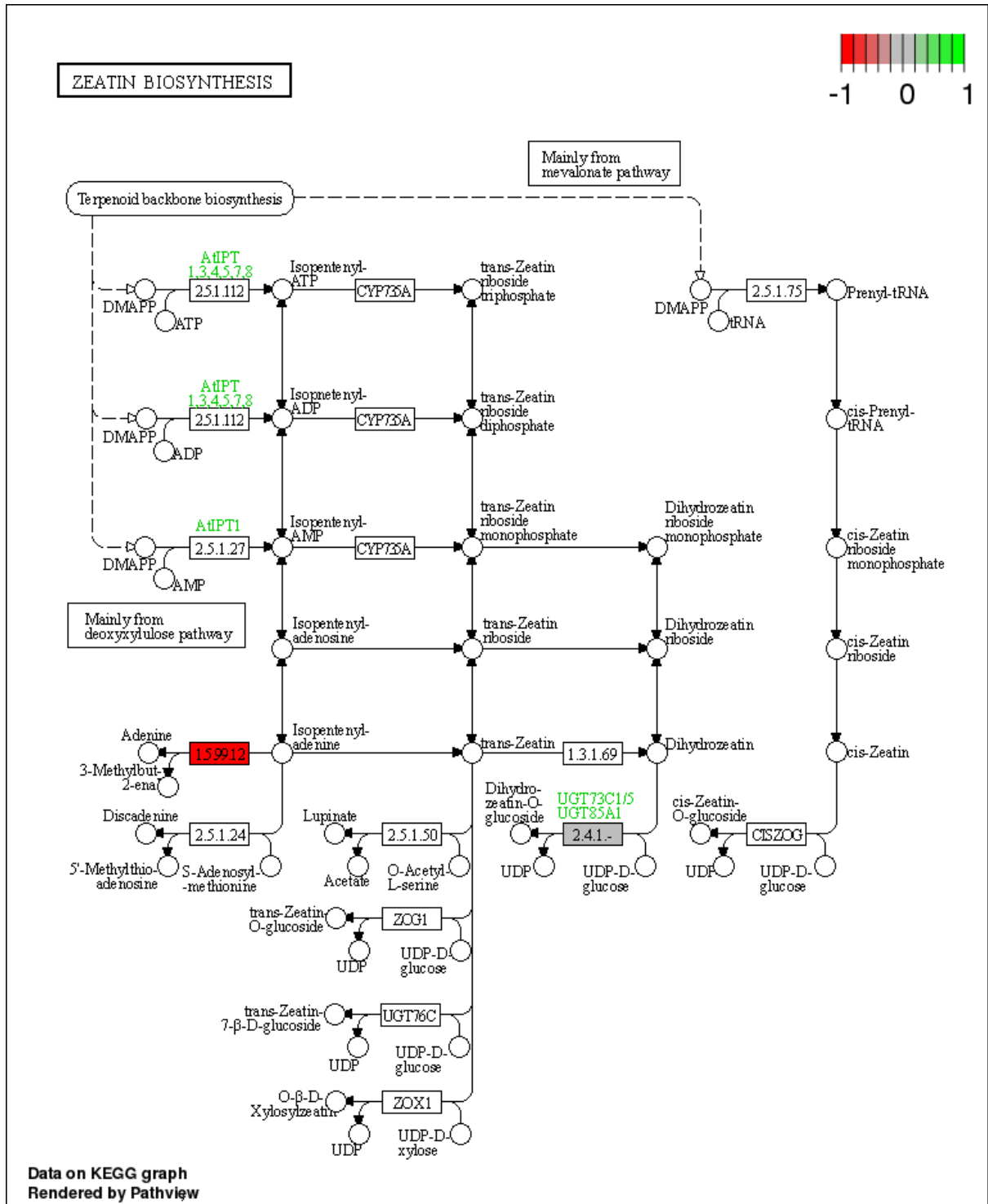


Figura 7: Expressão diferencial de genes, induzidos (verde) ou reprimidos (vermelho) por NIK3, envolvidos com as etapas de síntese de zeatina. Dados baseados em $\log_2 \text{fold change} = 1$ e p -valor de 0.05.

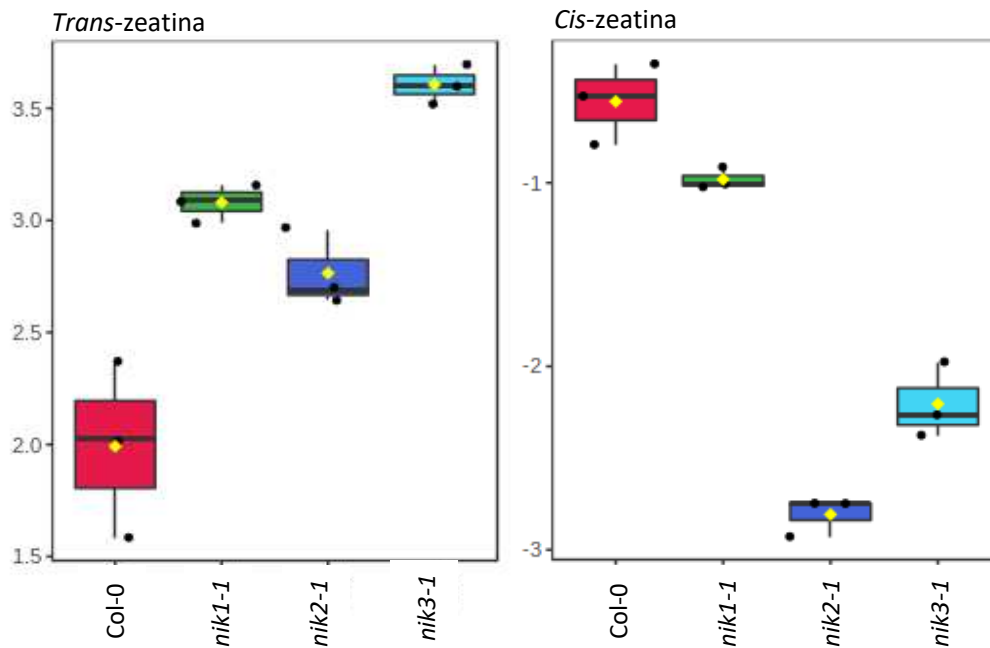


Figura 8: Acúmulo de *trans*-zeatina e *cis*-zeatina em Col-0 (vermelho), e nos mutantes *nik1-1* (verde), *nik2-1* (azul escuro) e *nik3-1* (azul claro).

Também foram reprimidos genes ARR (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS), sendo eles, *ARR4*, *ARR8* e *ARR10*. A proteína ARR4 é uma proteína correceptora necessária para a percepção de CK, enquanto ARR8 e ARR10 estão envolvidas na regulação negativa e positiva de vias induzidas por CK respectivamente. Por último é observada a regulação negativa de duas sulfurotransferases induzidas por CK, ST4A e ST4B (Tabela 2).

Tabela 2: Genes reprimidos por NIK3 relacionados com a percepção e sinalização a citocininas.

ID	Nome	log ₂ fold change	padj
AT3G21510	<i>AHP1</i>	-2,32	0,00
AT3G16360	<i>AHP5</i>	-1,64	0,01
AT2G01830	<i>AHK3</i>	-1,61	0,00
AT5G10720	<i>AHK5</i>	-3,16	0,00
AT1G59940	<i>ARR4</i>	-1,47	0,00
AT2G41310	<i>ARR8</i>	-1,91	0,00
AT4G31920	<i>ARR10</i>	-1,08	0,00
AT1G13420	<i>ST4B</i>	-2,05	0,00
AT1G13430	<i>ST4A</i>	-3,58	0,00

Com relação a genes regulados positivamente envolvidos no metabolismo e percepção CK, pode-se citar dois genes que se relacionam com a regulação negativa da resposta a CK, *KFB20* e *ARR15*, sendo que o segundo codifica um regulador negativo ARR tipo B, grupo que engloba

genes fundamentais para a homeostase de CK. Os demais genes regulados positivamente codificam proteínas relacionadas com o transporte de purinas, moléculas derivadas de purinas e CK (Tabela 3). Desta forma é justificável afirmar que NIK3 atua como um regulador negativo na síntese e percepção de CK mais especificamente a zeatina. Consistente com esta observação, o mutante *nik3-1* apresenta um relativo aumento de crescimento quando comparado com Col-0, sendo o oposto observado para as linhagens superexpressando NIK3, onde principalmente NIK3-L1 e NIK3-L3 apresentaram redução no crescimento quando comparadas com Col-0 (Figura 9). Nenhuma diferença aparente foi observado nas linhagens complementadas *nik3NIK3-L1* e *nik3NIK3-L2*.

