

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Decifrando a conexão entre o metabolismo de aminoácidos e a interação
planta-patógeno: papel do WRKY45**

Karla Gobbi Pimentel
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

KARLA GOBBI PIMENTEL

**Decifrando a conexão entre o metabolismo de aminoácidos e a interação
planta-patógeno: papel do WRKY45**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Wagner Luiz Araujo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

P644d
2025

Pimentel, Karla Gobbi, 1997-

Decifrando a conexão entre o metabolismo de aminoácidos e a interação planta-patógeno: papel do WRKY45 / Karla Gobbi Pimentel. – Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (50 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 2025.

Referências bibliográficas: f. 42-47.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.636>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Relação planta-patógeno. 2. *Arabidopsis thaliana*. 3. *Pseudomonas syringae*. 4. Hormônios vegetais. 5. Ácido salicílico. 6. Aminoácidos. 7. Regulação de expressão gênica. 8. Proteínas. 9. Plantas - Resistência a doenças e pragas. I. Araújo, Wagner Luiz, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 571.92

KARLA GOBBI PIMENTEL

**Decifrando a conexão entre o metabolismo de aminoácidos e a interação
planta-patógeno: papel do WRKY45**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Karla Gobbi Pimentel
Autora

Wagner Luiz Araujo
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 03/10/2025 às 14:52:57 e pelo orientador em 03/10/2025 às 15:02:52. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **NMQQ.AWYF.SPYS** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e à Nossa Senhora por todas as orações ouvidas e por sempre iluminarem minha vida. Sou imensamente grata aos meus amados pais, Rosa e Adauto, que, apesar de não terem tido as mesmas oportunidades que eu – minha mãe tendo estudado até a oitava série e meu pai não concluído o ensino fundamental –, lutaram, incansavelmente, com trabalho árduo para que hoje eu pudesse alcançar o sonho de me tornar mestre.

Ao meu irmão Rodrigo, que, do céu, cuida de mim e atende às minhas orações, devo minha proteção e força. Sei que, sem sua presença, ainda que espiritualmente, eu não seria nada. Agradeço também à irmã que a vida me deu, minha prima Lolo, por estar sempre ao meu lado.

Gratidão ao meu orientador, Wagner, pela oportunidade, orientação e liberdade concedidas para o desenvolvimento deste trabalho. À Dra. Jéssica Barros, que, desde a graduação, tem sido um exemplo e inspiração para que eu seguisse o caminho da pesquisa. Ao Dr. João Antônio Siqueira, pelos sábios conselhos, e à Dra. Marcelle Silva, por sua disposição em ajudar e pelo suporte essencial nas análises moleculares. À Dra. Auxiliadora Martins, pela competência e dedicação com que me auxiliou nas análises metabólicas.

Agradeço também ao Sr. David Medeiros, pela amizade e pela assistência nas análises estatísticas, assim como a todos os amigos e colegas de laboratório, que sempre estiveram ao meu lado, auxiliando-me tanto nas análises quanto nos desafios científicos e, em especial, nos momentos em que a ansiedade falava mais alto.

Agradeço, por fim, ao Sr. Nikolas Ferreira, pela disponibilidade, prestatividade e pelos ensinamentos de fitopatologia, bem como pelo acesso à bactéria. Sem ele, este trabalho não teria saído do papel. E ao professor Jorge Luiz Badel, por toda colaboração.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

PIMENTEL, Karla Gobbi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Decifrando a conexão entre o metabolismo de aminoácidos e a interação planta-patógeno: papel do WRKY45.** Orientador: Wagner Luiz Araujo.

Fatores ambientais, como variações no pH e na disponibilidade de nutrientes, podem favorecer a proliferação de patógenos, como *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, um modelo amplamente utilizado no estudo das interações planta-patógeno em *Arabidopsis thaliana*. A defesa vegetal contra infecções ocorre por meio de dois mecanismos principais: a imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (PTI) e a imunidade mediada por efetores (ETI), ambas reguladas por fatores de transcrição (FTs), incluindo a família WRKY. Dentre esses reguladores, o FT WRKY45 tem sido associado à regulação de respostas imunes em plantas, modulando a expressão de NPR1 e a biossíntese do ácido salicílico (AS), um hormônio essencial para a resistência sistêmica adquirida (SAR). Além de seu papel na defesa, WRKY45 também influencia a homeostase de aminoácidos, impactando o metabolismo energético e a sinalização à estresses. Em experimentos com mutantes T-DNA e plantas superexpressando WRKY45 (35S-WRKY45), observou-se que os genótipos transgênicos foram mais eficazes na contenção da infecção por *P. syringae*, possivelmente devido a um aumento na mobilização de reservas energéticas e na regulação do metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Tanto a infecção por *P. syringae* quanto a aplicação exógena de AS desencadearam alterações metabólicas significativas, incluindo variações nos níveis de amido e açúcares solúveis, sugerindo estratégias energéticas distintas entre os genótipos ora analisados. Com efeito, os mutantes 35S-WRKY45 apresentaram uma alocação energética mais eficiente para defesa, suprimindo o crescimento bacteriano sem, no entanto, comprometer significativamente o desenvolvimento. Ademais, WRKY45 está envolvido na regulação da senescência foliar e na mobilização de nutrientes, contribuindo para a resposta imune das plantas e reforçando seu papel central na interação planta-patógeno.

Palavras-chave: ácido salicílico ; WRKY ; NPR1 ; aminoácidos ; SAR

ABSTRACT

PIMENTEL, Karla Gobbi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Deciphering the connection between amino acid metabolism and plant-pathogen interaction: role of WRKY45.** Adviser: Wagner Luiz Araujo.

Environmental factors, such as variations in pH and nutrient availability, can favor the proliferation of pathogens like *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, a widely used model in the study of plant-pathogen interactions in *Arabidopsis thaliana*. Plant defense against infections occurs through two main mechanisms: pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI), both regulated by transcription factors (TFs), including the WRKY family. Among these regulators, the WRKY45 TF has been associated with the regulation of immune responses in plants, modulating the expression of NPR1 and the biosynthesis of salicylic acid (SA), a key hormone for systemic acquired resistance (SAR). In addition to its role in defense, WRKY45 also influences amino acid homeostasis, impacting energy metabolism and stress signaling. In experiments with T-DNA mutants and WRKY45-overexpressing plants (35S-WRKY45), transgenic genotypes were more effective in containing *P. syringae* infection, possibly due to an increase in the mobilization of energy reserves and the regulation of carbohydrate and amino acid metabolism. Both *P. syringae* infection and exogenous SA application triggered significant metabolic alterations, including variations in starch and soluble sugar levels, suggesting distinct energy strategies among the analyzed genotypes. Indeed, 35S-WRKY45 mutants exhibited a more efficient energy allocation for defense, suppressing bacterial growth without significantly compromising development. Furthermore, WRKY45 is involved in the regulation of leaf senescence and nutrient mobilization, contributing to plant immune response and reinforcing its central role in plant-pathogen interactions.

Keywords: salicylic acid; WRKY; NPR1; amino acids; SAR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Esquema Z adaptado representando a resposta imune em plantas. A resposta imune vegetal é dividida em PTI (Imunidade Ativada por PAMPs) e ETI (Imunidade Ativada por Efetores). Durante a PTI, ocorre a ativação de PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões), desencadeando uma resposta imune basal. Durante a ETI, a regulação pode envolver fatores como WRKY45, que ativa NPR1, intensificando a resposta imune. Ao final do processo, proteínas relacionadas à patogênese (PR) são ativadas, possivelmente com a participação de aminoácidos específicos, agindo que atuam como sinalizadores ou precursores metabólicos. A progressão da resposta imune é apresentada à esquerda. 14
- Figura 2:** Expressão do gene WRKY45 nos genótipos *Col-0*; *wrky45*, *35s::WRKY45-1* e *35s::WRKY45-4*. Os valores representam a média de três replicatas biológicas, normalizados em relação ao genótipo *Col-0*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 15
- Figura 3:** Modelo visual do procedimento de diluição seriada e plaqueamento. 17
- Figura 4:** Expressão relativa do gene WRKY45 no genótipo *Arabidopsis thaliana Col-0* em resposta à inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, avaliada em 24 e 48 horas após a inoculação. Os valores representam a média de três replicatas biológicas, normalizadas em relação ao controle não inoculado. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre tratamento e controle, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$). 19
- Figura 5:** Correlação da expressão de genes relacionados à biossíntese de ácido salicílico (AS), sinalização e catabolismo de aminoácidos *Arabidopsis thaliana*. A) Lista de genes selecionados e seus respectivos identificadores TAIR. Genes destacados em amarelo apresentaram correlação significativa de expressão com WRKY45. B) Expressão relativa do WRKY45 após infecção com *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. C-G) Expressão relativa (\log_2FC) dos genes em relação a expressão de WRKY45 em condição controle (MOCK) e após desafio com *Pseudomonas syringae* DC3000 (10^6 UFC/mL) em diferentes tempos (2h, 6h e 24h). As escalas de cores variam de azul (down-regulation) a vermelho (up-regulation). 20
- Figura 6:** Efeito da aplicação de ácido salicílico (AS) no crescimento e parâmetros fisiológicos. Os genótipos *Col-0*, *wrky45*, *35s::WRKY45-1* e *35s::WRKY45-4* foram analisados no dia 0 e 3 após a aplicação exógena de AS. (A) Fotografias imediatamente após a aplicação de água (controle); (B) Fotografias imediatamente após a aplicação de $10 \mu\text{M}$ de AS; (C) Fotografias do grupo controle após 3 dias; (D) Fotografias dos genótipos 3 dias após a aplicação de $10 \mu\text{M}$ de AS; (E) Eficiência máxima quântica do PSII (F_v/F_m). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento ($p < 0,05$; teste t). 22
- Figura 7:** Teores de pigmentos fotossintéticos em *Arabidopsis thaliana* 24 e 48 horas após a aplicação de ácido salicílico ($10 \mu\text{M}$). Foram quantificados os teores de A) clorofila a, B) clorofila b e C) carotenoides. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e tempos avaliados, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$). 23
- Figura 8:** Efeito da aplicação de ácido salicílico (AS, $10 \mu\text{M}$) nos teores de carboidratos em *Arabidopsis thaliana* dos genótipos *Col-0*, *wrky45*, *35s::WRKY45-1* e *35s::WRKY45-4*, avaliados após 24 e 48 horas. A) Concentração de amido (μmol de glicose Eq. g^{-1} MF). B) Concentração de sacarose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). C) Concentração de glicose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). D) Concentração de frutose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). Os gráficos à esquerda da linha pontilhada correspondem ao grupo controle, enquanto os gráficos à direita correspondem ao tratamento (aplicação de AS). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente

significativas entre os genótipos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo tempo de avaliação, determinada pelo teste t ($p < 0,05$).26

Figura 9: Variação nos níveis de metabólitos primários: malato (A), fumarato (B), compostos fenólicos (C). Os gráficos a esquerda do pontilhado correspondem ao controle e os gráficos a esquerda correspondem ao tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).26

Figura 10: Efeito da aplicação de ácido salicílico (AS, 10 μM) sobre o acúmulo de proteínas totais, aminoácidos e prolina nos genótipos de *Arabidopsis thaliana* Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1 e 35S::WRKY45-4 após 24 e 48 horas. A) Conteúdo de proteínas totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). B) Conteúdo total de aminoácidos livres ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). C) Conteúdo de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). Os gráficos à esquerda representam o grupo controle, enquanto os da direita correspondem ao tratamento com AS. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre genótipos no mesmo tempo, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).28

Figura 11: Comparação do crescimento bacteriano entre genótipos Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1 e 35S::WRKY45-4, nos tempos de 0h, 24h e 48h. O eixo vertical representa o crescimento bacteriano em uma escala logarítmica (\log_{10} UFC/ cm^3), enquanto o eixo horizontal indica o tempo em horas após a inoculação (0h, 24h, 48h). Dados significativos foram dados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) - Os testes estatísticos podem ser vistos na tabela suplementar 1.29

Figura 12: Impacto da inoculação de DC3000 no crescimento e nos parâmetros fisiológicos dos genótipos Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1 e 35S::WRKY45-4 após 24 e 48 horas. (A) Imagens registradas imediatamente após a aplicação de água (MgCl_2 mM). (B) Imagens registradas imediatamente após a Infecção bacteriana. (C) Fotografias dos genótipos três dias após a aplicação do controle. (D) Fotografias dos genótipos três dias após a Infecção bacteriana. (E) Eficiência máxima quântica do fotossistema II (Fv/Fm). Barras identificadas por letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).30

Figura 13: Teores de pigmentos fotossintéticos em *Arabidopsis thaliana* 24 e 48 horas após a aplicação de ácido salicílico (10 μM). Foram quantificados os teores de A) clorofila a, B) clorofila b e C) carotenoides. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e tempos avaliados, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).31

Figura 14: Impacto da inoculação de DC3000 nos parâmetros fisiológicos dos genótipos Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1 e 35S::WRKY45-4 após 24 e 48 horas (A) Concentração de amido. (B) Concentração de sacarose. (C) Concentração de glicose. (D) Concentração de frutose. Os gráficos posicionados à esquerda da linha pontilhada representam os resultados do grupo controle (aplicação de água), enquanto aqueles à direita correspondem ao grupo inoculado. Barras identificadas por letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).33

Figura 15: Variação nos níveis de metabólitos primários: malato (A), fumarato (B), compostos fenólicos (C). Os gráficos a esquerda do pontilhado correspondem ao controle e os gráficos a

esquerda correspondem ao tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$)..... 34

Figura 16: Níveis de transcritos de genes relacionados às vias de catabolismo de aminoácidos e à resposta imune em *Arabidopsis thaliana* (Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1, 35S::WRKY45-4) avaliados 24 e 48 horas após a inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Foram analisados os genes ICS1 (*Isocorismate Synthase 1*), EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*), NPR1 (*Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes 1*), LKR-SDH (*Lysine-Ketoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase*) e IVDH (*Isovaleryl-CoA Dehydrogenase*). Os dados foram normalizados em relação à média de Col-0 no controle de cada tempo experimental e ao gene de referência ACTIN. Os valores apresentados correspondem à média de três replicatas biológicas e estão expressos em escala \log_{10} 36

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
METODOLOGIA	14
<i>Análises in silico</i>	14
Material vegetal e condições experimentais	14
Tratamento com ácido salicílico	15
Crescimento e inoculação de <i>Pseudomonas. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	16
Quantificação da população de <i>P. syringae</i> DC3000 em folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
Análises bioquímicas	18
Desenho Experimental E Análise Estatística	18
RESULTADOS	18
<i>Análises in silico</i>	18
A superexpressão deWRKY45 suprime o crescimento bacteriano:	29
Inoculação bacteriana afeta a expressão gênica	35
DISCUSSÃO	36
Metabolitos primários como marcadores de defesa vegetal	36
WRKY45 é capaz de suprimir o crescimento bacteriano	39
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
MATERIAL SUPLEMENTAR	48

INTRODUÇÃO

As respostas imunes PTI e ETI levam à reprogramação transcricional de diversos genes, incluindo aqueles que codificam fatores de transcrição (FTs), que potencialmente regulam ambas as respostas imunes (Pombo et al., 2017; Mine et al., 2018). Os FTs coordenam o crescimento e desenvolvimento, bem como a sinalização de defesa das plantas frente a estímulos bióticos e abióticos (Joshi et al., 2017). Diferentes famílias de FTs, como WRKY, MYB, NAC e bHLH estão envolvidas na regulação das respostas a estresses biótico e abiótico (Jiang et al., 2017; Meng e Sui, 2019; Gullì et al., 2022). Neste contexto, os FTs WRKY estão entre os principais reguladores transcricionais em plantas (Bakshi e Oelmüller, 2014). Em *A. thaliana*, a família WRKY desempenha papel fundamental na sinalização de estresses bióticos e abióticos (Wani et al., 2021). As proteínas WRKY são FTs específicos de plantas que contêm um domínio WRKY conservado (WRKYGQK) e um motivo de dedo de zinco C₂H₂ ou C₂HC (Ramos et al., 2023), que permitem a ligação ao DNA e a regulação da transcrição de genes-alvo, podendo atuar como reguladores positivos ou negativos da defesa vegetal (Chi et al., 2013).

Em arroz, observou-se que WRKY45 desempenha um papel central na regulação das respostas imunes e no controle do sistema ubiquitina-proteassoma, prevenindo a ativação desnecessária das defesas na ausência de infecção (Goto et al., 2015). De modo interessante, a superexpressão do FT WRKY45 parece induzir a degradação massiva de BCAA e lisina (Barros et al., 2022). Durante situações de estresses bióticos, a homeostase dos aminoácidos é alterada, sendo relatado um aumento nos níveis de BCAA e aminoácidos aromáticos em folhas de *A. thaliana* inoculadas com *P. syringae*, ao passo que as quantidades de Asp e dos precursores de Lys diminuem (Zeier, 2013). Foi relatado também que a redução na expressão de TaBCAT1, aminotransferase associada ao catabolismo de BCAA, promove uma resposta de defesa ao patógeno *Puccinia striiformis*, associada ao acúmulo de AS (Corredor-Moreno et al., 2021).

A biossíntese e a degradação de aminoácidos variam significativamente ao longo do ciclo de vida das plantas (Angelovici et al., 2010). Durante a germinação, na ausência de luz, as proteínas armazenadas nas sementes são degradadas para fornecer os aminoácidos necessários à síntese proteica, permitindo o crescimento inicial da plântula (Galili et al., 2014; Wang et al., 2018). Já em células vegetais em crescimento, que realizam fotossíntese, a biossíntese de

aminoácidos é ajustada para fornecer os substratos necessários à síntese proteica ativa (Häusler, Ludewig e Krueger, 2014). Já em condições de depleção energética ou senescência, proteínas são degradadas e os aminoácidos resultantes são oxidados para fornecer energia para órgãos específicos (Araújo et al., 2011).

O controle preciso dos níveis de aminoácidos é essencial para regular tanto a síntese quanto o catabolismo de proteínas, além de atuar na produção de energia (Araújo et al., 2011). Vias metabólicas alternativas podem fornecer substratos para a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Ishizaki et al., 2006), otimizando a produção de ATP. Cabe registrar também que o catabolismo de aminoácidos promove a transferência de elétrons para o sistema flavoproteína/transferência ubiquinona oxirredutase (EFT/EFTQO), um processo crucial para a manutenção do metabolismo energético sob estresse (Ishizaki et al., 2005; 2006; Araújo et al., 2010).

Ressalta-se que biossíntese de AS está intrinsecamente ligada ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos aromáticos. Cumpre mencionar que o Corismato, precursor do AS, é um intermediário da via do ácido chiquímico, que está associada ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano (Herbert; 1981; Tzin *et al.*, 2009), além de estar associado à regulação da auxina e da melatonina (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2023). A via do ácido chiquímico compreende sete etapas, iniciando-se com a condensação do fosfoenolpiruvato e do D-eritrose-4-fosfato, provenientes da glicólise e da via das pentoses fosfato, respectivamente (Herbert; 1981; Tzin *et al.*, 2009). Com efeito, os carbonos dos BCAA valina e leucina são derivados do piruvato resultante da glicólise, prontamente disponível e abundante, ao passo que os carbonos de isoleucina são derivados da relativamente rara treonina, refletindo, novamente, a razão conservada de abundância em proteínas (Neinast, Murashige e Arany, 2019). Tomados em conjunto, essas informações revelam a íntima associação entre o catabolismo de BCAA, o metabolismo energético e a sinalização hormonal em situações de estresse.