Tabela 3: Genes induzidos por NIK3 relacionados com a sinalização e transporte de citocininas.

ID	Nome	log ₂ fold change	padj
AT1G74890	<i>ARR15</i>	1,70	0,00
AT1G80440	<i>KFB20</i>	1.41	0,00
AT1G28230	<i>PUP1</i>	1,87	0,00
AT2G33750	<i>PUP 2</i>	1,14	0,01
AT1G19770	<i>PUP14</i>	1.00	0,00



Figura 9: Fenótipos de Col-0, *nik3-1* e as linhagens complementadas (*nik3NIK3*, L1 e L2) e superexpressando NIK3 (L1, L2 e L3).

Genes relacionados com a percepção e indução de PTI e ETI foram reprimidos pela superexpressão de NIK3

Outro grupo de genes de grande importância na percepção de estresse, também se mostrou regulado negativamente por NIK3. Dentre eles, pode-se citar os RLL-RLKs *FLS2* e *EFR* (Tabela 4; Figura 10), receptores que percebem o peptídeo bacteriano flagelina (flg22) e o fator de alongação bacteriano EF-Tu e desencadeiam a sinalização que ativa vias de defesa de resistência a patógenos de amplo espectro, gerando uma clássica resposta imune do tipo PTI (*PAMP-triggered immunity*). Além destes dois receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), alvos a jusante da resposta imune contra bactérias, também se mostraram regulados negativamente. Estes incluem um grande número de fatores de transcrição da família WRKY (Tabela 4), e genes de proteínas R responsáveis por reconhecerem Avr bacterianos e ativar ETI, além de contribuírem para a intensificação de PTI mediante a percepção de flg22 por *FLS2*. Buscando expandir a compreensão da função de NIK3 na resposta imune contra bactérias, foi realizado um ensaio de infectividade com *Pst* DC3000 em *nik3-1*, NIK3-L1 e *nik3NIK3-L1*, utilizando o tipo selvagem Col-0 como controle experimental. Para estes genótipos o maior número de UFC (unidades formadoras de colônias) foi observado em *nik3-1*, acompanhado de maior intensidade dos sintomas como pode ser visto na Figura 11. Para *nik3NIK3-L1* e NIK3-L1 não foi observada nenhuma diferença significativa quando comparados com Col-0.

Para a validação dos resultados do RNA-seq, foram selecionados alguns genes diferencialmente expressos no contraste Col_mock/NIK3_mock e os níveis de transcritos foram estimados também por RTq-PCR. De uma forma geral os todos os genes selecionados apresentam níveis de expressão condizentes com os encontrados nas análises de RNA-seq (Figura 12), tanto para genes regulados negativamente e positivamente. O gene *XTR6* marcador da via de BR, anteriormente utilizado para verificar a ativação da resposta a BR em Col-0 e NIK3-L1 crescidas em meio com BL (Figura 2), também foi induzido, de acordo com os resultados do RNA-seq, no contraste NIK3_BL/NIK3_mock e Col_BL/Col_mock, apresentado $\text{Log}_2 \text{fold change}$ de 2,12 e 1,2 respectivamente. Já *EXLA* só foi induzido no contraste NIK3_BL/NIK3_mock ($\text{Log}_2 \text{fold change} = 1,63$) (Figura 12), apesar de ter tido também sua expressão aumentada mediante o tratamento com BL em Col-0 nas análises de RT-qPCR (Figura 2).

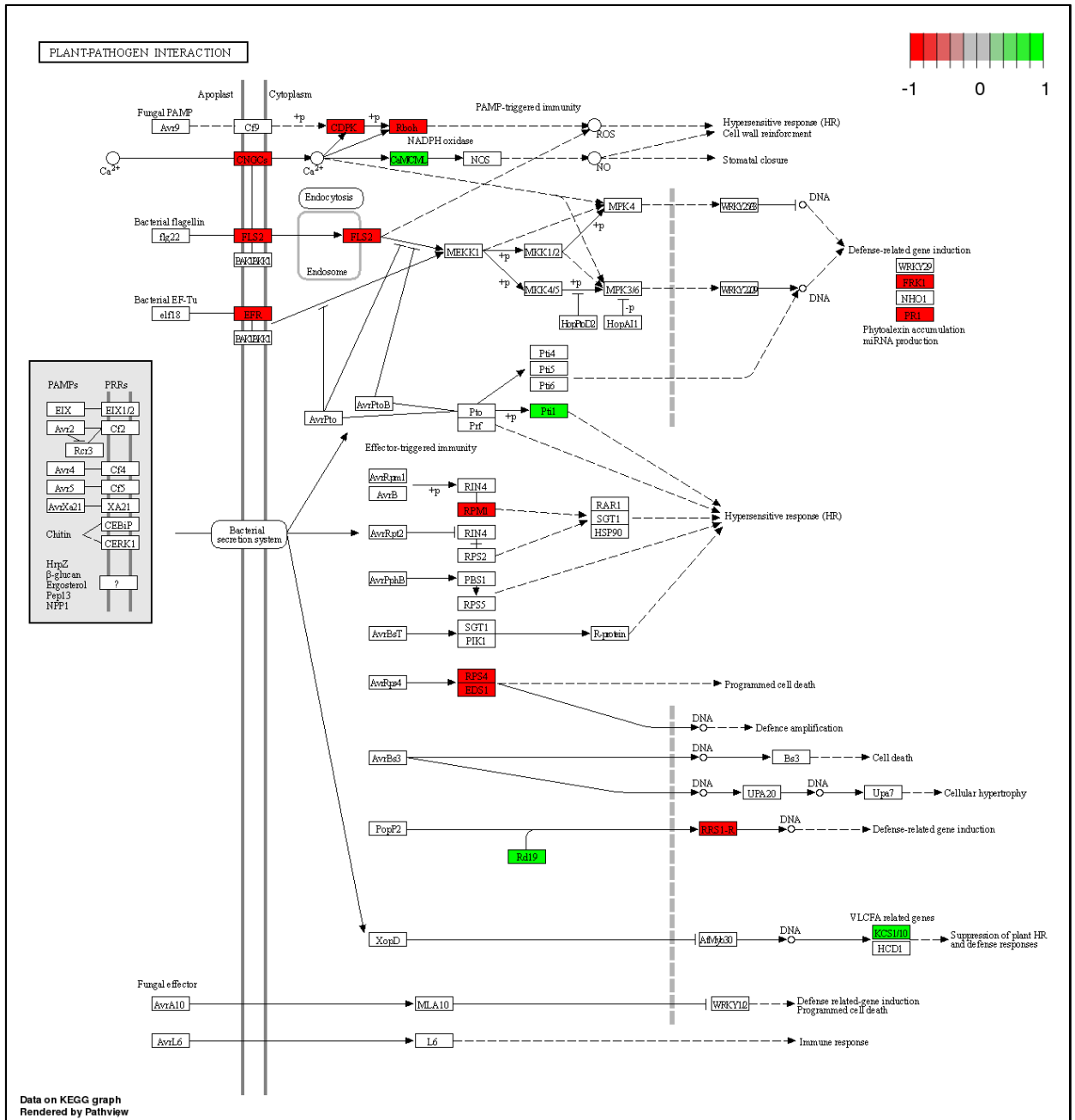


Figura 10: Genes envolvidos em resposta imunológica são regulados diferencialmente pela superexpressão de NIK3 em comparação com o genótipo selvagem. Genes em vermelho são reprimidos e em verde induzidos. Dados baseados em de $\log_2 \text{fold change} = 1$ e p -valor de 0.05.