O AS é um regulador-chave da resistência local e sistêmica em plantas (Lawton, 1995). Estudos genéticos em mutantes tolerantes a AS identificaram Nonexpressor de Pathogenesis-Related Genes 1 (NPR1) como um coativador transcricional indispensável para a expressão de genes PR e a resistência a doenças de amplo espectro em *A. thaliana* (Cao et al., 1997). A proteína NPR1 regula a SAR (Delaney, Friedrich e Ryals, 1995; Zavaliev e Dong, 2024), sendo ativada por modificações redox em resposta ao aumento dos níveis de AS intracelular após

infecção ou aplicação exógena do hormônio (Zhao et al., 2024).

O nível endógeno de AS nas respostas de defesa vegetal é amplamente dependente da intensidade da resposta de hipersensibilidade (HR) induzida pelo patógeno (Mou, Fan e Dong, 2003). Registre-se, também, que a SAR pode até ser transmitida à geração subsequente através da regulação epigenética (Fu e Dong, 2013). Tal modulação acontece através da formação de ROS, como H₂O₂, por meio de oxidases presentes na membrana plasmática e peroxidases ativadas na parede celular durante estresses bióticos (Torres, Dangl e Jones, 2002).

Destaca-se que, cerca de 137 patógenos documentados são responsáveis por reduções significativas na produção agrícola global (Savary et al., 2019). Atividades antropogênicas que alteram o pH, a disponibilidade de nutrientes e as condições climáticas impactam diretamente no ecossistema da rizosfera (Tan et al., 2020), podendo favorecer a proliferação de fitopatógenos (Li et al., 2023).

Dentre as espécies patogênicas, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 destaca-se como um importante modelo de estudo das interações planta-patógeno, devido à sua capacidade de causar doenças na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Yao et al., 2013; Xin e He, 2013). Embora *P. syringae* DC3000 seja considerada uma epífita fraco, trata-se de um patógeno altamente agressivo, capaz de penetrar tecidos hospedeiros e causar sintomas mesmo em pequenas populações (Boureau et al., 2002). Esse microrganismo é amplamente utilizado para a compreensão dos mecanismos de invasão bacteriana nos tecidos vegetais (Xin e He, 2013). A entrada de bactérias patogênicas no apoplasto ocorre por meio da liberação de efetores, moléculas que inibem as defesas da planta e favorecem a colonização (Li et al. 2014).

Segundo o modelo zig-zag de interação planta-patógeno proposto por Jones e Dangl (2006), a defesa das plantas contra patógenos ocorre em duas camadas principais. A primeira, denominada imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (PTI), ocorre quando receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) detectam moléculas conservadas dos patógenos (PAMPs), ativando respostas imunes iniciais, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zipfel e Felix, 2005; Li et al., 2023a).

Embora a PTI seja eficaz contra a maioria das bactérias patogênicas, suas respostas de defesa são tipicamente transitórias. Em contrapartida, muitos patógenos liberam proteínas

efetoras que suprimem o PTI, permitindo a infecção (Schwessinger e Ronald, 2012). Como resposta adaptativa, as plantas desenvolveram um segundo nível de defesa, a imunidade desencadeada por efetores (ETI), mediada por proteínas codificadas por genes de resistência (R), que reconhecem esses efetores e ativam uma resposta imune mais rápida e intensa. Caso os patógenos sejam capazes de suprimir a ETI, a planta torna-se suscetível à infecção, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (Jones e Dangl 2006).

O modelo adaptado proposto (Figura 1) sugere que o FT WRKY45 module a expressão de NPR1, desencadeando uma resposta imune mais eficaz, associada à regulação da homeostase de aminoácidos. Regulação positiva dos membros WRKY75, WRKY8, WRKY48, WRKY28 e WRKY46, sobre a enzima isocorismato sintase 1 (ICS1), envolvida na biosíntese do ácido salicílico (AS), já foi relatada (Van Verk, Bol e Linthorst, 2011; Gao et al., 2013; Guo et al., 2017; Huang et al., 2020). O aumento sistêmico de AS tem papel crucial na ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR), induzindo a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e desencadeando, em última instância, uma resposta hipersensível (Yalpani et al., 1991).

Diante desse contexto, este estudo investigou a relação entre o metabolismo de aminoácidos e a via de defesa mediada pelo AS em *Arabidopsis thaliana*. Para tanto, foram utilizados mutantes T-DNA e plantas com superexpressão de *WRKY45* sob o controle do promotor constitutivo 35S, em dois experimentos distintos: (i) aplicação exógena de AS e (ii) inoculação com o patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Os resultados indicaram que as plantas *35S-WRKY45* foram capazes de restringir o crescimento bacteriano, embora não tenham apresentado diferenças significativas em resposta ao tratamento com AS isoladamente.

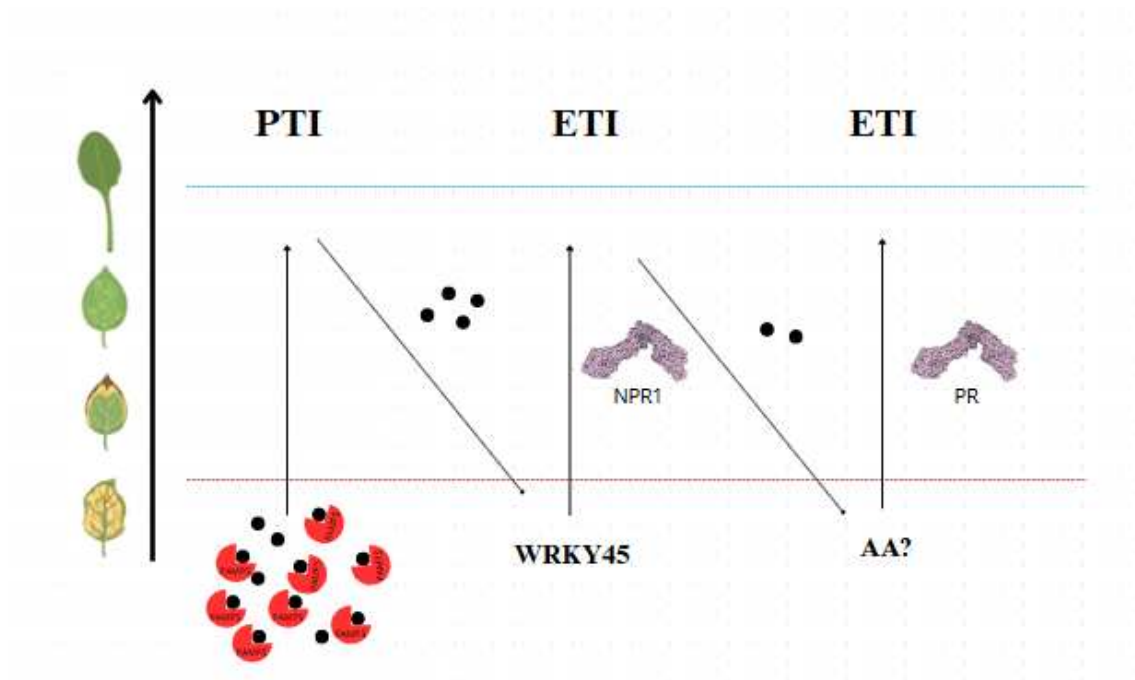


Figura 1: Esquema Z adaptado representando a resposta imune em plantas. A resposta imune vegetal é dividida em PTI (Imunidade Ativada por PAMPs) e ETI (Imunidade Ativada por Efeitores). Durante a PTI, ocorre a ativação de PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões), desencadeando uma resposta imune basal. Durante a ETI, a regulação pode envolver fatores como WRKY45, que ativa NPR1, intensificando a resposta imune. Ao final do processo, proteínas relacionadas à patogênese (PR) são ativadas, possivelmente com a participação de aminoácidos específicos, agindo que atuam como sinalizadores ou precursores metabólicos. A progressão da resposta imune é apresentada à esquerda.

METODOLOGIA

Análises *in silico*

Os dados transcriptômicos associados ao fator de transcrição WRKY45 em *Arabidopsis thaliana* foram analisados utilizando a ferramenta ePlant, disponível em bar.utoronto.ca/eplant.

Material vegetal e condições experimentais

Foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia (Col-0), juntamente com duas linhas mutantes de superexpressão do gene *WRKY45* (*AT3G01970*), designadas como *35S::WRKY45-1* e *35S::WRKY45-4* (Figura 2) além de uma linha com inserção de T-DNA (*wrky45*). O cultivo foi realizado em câmara de crescimento sob temperatura controlada de 22 °C e irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob um fotoperíodo

de 8 horas de luz e 16 horas de escuro. As sementes foram esterilizadas em álcool 70% por 2 minutos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Posteriormente, as sementes foram enxaguadas repetidamente (seis vezes) com água esterilizada. Após a esterilização, as sementes foram distribuídas em placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS (Murashige e Skoog, 1962) e mantidas a 4 °C no escuro por 48 horas para estratificação. Em seguida, as placas foram transferidas para uma câmara de crescimento por 10 dias, após os quais as plântulas foram transplantadas para vasos de 0,08 dm³ contendo substrato comercial (Carolina Soil®), sendo mantidas sob as mesmas condições ambientais descritas anteriormente. A coleta das plantas foi realizada em diferentes intervalos de tempo: 0h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h após a aplicação do tratamento.

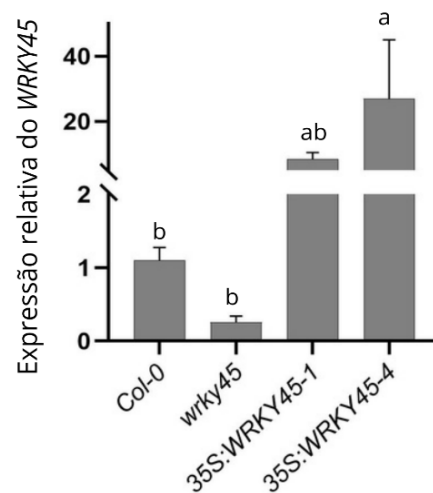


Figura 2: Expressão do gene WRKY45 nos genótipos *Col-0*; *wrky45*, *35s::WRKY45-1* e *35s::WRKY45-4*. Os valores representam a média de três replicatas biológicas, normalizados em relação ao genótipo *Col-0*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tratamento com ácido salicílico

Foi aplicada uma solução de ácido salicílico (10 μ M), conforme descrito por Nair et al. (2021), em plantas com quatro semanas após o transplante. A solução foi preparada em etanol a 10% e aplicada de forma combinada por duas vias: aspersão foliar e aplicação no substrato (3 mL por vaso). O grupo controle recebeu apenas água destilada, conforme metodologia adaptada de Napoleão et al. (2017a).

Crescimento e inoculação de *Pseudomonas. syringae* pv. *tomato* DC3000

As cepas de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 foram cultivadas a 28 °C em meio de cultivo LB (Luria-Bertani, 1951) suplementado com 50 µg mL⁻¹ de rifamicina. As placas foram incubadas em câmara BOD a 28 °C por 48 horas. Para inoculação, a cepa bacteriana foi suspensa em MgCl₂ 10 mM e diluída até atingir uma densidade óptica (DO) final de 0,1 (~10⁸ UFC mL⁻¹). A infecção foi realizada por aspersão foliar das plantas quatro semanas e meia após o transplante. Para facilitar a adesão da bactéria, foi adicionado 0,01% de Tween-20 à suspensão bacteriana. O grupo controle recebeu solução de MgCl₂ 10 mM contendo 0,01% de Tween-20, sem a presença de bactéria.

Quantificação da população de *P. syringae* DC3000 em folhas de *Arabidopsis thaliana*

A quantificação da população bacteriana foi realizada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Para isso, foram coletados discos foliares com auxílio de um trado de 0,89 cm², com cinco repetições biológicas de plantas infectadas. Cada disco foliar foi macerado manualmente em 1 mL de água destilada autoclavada, correspondendo à primeira diluição (diluição 1). A partir dessa suspensão inicial, 100 µL foram transferidos para um segundo tubo contendo 900 µL de água destilada autoclavada (diluição 2), repetindo-se o procedimento para as diluições subsequentes (diluições 3 e 4).

Para a quantificação bacteriana, placas contendo meio de cultivo LB (Luria-Bertani, 1951), suplementado com 50 µg mL⁻¹ de rifamicina, foram divididas em quatro quadrantes, onde foram pipetadas 10 µL de cada diluição, em três repetições técnicas por diluição (Figura 2). As placas foram incubadas a 28 °C em câmara BOD, e as UFCs foram quantificadas a posteriori.

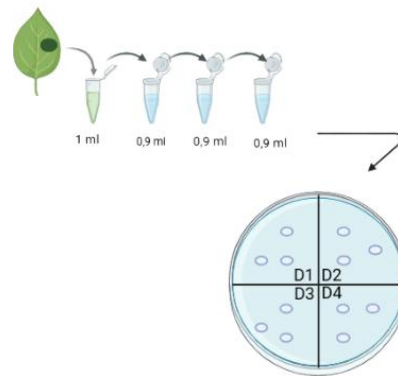


Figura 3: Modelo visual do procedimento de diluição seriada e plaqueamento.

Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o método do Trizol (Invitrogen®). O RNA extraído foi tratado com DNase (Ambion™, Thermo Fisher®) para a remoção de contaminantes genômicos. A qualidade e a quantidade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria (razão OD260/OD280), utilizando um NanoDrop (Thermo Fisher®) por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, garantindo a integridade do material extraído.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a transcriptase reversa High-Capacity cDNA (Applied Biosystems®), seguindo as recomendações do fabricante. A PCR quantitativa (qPCR) foi conduzida utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), empregando primers específicos para genes relacionados ao catabolismo de aminoácidos e à defesa vegetal (Tabela 1), a expressão dos genes foi normalizada pelo gene endógeno ACTIN. Além disso, foi analisada a expressão do gene *WRKY45* no genótipo *Col-0*.

GENE	ID AGI	FW	RV
ICS1	AT1G74710	GCTTGGCTAGCACAGTTACAGC	CACTGCAGACACCTAATTGAGTCC
EDS1	AT3G48090	GCTCAATGACCTTGGAGTGAGC	TCTTCTCTAATGCAGCTGAACG
NPRI	AT1G64280	AACGATTCTTCCCGCCGCTGTTC	TTCTCCGCAAGCCAGTTGAGTC
LKR-SDH	AT4G33150	ACCTGCAAGTTGTCATGCTGTTG	AGTGACGAGATGCTTCTCAGCTC
IVDH	AT3G45300	AATGGGAAAGTTGACCCAAAGGAC	TAAAGCGACCTGCGTTGCTCTC

Tabela1: Genes analisados e suas identificações dos respectivos locus, seguido do conjunto de primers desenhados. *ICS1*-(*isocorismato sintase 1*); *EDS1* (*Enhanced Disease Susceptibility 1*); *NPRI* (*Nonexpressor de Pathogenesis-Related Genes 1*); *LKR-SDH* (*Lysine-Ketoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase*); *IVDH* (*Isovaleryl-CoA Dehydrogenase*).

Análises bioquímicas

Amostras foliares foram submetidas à extração metanólica a quente, conforme descrito anteriormente (Salem et al., 2016). Na fração solúvel em etanol, foram determinados os teores de clorofila (Porra et al., 1989) e aminoácidos totais (Gibon et al., 2004). Na fração insolúvel, foi quantificado o conteúdo de proteína total (Gibon et al., 2004).

Desenho Experimental E Análise Estatística

Os ensaios experimentais foram conduzidos utilizando controles para a aplicação e para os genótipos, em cada intervalo de tempo. As amostras foram coletadas nos seguintes tempos: 0,12 e 24 horas após aplicação dos tratamentos. Os experimentos seguiram um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($P \geq 0,05$) e ao teste de homogeneidade de Levene ($P \geq 0,05$). Quando os critérios de normalidade e homogeneidade foram atendidos, as médias de cada genótipo foram comparadas entre controle e tratamento por meio do Teste *t* de Student ($P \leq 0,05$). Para a comparação entre genótipos dentro de cada tempo, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). Todas as análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software R (R Development Core Team, 2019).

RESULTADOS

Análises *in silico*

Simulações computacionais indicaram uma indução na expressão do gene *WRKY45* 24 h após a infecção com *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Figura 5B). Para confirmar essa previsão, a expressão do gene foi analisada experimentalmente em plantas Col-0 24 e 48 horas após a inoculação com *P. syringae* pv. *Tomato* (Figura 4). Os resultados corroboram a projeção, evidenciando que a expressão do gene *WRKY45* variou ao longo do tempo nas plantas selvagens sob as condições de controle e tratamento. Após 24 horas, observou-se um

aumento significativo na expressão do gene nas plantas tratadas, enquanto no controle os níveis permaneceram baixos (Figura 4). No entanto, essa ativação não foi sustentada, e após 48 horas a expressão de WRKY45 retornou a níveis basais (Figura 4).

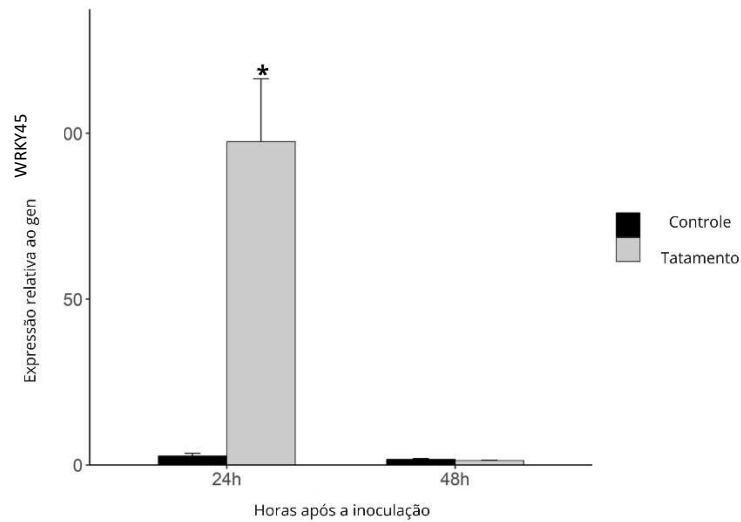


Figura 4: Expressão relativa do gene WRKY45 no genótipo *Arabidopsis thaliana* Col-0 em resposta à inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, avaliada em 24 e 48 horas após a inoculação. Os valores representam a média de três replicatas biológicas, normalizadas em relação ao controle não inoculado. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre tratamento e controle, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