Tabela 4: Genes reprimidos por NIK3 relacionados com a percepção e sinalização a patógenos

ID	Nomes	log ₂ fold change	p _{adj}
AT5G46330	<i>FLS2</i>	-1,41	0,00
AT5G20480	<i>EFR</i>	-1,47	0,00
At2g19190	<i>FRK1</i>	-5,78	0,00
AT5G45260	<i>RRS1</i>	-1,02	0,00
AT3G07040	<i>RPM1</i>	-1,36	0,00
AT4G12020	<i>MEKK</i>	-1,40	0,00
AT5G24110	<i>WRKY30</i>	-2,46	0,00
AT3G01970	<i>WRKY45</i>	-1,50	0,00
AT5G26170	<i>WRKY50</i>	-1,68	0,00
AT5G13080	<i>WRKY75</i>	-1,83	0,00

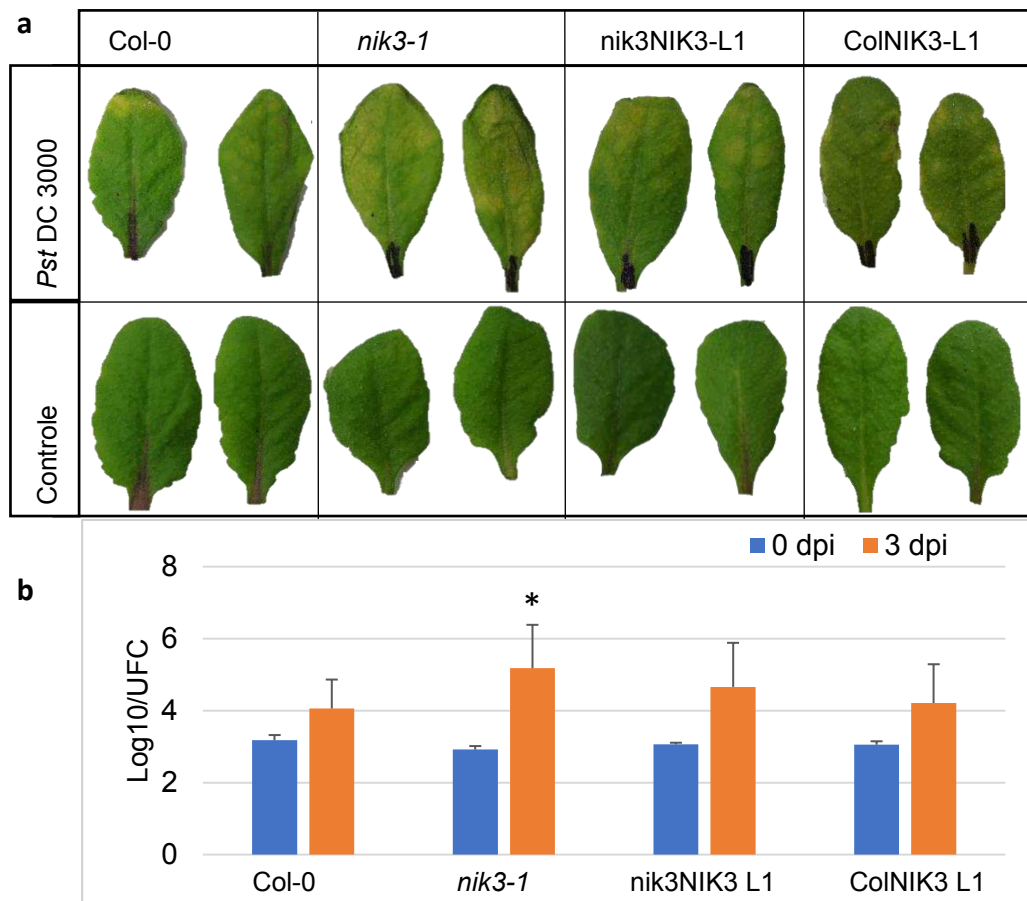


Figura 11: Ensaio de crescimento de *pst* DC 3000 em Col-0, *nik3-1*, linhagem 1 complementada com NIK3_GFP (*nik3NIK3-L1*) e superexpressando NIK3_GFP (NIK3-L1). **a.** Sintomas da infecção por *Pst*. Folhas de *Arabidopsis* crescidas por 25 dias foram infiltradas com *pst* DC 3000 em OD de 10^{-4} , os sintomas da infecção bacteriana podem ser observados em todos os genótipos apresentando uma maior intensidade em *nik3-1*, folhas não infectadas podem ser observadas como controle. **b.** Crescimento bacteriano. Contagem de unidades formadoras de colônias após 3 dias de inoculação de *pst* DC 3000 em Col-0, *nik3-1* e em *nik3NIK3-L1* e NIK3-L1. O mutante *nik3-1* apresentou um considerável aumento de unidades formadoras de colônias quando comparado com os demais genótipos. As barras representam o erro padrão com 95% de significância, a variância entres os genótipos foi calculada e o asterisco representa o *p* valor < 0,05.

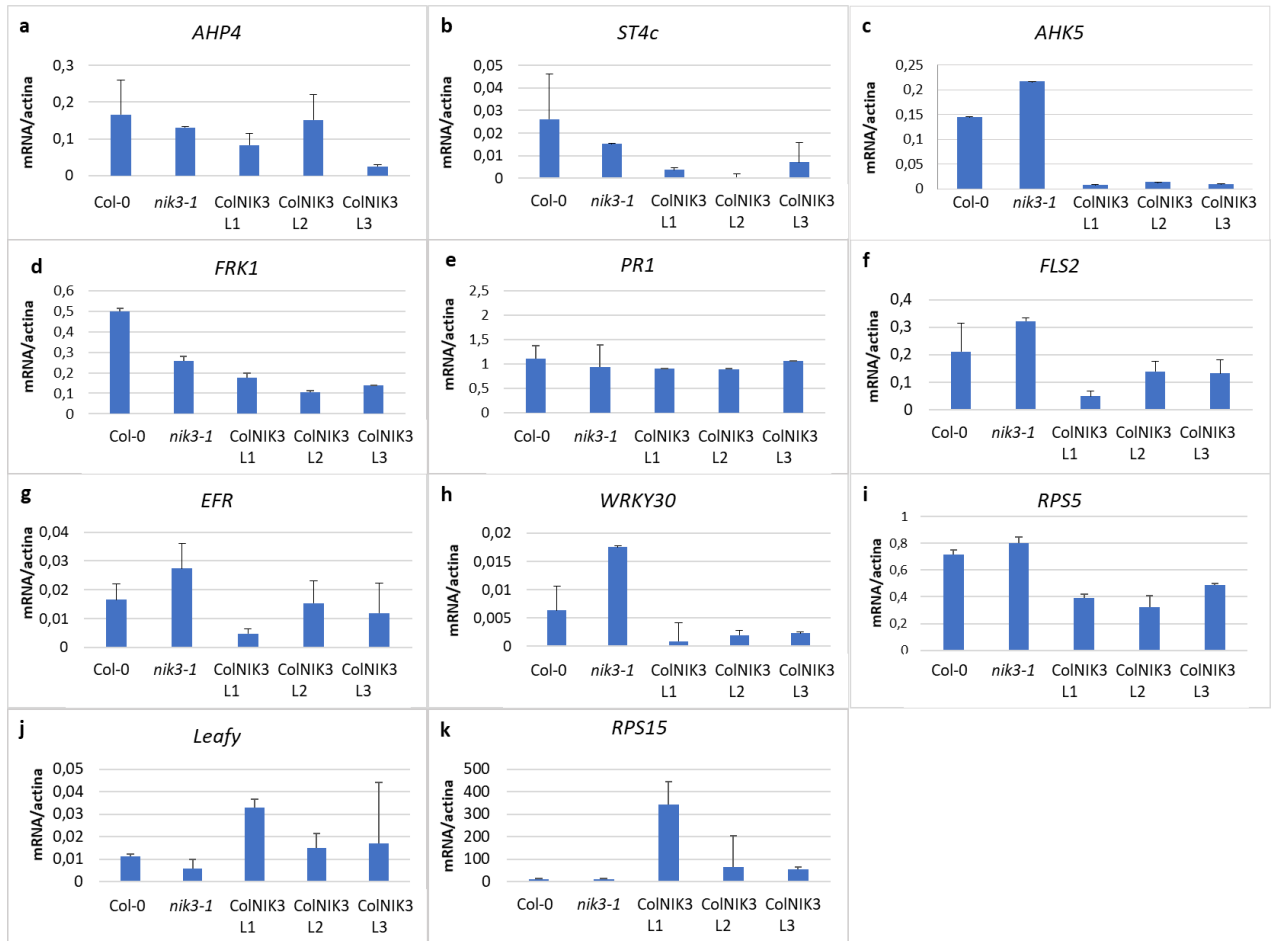


Figura 12: RTq-PCR de genes diferencialmente expressos no contraste Col_mock/NIK3_mock, selecionados para validação do resultado do RNA-seq. **a-c** Expressão relativa de genes relacionados com a resposta a citocinas regulados negativamente (\log_2 fold change, *AHP4*=-1,64; *ST4c*=-2,05, *AHK5*=-3,16). **d-h** Genes marcadores de resposta imune, negativamente regulados pela superexpressão de NIK3 (\log_2 fold change tabela *FRK1*=5,78; *PR1*= 2,35; *FLS2*=-1,41; *EFR*=-1,47; *WRKY30*=-2,46); **i** Gene de proteína ribossomal S5 regulado negativamente por NIK3 (\log_2 fold change = -1,18). **j-k** Genes regulados positivamente por NIK3 (\log_2 fold change, *Leafy*= 14,35; *RPS15*= 1,47). A expressão gênica relativa foi calculada pelo método do $2^{-\Delta CT}$, o gene da actina foi usado como controle endógeno, as barras de erro representam intervalo de confiança (alfa=0,05).

DISCUSSÃO

NIK3 regula negativamente genes envolvidos na síntese, percepção e resposta a citocininas

Compreender os mecanismos que regem o crescimento e desenvolvimento de plantas tem sido cada vez mais importante para intensificar a produtividade das culturas agrícolas. Aliando ao crescimento populacional progressivo, cada vez mais biomassa vegetal tem sido consumida para fins industriais e alimentícios, na pecuária e para humanos. Produzir mais alimentos sem aumentar a fronteira agrícola torna-se uma estratégia de grande interesse ambiental e econômico. Uma estratégia viável para contornar estes problemas é compreender os mecanismos regulatórios dos fitormônios no crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que estas moléculas são capazes de modular a fisiologia e metabolismo do vegetal causando interferências severas em aspectos como crescimento, produtividade e resistência a estresses abióticos e bióticos (Jiang & Asami, 2018).

A descoberta dos fitormônios promoveu grandes avanços na área de fisiologia, principalmente no entendimento do controle da diferenciação celular, o que permitiu o surgimento da cultura de células e tecidos isolados *in vitro*, e o uso de moléculas em plantas no campo para obtenção de efeitos desejáveis (Kende & Zeevaart, 1997). Dentre os fitormônios com efeitos positivos sobre o crescimento das plantas, pode-se citar a giberelina, a auxina, o brassinosteróide e citocininas, que juntos coordenam mecanismos refinados que promovem o crescimento de raiz, partes aéreas e reprodutivas das plantas (Taiz & Zeiger, 2013). As CKs formam um grupo de moléculas que têm apresentado muitos efeitos em processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo a dominância apical, a formação e a atividade dos meristemas apicais, o desenvolvimento floral, a germinação de sementes, quebra da dormência de gemas, sendo muitos desses processos estimulados pela divisão celular (Werner & Schmülling, 2009).

Os resultados do transcriptoma induzido pela superexpressão de NIK3, indicou que este RLK participa ativamente na regulação da produção e percepção de CKs bioativas e, portanto, tem uma participação ativa no desenvolvimento dos vegetais. Precedentes na literatura têm demonstrado a dupla funcionalidade de RLKs com função modeladora de vias independentes (Morillo, & Tax, 2006). O exemplo clássico dessa dupla funcionalidade em desenvolvimento e imunidade é BAK1, o qual possui função na sinalização e percepção do fitormônio BR sendo correceptor de BRI1 e ativação de PTI contra bactérias sendo correceptor de FLS2 e EFR, PRRs que percebem o peptídeo bacteriano flg22 e EF-TU, respectivamente (Morillo, & Tax, 2006).

Similarmente, é possível que NIK3 assuma funções distintas em vias de crescimento e desenvolvimento e também interfira na resposta imune em *Arabidopsis*.

Foi demonstrado que NIK3, também designado CK1 interage com proteínas da via de percepção do CLV3 para reprimir *WUS* e manter a homeostase de células tronco dos meristemas do caule, *WUS* induz a expressão de *CLV1* e *CLV3* que reprimem *WUS*. Assim, o ciclo de *feedback* *WUS-CLV* forma um mecanismo de autocorreção que mantém um número constante de células tronco em meristemas do caule (Brand et al., 2000). Além da regulação direta e indiretamente de *WUS* por diferentes genes (Willians & Fletcher, 2005), sua expressão pode ser induzida mediante um sinal de CK, e *WUS* reforçam o sinal de CK por meio de vários *loops* de *feedback* positivos. A aplicação de CK exógena ativou *WUS* independentemente da via de CLV, ao mesmo tempo que reprimiu *CLV1* (Lindsay et al., 2006). Assim CKs regula positivamente *WUS*, que por outro lado reprime ARRs tipo A, fatores que participam ativamente na repressão da resposta a CKs (Leibfried et al., 2005; Wybouw & Rybel, 2019), os quais foram induzidos por NIK3. Dessa forma, a sinalização de CKs e *WUS* são induzidas em um ciclo de *feedback* positivo, oposto ao mecanismo de sinalização *WUS-CLV1*. Isso reforça o papel de NIK3 na manutenção da homeostase de células dos meristemas do caule uma vez que já é descrita como um regulador da resposta a CLV, e aqui é descrita a função negativa de NIK3 na resposta a CKs. Os receptores de CKs AHKs regulados negativamente por NIK3 são fundamentais nesse ramo regulatório de *WUS* (Sablowski, 2019). Estas evidencias reforçam o papel de NIK3 na manutenção da homeostase de células tronco nos meristemas do caule, uma vez que CKs entre outras funções coordenam a manutenção da divisão de células tronco nos meristemas do caule, atuando como modulador positivo da expressão de *WUS*, que regula a expressão de *CLV3* e *CLV1*. Quando ativada, a via de CLAVATA mantém a homeostase da divisão de células tronco nos meristemas do caule e regula *WUS* por um mecanismo de *feedback* negativo.

Com relação a síntese de CK, a superexpressão de NIK3 não alterou a transcrição de genes relacionados diretamente com a biossíntese de CK, porém, a expressão de enzimas que promovem a inativação reversível de CKs por *O*-glicosilação foram induzidas por NIK3. As CKs são degradadas por citocinina oxidase/desidrogenases (CKXs), uma grande família de enzimas cada uma com suas propriedades e particularidades, nenhum gene dessa família de CKX teve alterações significativas em sua expressão induzida por NIK3.

Glicosilação induz numerosas alterações nas propriedades químicas e funcionais das moléculas que sofrem este tipo de alteração (Nagashima et al., 2018). Em se tratando de moléculas bioativas como os fitormônios, a glicosilação está diretamente relacionada com a homeostase hormonal. Este tipo de modificação altera propriedades como aumento em sua solubilidade e estabilidade química, perda de reatividade ou alterações na atividade biológica. A glicosilação de moléculas bioativas em plantas é coordenada por UDP-glicosiltransferases que catalisam a transferência do monossacarídeo, ativado por uridina-difosfato para a molécula aceptora (Nagashima et al., 2018). As UDP-glicosiltransferases UGT85A5 e UGT85A1 reconheceram a *trans*-zeatina e a *di*-hidrozeatina, que têm um grupo hidroxila disponível para glicosilação e formaram os *O*-glicosídeos. Estas duas UDP-glicosiltransferases foram induzidas pela superexpressão de NIK3, na linhagem NIK3-L1. A glicosilação e a deglicosilação da zeatina podem regular os níveis dessa molécula por meio do controle de sua saída e reentrada do citosol e sua percepção por proteínas do tipo AHK, as quais formam o principal grupo de proteínas sinalizadoras de CKs (Šmehilová et al., 2016). O perfil de CKs do mutante *ugt85a1-1* indicou uma significativa diminuição de *O*-glicosil-*trans*-zeatina indicando que esta CK é o principal alvo de glicosilação de UGT85A, o contrário foi observado quando *UGT85A1* foi superexpresso em *Arabidopsis* (Wang et al., 2013; Jin et al., 2013). Este fato reforça o maior acúmulo de *trans*-zeatina em *nik3-1*, uma vez que a superexpressão de NIK3 promoveu o aumento de expressão de UGT85A1.

UGT85A1 pode desativar CKs *in vivo* enquanto UGT73C5 mostrou maior atividade de glicosilação para brassinosteróides (Poppenberger et al., 2005). Além disso, UGT73C5 também se mostrou responsável pela desintoxicação da toxina fúngica *in vivo* (Poppenberger et al., 2003). É possível que UGT73C5 reconheça vários compostos endógenos e xenobióticos, incluindo citocininas, flavonóides, hidroxicumarinas e toxinas fúngicas. No entanto estas classes de moléculas só foram analisadas *in vitro*, o que pode refletir apenas na atividade catalítica para determinada característica estrutural comum entre estas moléculas (Hou et al., 2004). *UGT73C1*, que também foi regulado positivamente em NIK3 atua sobre a glicosilação de outras moléculas diferentes de CKs, sendo que sua atuação sobre CKs não foi comprovada (Gandia-Herrero et al., 2008).