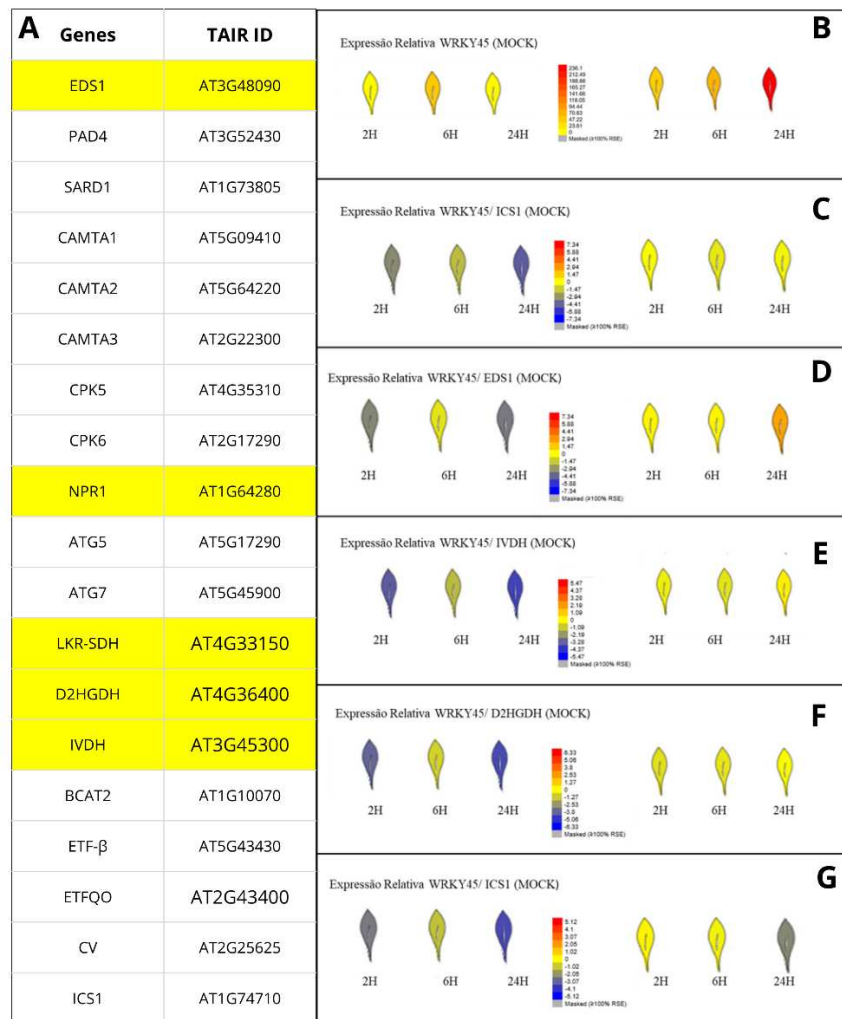


Figura 5: Correlação da expressão de genes relacionados à biossíntese de ácido salicílico (AS), sinalização e catabolismo de aminoácidos *Arabidopsis thaliana*. A) Lista de genes selecionados e seus respectivos identificadores TAIR. Genes destacados em amarelo apresentaram correlação significativa de expressão com WRKY45. B) Expressão relativa do WRKY45 após infecção com *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. C-G) Expressão relativa (\log_2FC) dos genes em relação a expressão de WRKY45 em condição controle (MOCK) e após desafio com *Pseudomonas syringae* DC3000 (10^6 UFC/mL) em diferentes tempos (2h, 6h e 24h). As escalas de cores variam de azul (down-regulation) a vermelho (up-regulation).

Foi realizada uma análise nos bancos de dados disponíveis no ePlant (bar.utoronto.ca/eplant) e no TAIR, com foco na interação da proteína WRKY45 com genes relacionados à defesa vegetal e ao catabolismo de aminoácidos, considerando sua influência nos mecanismos de defesa das plantas. Dentre as diversas proteínas que possivelmente interagem com o fator de transcrição WRKY45, destaca-se sua capacidade de modular a expressão gênica, promovendo ou reprimindo genes associados à biossíntese de ácido salicílico (AS) e ao catabolismo de aminoácidos (Figura 5C–G).

Entre os genes avaliados, apenas EDS1, NPR1, LKR-SDH, D2HGDH e IVDH (destacados em amarelo na figura 5A) apresentaram expressão correlacionada com WRKY45, sugerindo participação direta na via regulatória mediada por esse fator de transcrição.

Um dos genes diretamente envolvidos nesse processo é ICS1, que catalisa a conversão de corismato em isocorismato, etapa essencial na rota de biossíntese de AS dependente de corismato. Além disso, WRKY45 mostrou-se correlacionado com o gene EDS1, que desempenha papel fundamental na ativação de NPR1. Na Figura 5B, observa-se que WRKY45 é fortemente induzido em resposta à infecção bacteriana, alcançando níveis máximos após 24 horas.

Para validar as análises *in silico*, foram conduzidos dois experimentos independentes, seguindo o mesmo protocolo experimental, com plantas de aproximadamente 4,5 semanas de idade cultivadas sob condições controladas.

De forma geral, todos os genes correlacionados apresentaram downregulation em condições basais (MOCK) e tiveram sua expressão significativamente aumentada após o desafio com o patógeno. No entanto, LKR-SDH apresentou downregulation em 24h, possivelmente devido à ativação de rotas diferenciais de degradação de lisina.

No primeiro experimento, realizou-se a aplicação exógena de AS (10 μ M). No segundo experimento, as plantas foram inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ($\sim 10^8$ UFC mL⁻¹). Para avaliar os efeitos dos tratamentos, foram analisados parâmetros de crescimento e desenvolvimento, incluindo o metabolismo primário e a integridade do fotossistema II em resposta ao estresse.

A aplicação de AS não resultou em alterações fenotípicas ou mudanças relevantes no metabolismo primário nos mutantes *wrky45*, *35s::WRKY45-1* e *35s::WRKY45-4*:

A aplicação de AS 10 μ M não induziu um fenótipo de senescência após 72 h da aplicação (Figura 6). No entanto, a eficiência máxima quântica do PSII (F_v/F_m) apresentou uma redução significativa entre controle e tratamento para o mutante *wrky45* no terceiro dia de tratamento, indicando que este genótipo foi o mais comprometido em termos de funcionalidade do aparato fotossintético (Figura 6E).

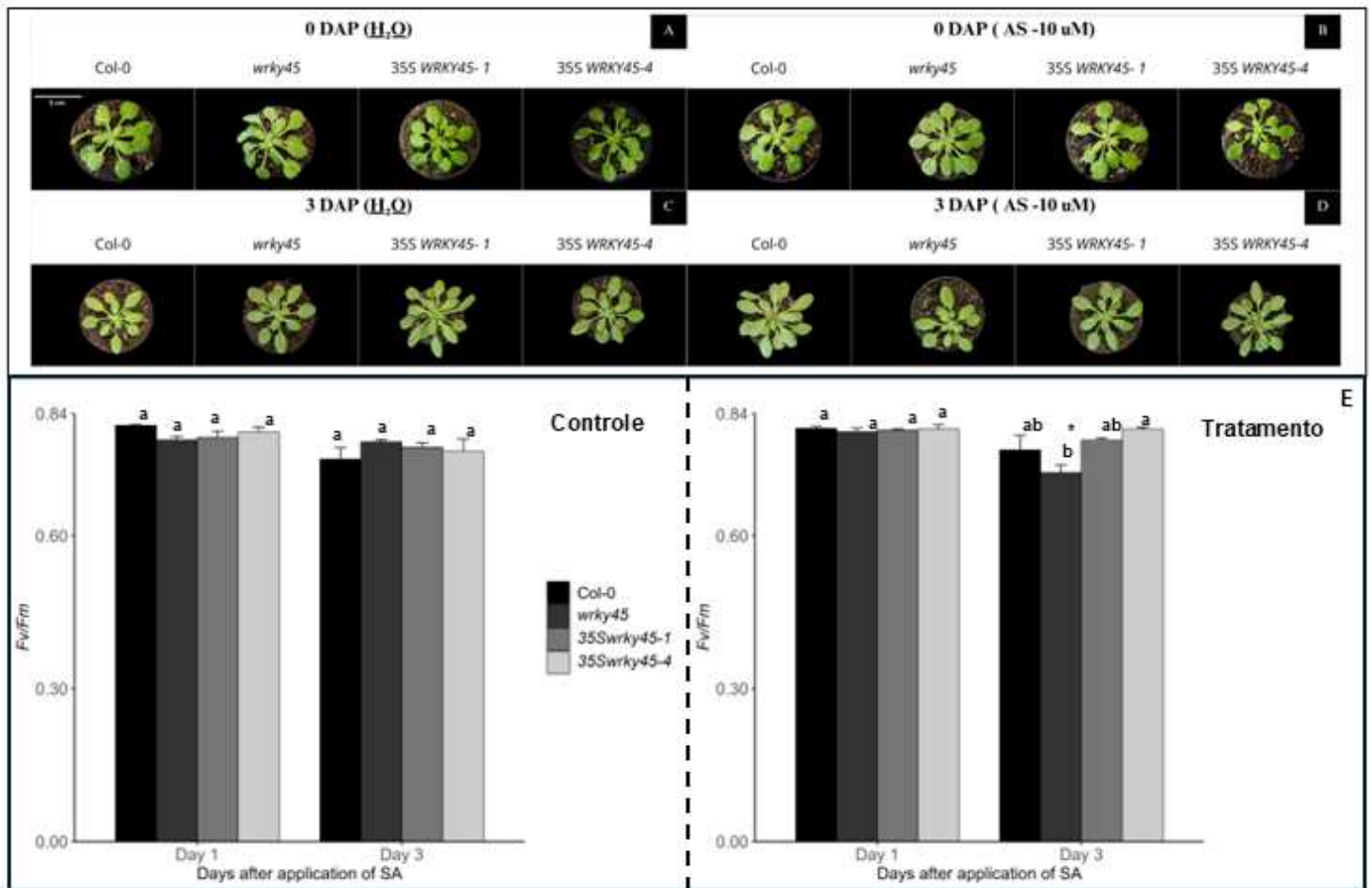


Figura 6: Efeito da aplicação de ácido salicílico (AS) no crescimento e parâmetros fisiológicos. Os genótipos Col-0, wrky45, 35s::WRKY45-1 e 35s::WRKY45-4 foram analisados no dia 0 e 3 após a aplicação exógena de AS. (A) Fotografias imediatamente após a aplicação de água (controle); (B) Fotografias imediatamente após a aplicação de 10 μ M de AS; (C) Fotografias do grupo controle após 3 dias; (D) Fotografias dos genótipos 3 dias após a aplicação de 10 μ M de AS; (E) Eficiência máxima quântica do PSII (F_v/F_m). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento ($p < 0,05$; teste t).

No entanto, os teores de pigmentos fotossintéticos (Figura 7) não foram afetados pela aplicação exógena de AS, mesmo após 48h. Entretanto, o mutante 35S-*WRKY45-1* apresentou os maiores teores de pigmentos entre os genótipos em ambos os horários analisados, ao passo que o mutante T-DNA exibiu as menores médias em todos os tratamentos.