As CKs são percebidas por meio de uma via de fosforilação e transmissão do grupo fosfato em várias etapas. São percebidas por proteínas receptoras do tipo histidina cinases, AHKs (*ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASES*), sendo que, em *Arabidopsis*, as três AHK2, AHK3 e

AHK4 funcionam como receptores de CKs (Xie et al., 2018; Wybouw & Rybel, 2019). Na percepção desse fitormônio, a ligação de CK nas AHKs induz a auto-fosforilação e um grupo fosfato é transferido para proteínas AHPs (*HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSFER PROTEINS*) (Yamada et al., 2001). Por sua vez, as AHPs transmitem o sinal de fosforilação aos reguladores da resposta nuclear ARRs (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS*), os quais se enquadram como fatores de transcrição e modulam a expressão de genes induzidos por CKs (Besnard et al., 2014; Wybouw & Rybel, 2019). NIK3 parece também modular a percepção de CK pelos seus receptores AHK, uma vez que AHK3 e AHK5 foram regulados negativamente em NIK3-L1, assim como AHP1 e AHP5. A regulação de resposta a CK é feita por um *feedback* negativo do sinal, ao atingir alvos nucleares a atividade de AHP1 é regulada no citoplasma. É provável que a regulação por NIK3 ocorra na membrana plasmática, uma vez que NIK3 também é expressa na membrana plasmática. Assim, é possível que NIK3 funcione com um regulador negativo da sinalização por citocinina, impedindo que as proteínas AHKs transmitam o sinal de fosforilação adiante, ou a percepção de CKs pelos seus receptores.

Existem duas classes de ARRs em Arabidopsis, ambos envolvidos na sinalização a CK, e em várias outras respostas fisiológicas e a outros fitormônios como auxina e ABA (Muller e Sheen, 2008, Wang et al., 2011). Os ARRs são subdivididos em ARRs do tipo A e ARRs do tipo B, ambos codificados por grandes famílias de genes. Caracteristicamente, ARRs tipo B agem como reguladores transcricionais positivos, já os reguladores do tipo A, estão envolvidos em mecanismos regulatórios de *feedback* negativo (Kieber et al., 2018). Quando fosforilados por AHPs, ARRs do tipo B tornam-se ativados e regulam a expressão de genes de resposta à CK. Entre ARRs tipo B, ARR1, ARR10 e ARR12 são os principais transmissores do sinal de CK do citoplasma para o núcleo, a perda de função combinada destes ARRs leva a uma forte insensibilidade à CK e uma acentuada redução do crescimento (Ishida et al., 2008). Assim, ARRs-B e ARRs-A regulam a resposta a CK de forma oposta, ARRs-B transmitem o sinal de CK do citoplasma para o núcleo e ARRs-A inibem a resposta por *feedback* negativo e também a transcrição de ARRs-B (Xie et al., 2018). Três ARRs-A tiveram sua expressão alterada mediante a superexpressão de NIK3, sendo eles ARR4, ARR8 e ARR15, ambos relacionados com a resposta negativa a CK. ARR4 e ARR8 foram regulados negativamente (Tabela 2), enquanto ARR15 foi regulado positivamente em NIK3-L1 (Tabela 3).

Apesar dos ARRs tipo A (ARR15) e B (ARR4, ARR8 e ARR10), reguladores negativos e positivos da resposta a CK, NIK3 regula predominantemente a atividade de ARRs que se

relacionam com a regulação negativa da resposta a uma CK específica (zeatina). Os diferentes ARRs em *Arabidopsis* são ativados por CKs e outros sinais, nesse caso, e a regulação de NIK3 pode estar relacionada apenas com uma CK específica. A indução de ARR 15 pode ser devido a outros fatores assim e não à resposta negativa a CK uma vez que sua indução se relaciona também com a sinalização a auxina e a expressão de ARR15 e comprovadamente regulada também por ARF10 um fator de resposta à auxina direcionado por miRNAs (Liu et al., 2016).

Uma grande proporção da resposta transcricional de CK também é promovida por fatores de resposta de citocinina (CRFs), pertencentes à família AP2 (APETALA2/Ethylene Response Factor - AP2/ERF) (Hallmark & Rashotte, 2019). Entretanto, nenhum gene desse grupo relacionado com a sinalização a CK foi diferencialmente expresso em NIK3-L1, indicando que NIK3 não participa na regulação deste ramo da resposta a CK, mediado pela degradação de CK.

Outro gene que teve um considerável aumento de transcritos em NIK3-L1 foi *KFB20*, pertencente ao grupo de genes que possuem *Kelch Domain F-Box* (KFBs) (Zhang et al., 2015). Este grupo de genes codificam enzimas que participam na regulação da síntese de glucosinolato e fenilpropanóides, duas moléculas precursoras de vários metabólitos secundários de grande importância para a fisiologia das plantas (Kim et al., 2020). Os genes *KFBs* são expressos diferentemente, e controlam os níveis de fenilalanina amônia liase (PAL), enzima chave na biossíntese dos fenilpropanóides, em resposta às mudanças ambientais e de desenvolvimento. A regulação dos níveis de PAL por proteínas KFBs é feita pela ubiquitinação e direcionamento para degradação via proteassomo. Esta família de ubiquitina ligases, alternativamente denominada KMD (*KISS ME DEADLY*), promove a degradação dos principais ativadores transcricionais da resposta da citocinina, os membros da família ARR tipo B, mais especificamente ARR1 e ARR12. Foi demonstrado que a superexpressão de *KFB20* reduz o crescimento em *Arabidopsis* (Kurepa et al., 2018). No entanto, alguns resultados indicam que este fenótipo se deve às interações da via fenilpropanóides com auxina e CK, e, nesse caso, a superexpressão de *KFB20* causa uma diminuição na sensibilidade à citocinina dependente de auxina (Kin et al., 2013).

Os transportadores de purinas (purina permeases) PUP1, PUP2 e PUP14, foram induzidos por NIK3. Com a capacidade também de transportar CKs, PUP1, PUP2 e PUP14 podem juntos transportar uma grande quantidade de CKs bioativas como zeatina, cinetina, benzil-adenina,

isopentenil-adenina (Cedzich et al., 2008; Zürcher et al., 2016; Durán-Medina, et al., 2017). No entanto, a percepção e sinalização de CK sofre maior interferência por PUP14, onde recentemente foi descrita sua participação na modulação do desenvolvimento de plantas (Tessi et al., 2021). PUP14 é um regulador negativo da resposta a CKs, em linhagens transformadas com *PUP14*, os níveis de expressão desse transportador foi inversamente proporcional à sinalização de CK. Assim como a perda da função em *pup14* intensificou a sinalização de CK acompanhada por morfogênese desordenada em embriões, raízes e meristema apical do caule (Zürcher, et al., 2016). Em seu mecanismo regulatório, PUP14 sequestra CKs da região apoplasmática e as transporta para o citoplasma, causando diminuição de CKs no apoplasto, impedindo assim que os receptores AHKs percebam as moléculas e se autofosforilem, impedindo que o sinal chegue ao núcleo celular (revisado em Durán-Medina et al., 2017).

Todos estes fatos citados acima colocam NIK3 como um modulador negativo da resposta a CK, podendo ter como alvo regulatório vários componentes da via de resposta a CK. O transcriptoma induzido por NIK3 parece estar mais relacionado com a resposta negativa a zeatina, regulando processos que inativam CKs bioativas por glicosilação, percepção e sinalização por AHKs e ARR. No entanto, para afirmar qual o ponto exato da resposta a CK que NIK3 modula é necessária uma maior investigação, visando a busca de parceiros de interação de NIK3, como AHKs que se relacionam com a sinalização a este grupo de moléculas.