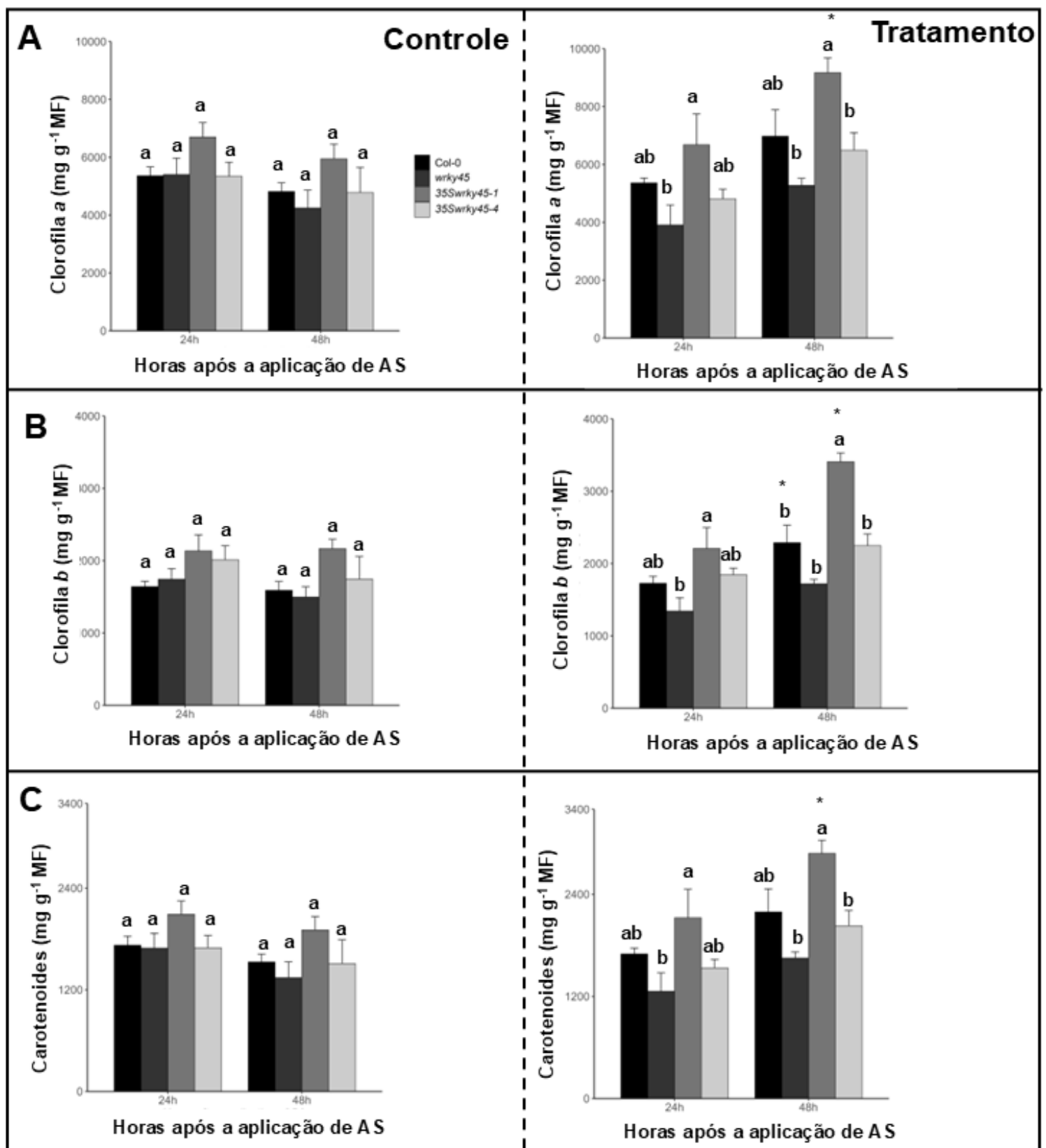


Figura 7: Teores de pigmentos fotossintéticos em *Arabidopsis thaliana* 24 e 48 horas após a aplicação de ácido salicílico (10 μ M). Foram quantificados os teores de A) clorofila a, B) clorofila b e C) carotenoides. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e tempos avaliados, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

A aplicação de ácido salicílico (AS, 10 μ M) promoveu alterações diferenciais nos teores de carboidratos (amido, sacarose, glicose e frutose) nos genótipos analisados (*Col-0*, *wrky45*, *35S::WRKY45-1* e *35S::WRKY45-4*) após 24 e 48 horas (Figura 8).

O mutante *35S::WRKY45-1* apresentou acúmulo significativo de açúcares solúveis após 24 h do tratamento, acompanhado por aumento expressivo no conteúdo de amido após 48 h. O mutante *wrky45* também apresentou incremento nos níveis de glicose após 24 h, seguido por aumento no acúmulo de amido em 48 h, embora em menor importância que o *35S::WRKY45-1*.

Por outro lado, o genótipo *Col-0* exibiu redução nos níveis de sacarose e amido em 24 h, sugerindo resposta menos eficiente ao tratamento com AS. Após 48 h, o mutante *35S::WRKY45-1* manteve os maiores níveis de sacarose, glicose e amido entre os genótipos avaliados, enquanto o *35S::WRKY45-4* se destacou por apresentar as maiores concentrações de frutose, padrão que também foi observado em 24 h (Figura 8D).

De forma geral, o mutante *wrky45* apresentou as menores concentrações de açúcares solúveis em 24 h, reforçando o papel positivo de WRKY45 na regulação do metabolismo de carboidratos em resposta ao tratamento com AS.

Destaca-se que ácidos orgânicos são essenciais para o metabolismo do carbono nas plantas, pois participam diretamente de vias metabólicas centrais que produzem energia, biomassa e compostos de defesa, e suas concentrações podem indicar servir como panorama do direcionamento do fluxo metabólico.

Portanto, notou-se que a linha *35S::WRKY45-1* apresentou uma concentração elevada de ácidos orgânicos após 48h após o tratamento. Além disso, os mutantes de superexpressão mantiveram níveis elevados de fumarato após 24h (Figura 9C). Após 48h de tratamento, o mutante *wrky45* exibiu a menor concentração de fumarato entre os genótipos analisados. Mas ainda teve um incremento com relação ao controle, o que também foi observado nos demais genótipos.

No entanto, nos genótipos *Col-0* e *35S::WRKY45-1* o incremento foi posterior um decréscimo na concentração desse metabólito após 24h de tratamento. O mutante *35S::WRKY45-4* apresentou um decréscimo nos níveis de malato 24h após a aplicação de AS, enquanto *35S::WRKY45-1* apresentou um aumento relativo 48h após a aplicação de AS.

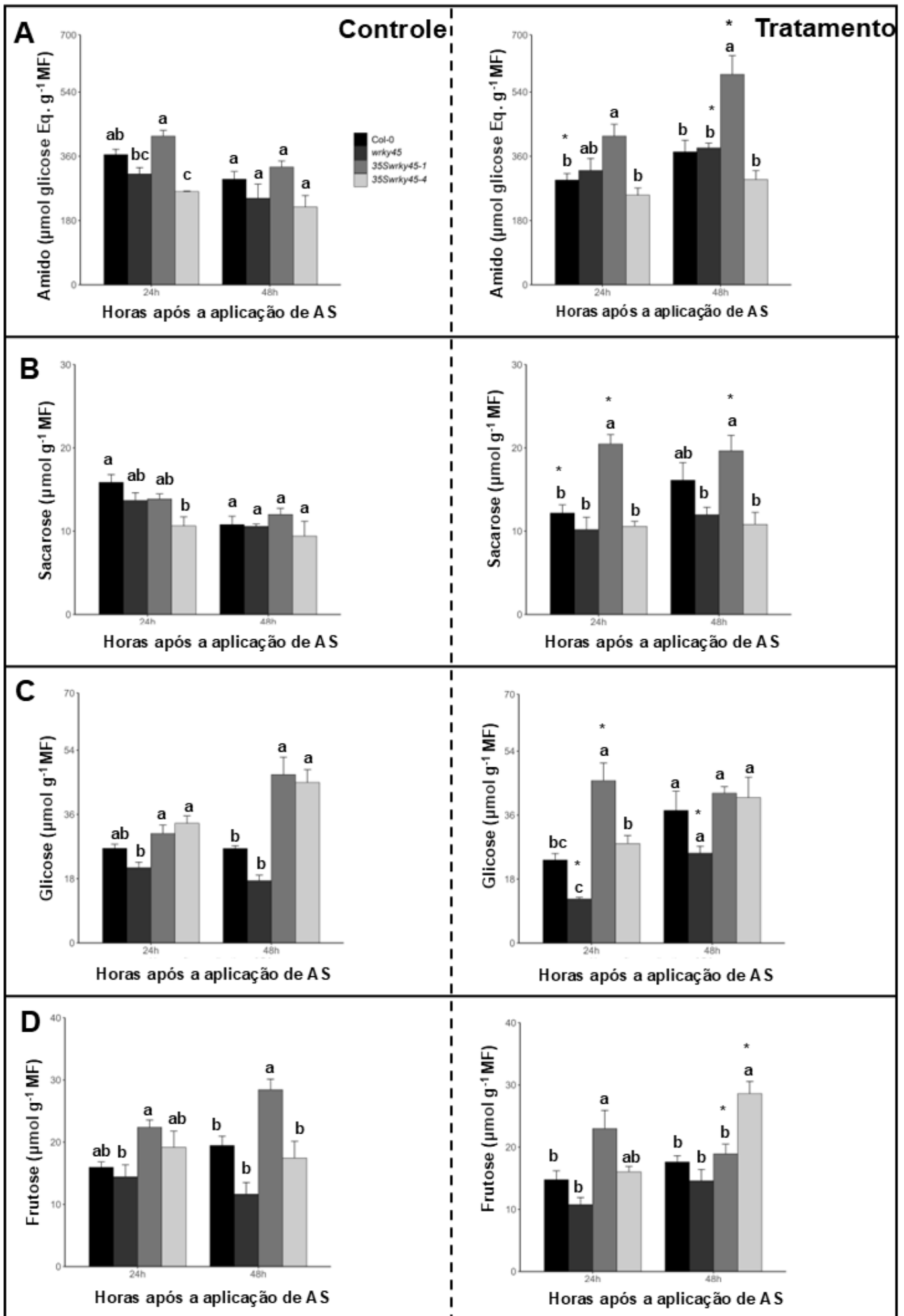


Figura 8: Efeito da aplicação de ácido salicílico (AS, 10 μM) nos teores de carboidratos em *Arabidopsis thaliana* dos genótipos Col-0, wrky45, 35s::WRKY45-1 e 35s::WRKY45-4, avaliados após 24 e 48 horas. A) Concentração de amido (μmol de glicose Eq. g^{-1} MF). B) Concentração de sacarose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). C) Concentração de glicose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). D) Concentração de frutose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). Os gráficos à esquerda da linha pontilhada correspondem ao grupo controle, enquanto os gráficos à direita correspondem ao tratamento (aplicação de AS). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo tempo de avaliação, determinada pelo teste t ($p < 0,05$).

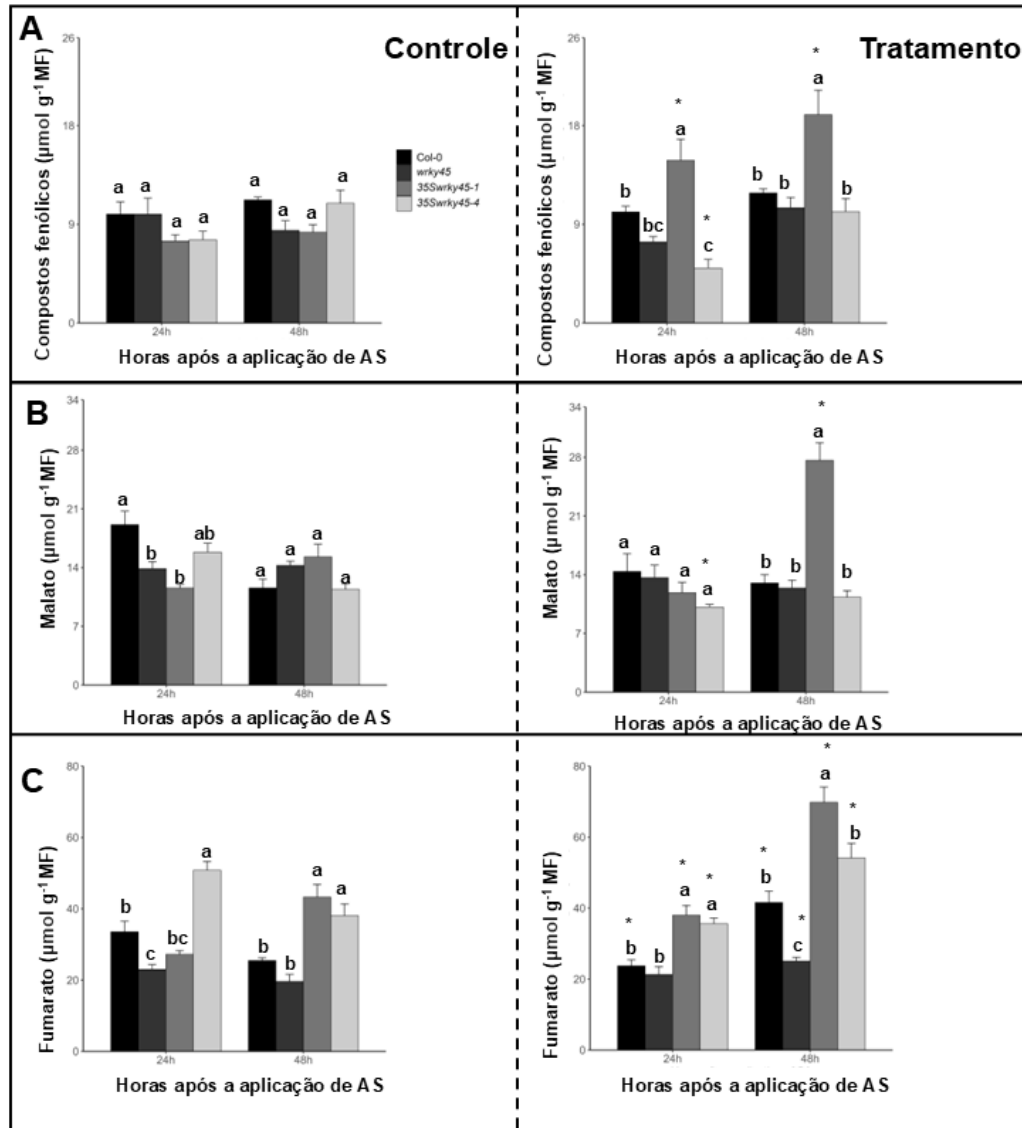


Figura 9: Variação nos níveis de metabólitos primários: malato (A), fumarato (B), compostos fenólicos (C). Os gráficos a esquerda do pontilhado correspondem ao controle e os gráficos a esquerda correspondem ao tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

A linha *35S::WRKY45-1* e o mutante apresentaram um aumento na concentração de compostos fenólicos 48h após a aplicação de AS, em comparação com o controle. Destaca-se que no tratamento com AS, após 24h, o mutante *35S::WRKY 45-4* apresentou a menor concentração de compostos fenólicos, enquanto *35S::WRKY 45-1* exibiu a maior concentração de compostos fenólicos em ambos os tempos avaliados (Figura 9A).

De modo geral, o tratamento com ácido salicílico (AS) apresentou impacto mais pronunciado nas plantas superexpressoras de WRKY45, promovendo aumento significativo nos níveis de compostos fenólicos, malato e fumarato, principalmente após 48 horas da aplicação.

Os aminoácidos, que desempenham papel essencial na defesa vegetal frente a diversos estresses, também apresentaram acúmulo significativo em resposta ao AS após 48 horas, especialmente nos mutantes *35S::WRKY45-1* e *wrky45*, enquanto a linha *35S::WRKY45-4* apresentou aumento no conteúdo de proteínas totais no mesmo período (Figura 10). No entanto, não foram observadas diferenças expressivas entre os genótipos para os níveis de proteínas totais no tratamento com AS (Figura 10A).

Em relação aos aminoácidos, as linhas de superexpressão apresentaram concentrações mais elevadas no tratamento com AS, com destaque para *35S::WRKY45-4*, que exibiu aumento significativo já em 24 h, enquanto *35S::WRKY45-1* apresentou elevação apenas em 48 h. De forma consistente, as linhas de superexpressão exibiram níveis de aminoácidos superiores aos observados no mutante nocaute.

Analisando especificamente os níveis do aminoácido prolina, observou-se que os mutantes *wrky45* e *35S::WRKY45-1* apresentaram aumento significativo após 48 h de aplicação de AS, enquanto *35S::WRKY45-4* apresentou incremento já em 24 h, reforçando o papel de WRKY45 na modulação do metabolismo de aminoácidos relacionados ao estresse.

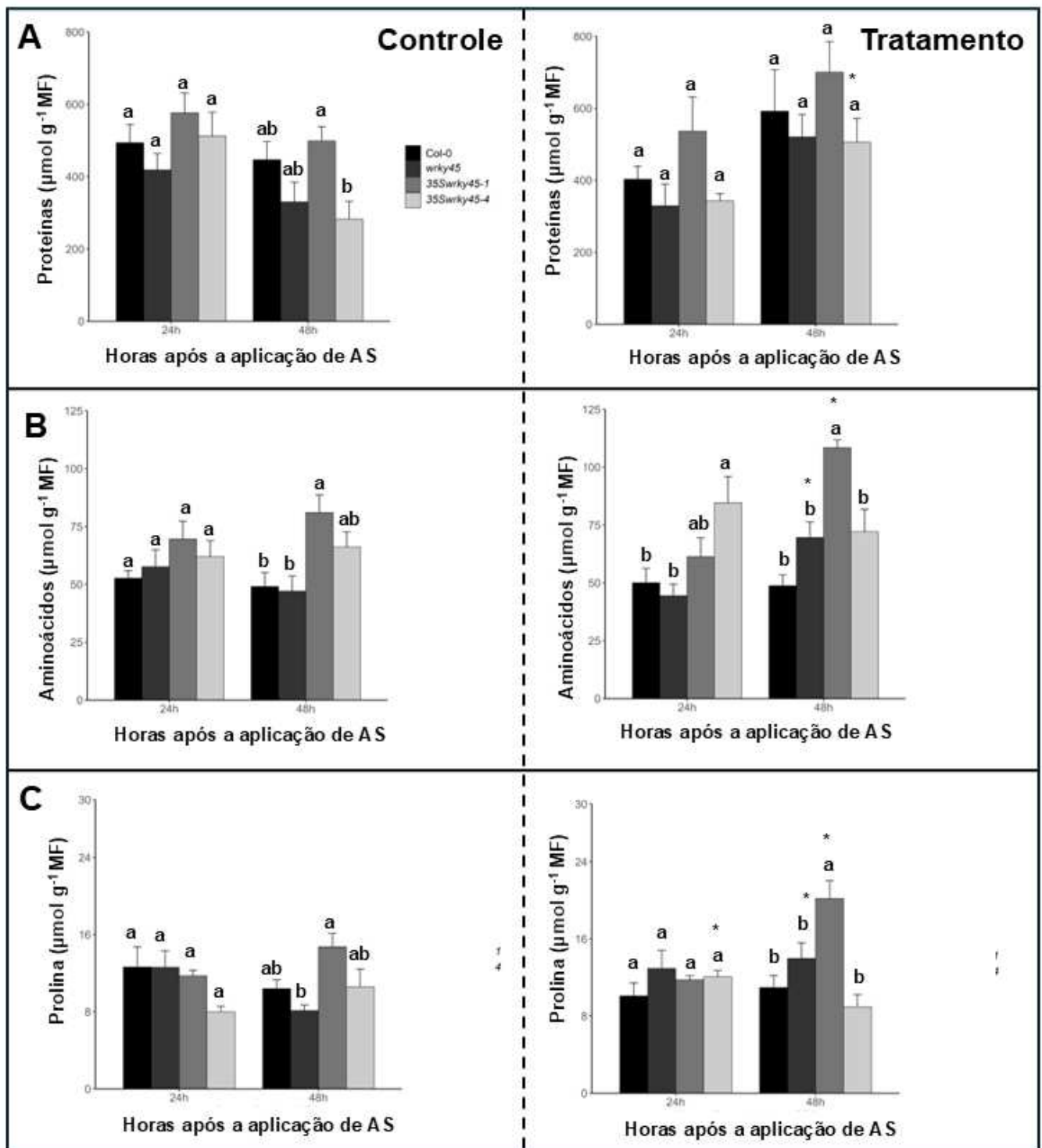


Figura 10: Efeito da aplicação de ácido salicílico (AS, $10 \mu\text{M}$) sobre o acúmulo de proteínas totais, aminoácidos e prolina nos genótipos de *Arabidopsis thaliana* Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1 e 35S::WRKY45-4 após 24 e 48 horas. A) Conteúdo de proteínas totais ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$). B) Conteúdo total de aminoácidos livres ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$). C) Conteúdo de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$). Os gráficos à esquerda representam o grupo controle, enquanto os da direita correspondem ao tratamento com AS. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre genótipos no mesmo tempo, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