NIK3 regula negativamente a via de percepção e resposta contra patógenos

É indiscutível a participação de PRR-RLK (*pattern recognition receptor, receptor-like kinase*) na percepção e ativação da resposta imune contra uma infinidade de micróbios e organismos capazes de causar danos em plantas. FLS2 representa o PRR mais estudado que tem função de percepção e ativação de uma resposta contra patógenos. Este receptor percebe o peptídeo bacteriano de 22 aminoácidos (flg22), e ativa a via de resposta contra bactérias que induz uma resposta do tipo PTI (*PAMP-triggered immunity*). Este tipo de resposta imune causa uma série de modificações no metabolismo celular e ativação de fatores de transcrição que em última análise ocasiona uma total reprogramação da expressão gênica da célula. Atuando de forma semelhante a FLS2, o receptor EFR (*EF-Tu RECEPTOR*) reconhece o fator de alongação bacteriano EF-TU, e também ativa a via de PTI. *FLG22* e *EFR* foram regulados negativamente em NIK3-L1 (Figura 10), (Tabela 4). Estes PRRs reconhecem estas moléculas conservadas em

bactérias como PAMPs e ativam um mecanismo de resistência de amplo espectro, que restringe o crescimento não só de bactérias, mas de uma ampla gama de microrganismos patogênicos.

Outros dois genes com similaridade estrutural e funcional mostraram-se reprimidos por NIK3 (Tabela 4), são eles *FRK1* (*FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1*), e *RRS1* (*RESISTANCE TO Ralstonia solanacearum*). Ambos codificam fatores de transcrição WRKY, (com um domínio de ligação ao DNA WRKY conservado) e um domínio receptor cinase LRR, respectivamente. O tratamento com flg22 induz a expressão de *FRK1*, importante modulador da resposta imune contra bactérias dependente de FLS2 uma vez que a expressão de *FRK1* não foi induzida no mutante *fls2* (Assai et al., 2002). Assim como *RRS1*, *RPM1* (*INTERACTING PROTEIN 4 - RIN4*), que também é regulado negativamente por NIK3 (Tabela 4), tem a capacidade de reconhecer proteínas Avr de *Pseudomonas syringae* e possui um domínio de ligação a nucleotídeos com papel central na atividade efetora (Boyes et al., 1998; Tornero et al., 2002). Como receptor multifuncional, RPM1 atua na interface patógeno-hospedeiro, é ativada por pelo menos cinco efetores (Avr) de *P. syringae*. (revisado em Withers & Dong, 2017; Sarris et al., 2015). De uma forma geral, estas três proteínas reconhecem sinais de PTI ou Avr bacterianos e são ativadas mediante fosforilação, intensificando os sinais de PTI ou induzindo ETI. FRK1 reprimida em NIK3-L1 (Tabela 4) e RRS1, mediante ativação, são direcionadas para o núcleo da célula e atuam na modulação de genes que possuem elementos W-box, em muitos casos caracterizados como componentes centrais sistema imunológico inato da planta, incluindo PTI, ETI, defesa basal e SAR (Eulgem & Somssich, 2007). Ativada mediante o reconhecimento de Avrs bacterianos, RPM1 se relaciona com a indução de HR e morte celular. Coletivamente estes dois genes R e FRK1 modulam a resposta imune contra bactérias em diferentes aspectos. No entanto, comportando como típicas proteínas R, RPM1 e RRS1, atuam majoritariamente na ativação de ETI.

Um dos passos seguintes da resposta imune após o reconhecimento de PAMPs e ativação de complexos receptores imunes é a amplificação do sinal por meio da ativação de MAPK, proteína cinase ativadas por mitógeno, seguido da regulação positiva dos genes de defesa (Peng et al., 2017). Em NIK3-L1, tanto FLS2, EFR e um gene MEKK (Tabela 4) (MAPK/ERK KINASE KINASE 4), (Tabela 4) foram regulados negativamente, assim como uma série de fatores de transcrição WRKY relacionados com a ativação de genes marcadores de resposta contra patógenos.

As proteínas NIKs se relacionam diretamente com a regulação da resposta imune contra bactérias (Ahmed et al., 2018, Machado et al., 2015). O modelo de ativação da resposta imune contra vírus por NIK1 tem sido descrito em detalhes, assim como a regulação da resposta imune contra bactérias mediada por NIK1 (Teixeira et al., 2019). Mediante a percepção de flg22 pelo complexo imune FLS2/BAK1, e por meios de estudos de genética reversa e direta foi demonstrado que NIK1 regula negativamente a resposta imune contra bactérias. (Li et al., 2019). Além de NIK1 regular a formação do complexo BAK1/FLS2 e inibir PTI, em *nik-1*, os genes envolvidos com a síntese, percepção e sinalização de ácido salicílico são regulados positivamente (Li et al., 2019; Machado et al., 2015). Evidências recentes demonstram que NIK3 pode estar envolvido na regulação da resposta imune (Ahmed et al., 2018). Entretanto, os resultados dessa investigação indicam que NIK3 desenvolve um papel diferente de NIK1 na modulação da resposta imune contra bactérias, regulando respostas principalmente do tipo ETI. Em PTI, a percepção do patógeno por PRR ativa cascatas MAPK, moléculas sinalizadoras, e aumenta síntese de fitormônios como o ácido salicílico e jasmonato. A família WRKY possuem fatores de transcrição envolvidos com indução da expressão de diferentes genes responsivos a estresses, incluindo a resposta transcricional de plantas a patógenos. O sítio de ligação ao DNA por estes TFs, o *W-box*, é enriquecido em promotores de genes responsivos a microrganismos patogênicos (Chen et al. 2019). Em NIK3-L1, *WRKY30*, *WRKY45*, *WRKY50* e *WRKY75* foram regulados negativamente (Tabela 4).

WRKY45 e *WRKY50* estão envolvidos na ativação de genes responsivos à infecção por micróbios, enquanto *WRKY45* medeia positivamente a resistência a doenças de amplo espectro, e inibe a adaptação a estresses abióticos (Qiu & Yu, 2009; Tao et al., 2011; Kanosfsky et al., 2021), *WRKY50* regula positivamente o gene *PRI*, relacionado à patogênese, e induzido mediante a presença de ácido salicílico (SA), uma molécula requerida para indução de SAR mediante à infecção microbiana (Hussain et al., 2018), *WRKY50* também liga ao promotor e induz a expressão de *WRKY30* (Hussain et al., 2018; Kanosfsky et al., 2021). *WRKY30* de arroz é induzido por patógenos fúngicos e ácido jasmônico, sendo considerado responsivo a patógenos (Peng et al., 2011). Em *Arabidopsis*, a superexpressão de *WRKY30* induziu a resistência ao Cucumber mosaic virus (CMV), sendo o fenótipo oposto observado no mutante *wrky30*. A resistência a CMV induzida por *WRKY30* parece se relacionar diretamente com a ativação de uma resposta dependente de BR, sendo que a expressão de *WRKY30* foi induzida após o tratamento com BR, e em experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), *WRKY30* foi identificado como alvo direto de BES1 (Zou et al., 2019). Com relação a *WRKY75*,

não há evidências diretas de que este TF esteja envolvido com a modulação da expressão de genes responsivos à infecção por microrganismos patogênicos, no entanto *WRKY75* é induzido por SA e H₂O₂ (Guo et al., 2017).

Em experimentos de infecção bacteriana por *Pst* DC 3000, houve um ligeiro aumento de crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) em *nik3-1*, porém para linhagem complementada *nik3NIK3-L1* e na linhagem *NIK3-L1*, não houve diferença significativa no número de UFCs quando comparado com Col-0. Estes resultados indicam maior suscetibilidade de *nik3-1* a *Pst* DC 3000. Apesar de *NIK3* regular negativamente a expressão de *FLS2* e *EFR*, por se tratar de receptores de membrana que percebem PAMPs bacterianos e transmitem um sinal antibacteriano, a superexpressão de *NIK3* não interferiu significativamente na sinalização de PTI contra *Pst* DC 3000 (Figura 11). Este resultado indica que *NIK3* pode estar envolvida na regulação da atividade de receptores e proteínas R em PTI e ETI respectivamente, outros ensaios de infectividade devem ser feitos com outras cepas bacterianas diferentes de *Pst* DC3000 para confirmar esta hipótese.

CONCLUSÃO

Os resultados desta investigação sugerem que a perda da função de NIK1 regula positivamente a expressão de genes associados à resposta imune, indicando um papel negativo do NIK1 na imunidade antibacteriana de plantas. Mediante a percepção da bacteriana (flg22) por FLS2, e formação do complexo imune FLS2/BAK1, NIK1 se une a este complexo, é fosforilada na treonina 474 de seu domínio intracelular e regula negativamente a resposta imune contra bactérias. Agindo de forma contrária ao seu papel positivo na defesa antiviral. Assim, NIK1 modula inversamente a imunidade antiviral e antibacteriana em plantas, sendo o mecanismo intermediário dessa via a fosforilação de RPL10. Fosforilada, RPL10 é translocada para o núcleo interage com LIMYB, que regula negativamente a expressão de genes ribossomais, ocasionando em última análise a diminuição global da síntese de proteínas na célula. NIK2 o parálogo de NIK1, atua de forma semelhante e redundante a NIK1, no entanto o protagonismo funcional fica condicionado a NIK1. NIK3 diverge quanto a estrutura e funcionalidade de NIK1 e NIK2, regulando outras vias do metabolismo e respostas moleculares em Arabidopsis.

A superexpressão de NIK3 reprimiu a expressão de genes de receptores, proteínas citoplasmáticas e fatores de transcrição que juntos percebem citocininas e coordenam a transmissão da resposta a este grupo de moléculas. Genes que codificam os principais receptores de CKs, fundamentais para que CLV1 e CLV3 atuem sobre a regulação da divisão de células tronco meristemáticas forma regulados negativamente, assim, NIK3 parece atuar como modulador da divisão de células tronco de duas formas distintas: dependente de CLAVATA, anteriormente já descrito, e na via de resposta a CKs como um regulador negativo.

NIK3 também reprimiu a expressão de genes da resposta imune relacionados com a ativação de PTI e ETI. A regulação negativa dos PRR-RLKs FLS22 e EFR parece não causar grandes interferências na via de PTI, no entanto NIK3 reprimiu também a expressão de genes R, que reconhecem Avrs bacterianos e ativam ETI. De mesmo modo, genes similares a MAPK foram também reprimidos, os quais são comprovadamente requeridos na ativação e intensificação de ETI e PTI. Fatores de transcrição WRKY relacionados com a resposta imune, também compõe o grupo de genes regulados negativamente por NIK3. Consequentemente, NIK3 pode ser classificada como uma cinase multifuncional atuando na regulação negativa de vias independentes relacionadas com o desenvolvimento e resposta imune em Arabidopsis. Estudos individuais envolvendo os genes que foram reprimidos ou induzidos por NIK3, devem ser

conduzidos afim de elucidar os mecanismos específicos pelos quais NIK3 atua como modulador da resposta de defesa e de desenvolvimento em *Arabidopsis*.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, H., Howton, T. C., Sun, Y., Weinberger, N., Belkhadir, Y., & Mukhtar, M. S. (2018). Network biology discovers pathogen contact points in host protein-protein interactomes. *Nat. Commun.* 9(1), 1-13.
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 31(2), 166-169.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., & Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature.* 415(6875), 977-983.
- Bent, A. (2006). *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Agrobacterium Protocols, Humana Press.* 87 - 104.
- Besnard, F., Rozier, F. & Vernoux, T. (2014). The AHP6 cytokinin signaling inhibitor mediates an auxin-cytokinin crosstalk that regulates the timing of organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant Signal. Behav.* 9, e28788.
- Boyes, D. C., Nam, J., & Dangl, J. L.** (1998). The *Arabidopsis thaliana* *RPM1* disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15849–15854.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M., Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science.* 289, 617–619.
- Callizaya Terceros, G., Resentini, F., Cucinotta, M., Manrique Urpi, S., Colombo, L., & Mendes, M. A. (2020). The Importance of Cytokinins during Reproductive Development in *Arabidopsis* and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 1-18.
- Carvalho, C. M., Santos, A. A., Pires, S. R., Rocha, C. S., Saraiva, D. I., Machado, J. P. B., Mattos, E. C., Fietto, L. G., & Fontes, E. P. (2008). Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathog.* 4(12), e1000247.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., & Frommer, W. B. (2008). Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol.* 148(4), 1857-1867.
- Chen, X., Li, C., Wang, H., & Guo, Z. (2019). WRKY transcription factors: evolution, binding, and action. *Phytopathol. Res.* 1, 13.
- Cheng, C. Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., & Town, C. D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J.* 89(4), 789-804.
- Cui, Y., Hu, C., Zhu, Y., Cheng, K., Li, X., Wei, Z., Xue, L., Lin, F., Shi, H., Yi, J., He, K., Li, J., Gou, X., & Hou, S. (2018). CIK receptor kinases determine cell fate specification during early anther development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 30(10), 2383-2401.

- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19–21.
- Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., & Marsch-Martínez, N. (2017). Cytokinins on the Move. *Front. Plant Sci.* 8, 146.
- Eulgem, T., & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 366-371
- Falcon, S., & Gentleman, R. (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics.* 23(2), 257-258.
- Fontes, E. P. B., Santos, A. A., Luz, D. F., Waclawovsky, A. J., & Chory, J. (2004). The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes Dev.* 18, 2545-2556.
- Gandia-Herrero, F., Lorenz, A., Larson, T., Graham, I. A., Bowles, D. J., Rylott, E. L., & Bruce, N. C. (2008). Detoxification of the explosive 2, 4, 6-trinitrotoluene in Arabidopsis: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases. *Plant J.* 56, 963–974.
- Grattapaglia, D., Vaillancourt, R., Shepherd, M., Thumma, B., Foley, W., Külheim, C., Potts, B. & Myburg, A. (2012). Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. *Tree Genet. Genomes.* 8, 463-508.
- Guo, P., Li, Z., Huang, P., Li, B., Fang, S., Chu, J., & Guo, H. (2017). A tripartite amplification loop involving the transcription factor WRKY75, salicylic acid, and reactive oxygen species accelerates leaf senescence. *Plant Cell.* 29(11), 2854-2870.
- Hallmark, H. T., & Rashotte, A. M. (2019). Review—Cytokinin Response Factors: Responding to more than cytokinin. *Plant Sci.* 289, 110251.
- Holt, R. A., & Jones, S. J. (2008). The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Res.* 18, 839–846.
- Hord, C. L., Chen C., Deyoung B. J., Clark S. E., & Ma H. (2006). The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of Arabidopsis early anther development. *Plant Cell.* 18, 1667-1680.
- Hou, B., Lim, E. K., Higgins, G. S., & Bowles, D. J. (2004). N-glucosylation of cytokinins by glucosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279(46), 47822-47832.
- Hu, C., Zhu, Y., Cui, Y., Cheng, K., Liang, W., Wei, Z., & Lv, M. (2018). A group of receptor kinases are essential for CLAVATA signalling to maintain stem cell homeostasis. *Nat. Plants.* 4(4), 205.
- Huang, X., Zhang, X., Gong, Z., Yang, S., & Shi, Y. (2017). ABI4 represses the expression of type-A ARR1s to inhibit seed germination in Arabidopsis. *Plant J.* 89(2), 354-365.

- Hussain, R. M., Sheikh, A. H., Haider, I., Quareshy, M., & Linthorst, H. J. (2018). Arabidopsis WRKY50 and TGA transcription factors synergistically activate expression of PR1. *Front. Plant Sci.* 9, 930.
- Hwang, I., Paudyal, D. P., Kim, S. K., & Cheong, H. (2007). Influence of the SMT2 knock-out on hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12(2), 157-164.
- Jackson, R. G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., & Bowles, D. J. (2002). Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J.* 32(4), 573-583.
- Jiang, K., & Asami, T. (2018). Chemical regulators of plant hormones and their applications in basic research and agriculture. *Biosci Biotechnol Biochem.* 82(8), 1265-1300.
- Jin, S. H., Ma, X. M., Kojima, M., Sakakibara, H., Wang, Y. W., & Hou, B. K. (2013). Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences trans-zeatin homeostasis and trans-zeatin responses likely through O-glucosylation. *Planta.* 237, 991-999.
- Jordá, L., Sopena-Torres, S., Escudero, V., Nuñez-Corcuera, B., Delgado-Cerezo, M., Torii, K. U., & Molina, A. (2016). A. ERECTA and BAK1 receptor like kinases interact to regulate immune responses in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 7, 1-13.
- Kanofsky, K., Rusche, J., Eilert, L., Machens, F., & Hehl, R. (2021). Unusual DNA-binding properties of the Arabidopsis thaliana WRKY50 transcription factor at target gene promoters. *Plant Cell Rep.* 40(1), 69-83.
- Kende, H., & Zeevaart, J. (1997). The five "Classical" plant hormones. *Plant cell.* 9(7), 1197.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development.* 145.
- Kim, H. J., Chiang, Y. H., Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2013). SCFKMD controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10(24):10028-33.
- Kurepa, J., Shull, T. E., Karunadasa, S. S., & Smalle, J. A. (2018). Modulation of auxin and cytokinin responses by early steps of the phenylpropanoid pathway. *BMC Plant Biol.* 18(1), 278.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 9(4), 357.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10 (3), R25.
- Leibfried, A., To, J. P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J. & Lohmann, J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature.* 438, 1172-1175.

- Li, B., Ferreira, M. A., Huang, M., Camargos, L. F., Yu, X., Teixeira, R. M., Carpinetti, P. A., Mendes, G. C., Gouveia-Mageste, B. C. Liu, C., Pontes, C. S. L., Brustolini, O. J. B., Martins, L. G. C., Melo, B. P., Duarte, C. E. M., Shan, L. He, P., & Fontes, E. P. B. (2019). The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. *Nat. Commun.* 10, 1-14.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2013). The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 41(10), e108-e108.
- Lindsay, D. L., Sawhney, V. K., Bonham-Smith, P. C. (2006). Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 and WUSCHEL expression temporally coincide with altered floral development in Arabidopsis. *Plant Sci.* 170, 1111–1117.
- Liu, Z., Li, J., Wang, L., Li, Q., Lu, Q., Yu, Y., Li, S., Bai, M., Hu, Y & Xiang, F. (2016). Repression of callus initiation by the mi RNA-directed interaction of auxin–cytokinin in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 87(4), 391-402.
- Machado, J. P., Brustolini, O. J., Mendes, G. C., Santos, A. A., & Fontes, E. P. (2015). NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? *Bio Essays.* 37(11), 1236-1242.
- Mariano, A. C., Andrade, M. O., Santos, A. A., Carolino, S. M. B., Oliveira, M. L., Baracat-Pereira, M. C., Brommonshenkel, S. H., & Fontes, E. P. B. (2004). Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology.* 318, 24-31.
- Minami, A., Takahashi, K., Inoue, S. I., Tada, Y., & Kinoshita, T. (2019). Brassinosteroid induces phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase during hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 60(5), 935-944.
- Mizuno S., Osakabe Y., Maruyama K., Ito T., Osakabe K., Sato T., Shinozaki K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50, 751-766.
- Morillo, S. A., & Tax, F. E. (2006). Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(5), 460-469.
- Muller, B. & Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature.* 453 (2008), 1094-1097.
- Müssig, C., Shin, G. H., & Altmann, T. (2003). Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133(3), 1261-1271.
- Nagashima, Y., von Schaewen, A., & Koiwa, H. (2018). Function of N-glycosylation in plants. *Plant Sci.* 274, 70-79.
- Peng, X., Hu, Y., Tang, X., Zhou, P., Deng, X., Wang, H., & Guo, Z. (2012). Constitutive expression of rice WRKY30 gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta.* 236(5), 1485-1498.

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., & Adam, G. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 47905–47914

Qiu, Y., & Yu, D. (2009). Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. *Environ. Exp. Bot.* 65, 35–47.

Ramirez-Prado, J. S., Abulfaraj, A. A., Rayapuram, N., Benhamed, M., & Hirt, H. (2018). Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. *Trends Plant Sci.* 23(9), 833-844.

Robinson, M. D., & Oshlack, A. A. (2010). scaling normalization method for diferencial expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11, R25

Sablowski, R. (2009). Cytokinin and WUSCHEL tie the knot around plant stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(38), 16016-16017.

Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Oka, A. (2001). *ARR1*, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science.* 294(5546), 1519-1521.

Salome, P. A., To, J. P., Kieber, J. J., & McClung, C.R. (2006). Arabidopsis response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell.* 18. 55-69.

Santos, A. A., Carvalho, C. M., Florentino, L. H., Ramos, H. J. O., & Fontes, E. P. B. (2009). Conserved threonine residues within the A-Loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. *PLoS ONE.* 4, e5781.

Santos, A. A., Lopes, K. V. G., Apfata, J. A. C., & Fontes, E. P. B. (2010). NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling. *J. Exp. Bot.* 61, 38-39.

Sarris, P. F., Duxbury, Z., Huh, S. U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S. B., Wirthmueller, L., Menke, L. H., Sohn, K. H., & Jones, J. D. (2015). A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell*, 161(5), 1089-1100.

Sheth, B. P., & Thaker, V. S. (2014). Plant systems biology: insights, advances and challenges. *Planta.* 240(1), 33-54.

Shimizu, N., Ishida, T., Yamada, M., Shigenobu, S., Tabata, R., Kinoshita, A., Yamaguchi, K., Hasebe, M., Mitsumasu, & K., Sawa, S. (2015). BAM 1 and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 constitute a signaling pathway and modulate CLE peptide-triggered growth inhibition in Arabidopsis root. *New Phytol.* 208, 1104–1113.

Smakowska-Luzan, E., Mott, G. A., Parys, K., Stegmann, M., Howton, T. C., Layeghifard, M., Neuhold, J., Lehner, A., Kong, J., Grünwald, K., Weinberger, K., Satbhai, S. B., Mayer, D., Busch, W., Madalinski, M., Stolt-Bergner, P., Provart, N. J., Mukhtar, M. S., Zipfel, C., Desveaux, D., Guttman, D. S., & Belkadir, Y. (2018). An extracellular network of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinases. *Nature.* 553(7688), 342-346.

- Šmečilová, M., Dobrušková, J., Novák, O., Takáč, T., & Galuszka, P. (2016). Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Front. Plant Sci.* 7, 1264.
- Sun, Y. G., Wang, B., Jin, S. H., Qu, X. X., Li, Y. J., & Hou, B. K. (2013). Ectopic expression of Arabidopsis glycosyltransferase UGT85A5 enhances salt stress tolerance in tobacco. *PLoS ONE*. 8(3), e59924.
- Taiz, L., Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.
- Tao, Z., Kou, Y., Liu, H., Li, X., Xiao, J., & Wang, S. (2011). Os WRKY45 alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *J. Exp. Bot.* 62, 4863–4874.
- Teixeira, R. M., Ferreira, M. A., Raimundo, G. A., Loriato, V. A., Reis, P. A., & Fontes, E. P. (2019). Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. *Mol. Plant Pathol.* 20(9), 1196-1202.
- Tessi, T. M., Brumm, S., Winklbauer, E., Schumacher, B., Pettinari, G., Lescano, I., Gonzalez, C. A., Wanke, D., Maurino, V. G., Harter, K., & Desimone, M. (2021). Arabidopsis AZG2 transports cytokinins in vivo and regulates lateral root emergence. *New Phytol.* 229, 979–993
- Tornero, P., Chao, R. A., Luthin, W. N., Goff, S. A., & Dangl, J. L. (2002). Large-scale structure–function analysis of the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *Plant Cell*. 14(2), 435-450.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y. Q., & Wu, Y. (2011). Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of Arabidopsis by downregulating ABI5 expression. *Plant J.* 68(2), 249-261.
- Ward Jr, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. A. S. A.* 58 (301), 236-244.
- Werner, T., & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(5), 527-538.
- Williams, L. & Fletcher, J. C. (2005). Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 582–586.
- Withers, J., & Dong, X. (2017). Post-translational regulation of plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 124-132.
- Wybouw, B., & De Rybel, B. (2019). Cytokinin—a developing story. *Trends Plant Sci.* 24(2), 177-185.
- Xie, M., Chen, H., Huang, L., O’Neil, R. C., Shokhirev, M. N., & Ecker, J. R. (2018). A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nat. Commun.* 9, 1604.

Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* 42.

Zhang, X., Gou, M., Guo, C., Yang, H., & Liu, C. J. (2015). Down-regulation of Kelch domain-containing F-box protein in Arabidopsis enhances the production of (poly) phenols and tolerance to ultraviolet radiation. *Plant Physiol.* 167(2), 337-350.

Zorzatto, C., Machado, J. P. B., Lopes, K. V. G., Nascimento, K. J. T., Pereira, W. A., Brustolini, O. J. B., Reis, P. A. B., Calil, I. P., Deguchi, M., Sachetto-Martins, G., Gouveia, B. C., Lorigato, V. A. P., Silva, M. A. C., Silva, F. F., Santos, A. A., Chory, J., & Fontes, E. P. B. (2015). NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature.* 520, 679–682

Zou, L., Yang, F., Ma, Y., Wu, Q., Yi, K., & Zhang, D. (2019). Transcription factor WRKY30 mediates resistance to Cucumber mosaic virus in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 517(1), 118-124.

Zürcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., & Müller, B. (2016). Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science.* 353(6303), 1027–1030.