A superexpressão deWRKY45 suprime o crescimento bacteriano:

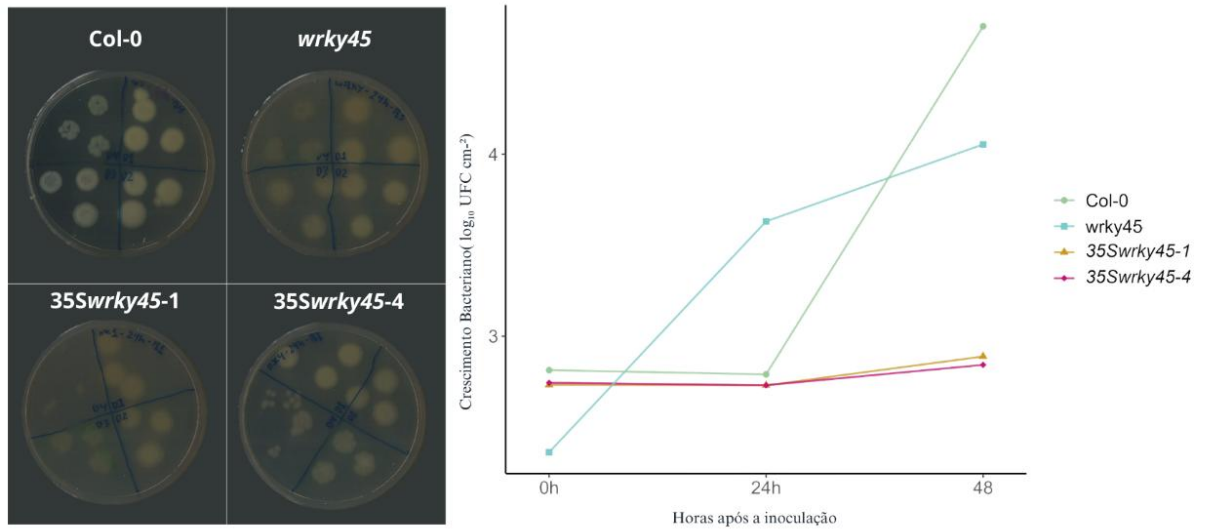


Figura 11: Comparação do crescimento bacteriano entre genótipos Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1 e 35S::WRKY45-4, nos tempos de 0h, 24h e 48h. O eixo vertical representa o crescimento bacteriano em uma escala logarítmica (\log_{10} UFC/cm³), enquanto o eixo horizontal indica o tempo em horas após a inoculação (0h, 24h, 48h). Dados significativos foram dados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) - Os testes estatísticos podem ser vistos na tabela suplementar 1.

Plantas que superexpressão *WRKY45* apresentaram um crescimento bacteriano semelhante ao Col-0 até as 24 horas após a inoculação com *P. syringae* pv *tomato* DC 3000 (Figura 11). No entanto, a partir desse ponto, os mutantes de superexpressão demonstraram uma capacidade eficaz de suprimir o crescimento bacteriano. Em contraste, o tipo selvagem Col-0 foi caracterizada com um crescimento bacteriano exponencial após as 24 horas. Por outro lado, o mutante *wrky45* apresentou um crescimento bacteriano significativamente maior que os demais genótipos até as 24 horas, mas após 48 horas, a taxa de crescimento bacteriano neste genótipo se aproximou da observada no tipo selvagem.

Esses resultados sugerem que a superexpressão de *WRKY45* confere maior resistência à infecção bacteriana a partir das 24 horas, enquanto a ausência ou redução dessa expressão no mutante *wrky45* culmina em maior susceptibilidade à infecção. Notavelmente, o mutante T-DNA apresentou uma menor eficiência máxima quântica do PSII no tratamento, o que pode indicar uma redução na eficiência fotossintética (Figura 12E). Esse fenômeno foi associado, ao menos em partes, a um aumento nos níveis de clorofila *a* e carotenoides (Figura 13 A e C), indicando um possível efeito compensatório.

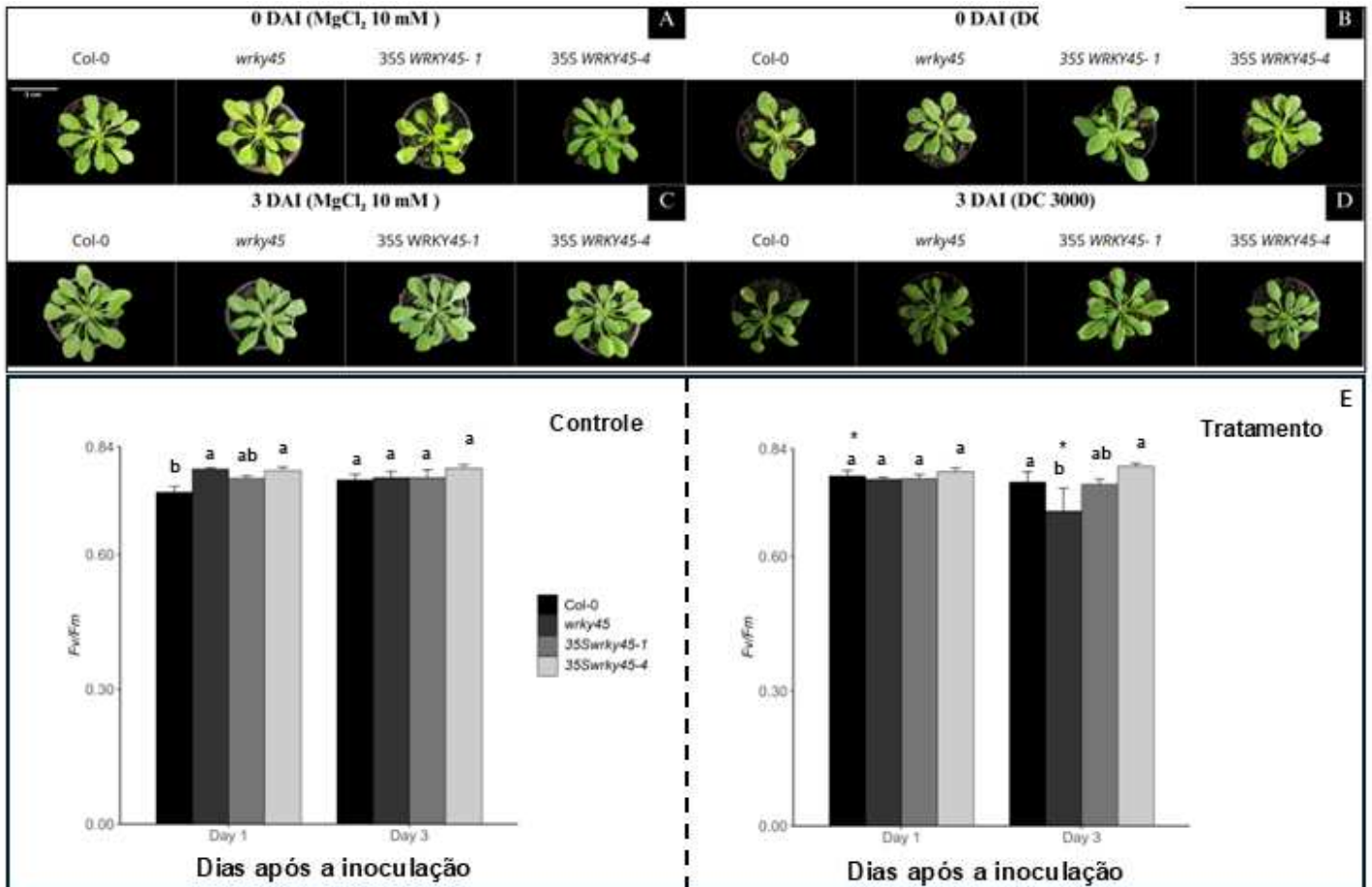


Figura 12: Impacto da inoculação de DC3000 no crescimento e nos parâmetros fisiológicos dos genótipos *Col-0*, *wrky45*, *35s::WRKY45-1* e *35s::WRKY45-4* após 24 e 48 horas. (A) Imagens registradas imediatamente após a aplicação de água (MgCl₂ mM). (B) Imagens registradas imediatamente após a Infecção bacteriana. (C) Fotografias dos genótipos três dias após a aplicação do controle. (D) Fotografias dos genótipos três dias após a após a Infecção bacteriana. (E) Eficiência máxima quântica do fotossistema II (Fv/Fm). Barras identificadas por letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

Cabe destacar que, em condições controle, as plantas *Col-0* apresentaram níveis elevados de amido, os quais permaneceram estáveis ao longo dos dois tempos analisados. No entanto, essa estabilidade foi acompanhada por uma redução nos níveis de frutose e glicose, ao passo que a concentração de sacarose aumentou (Figura 14).

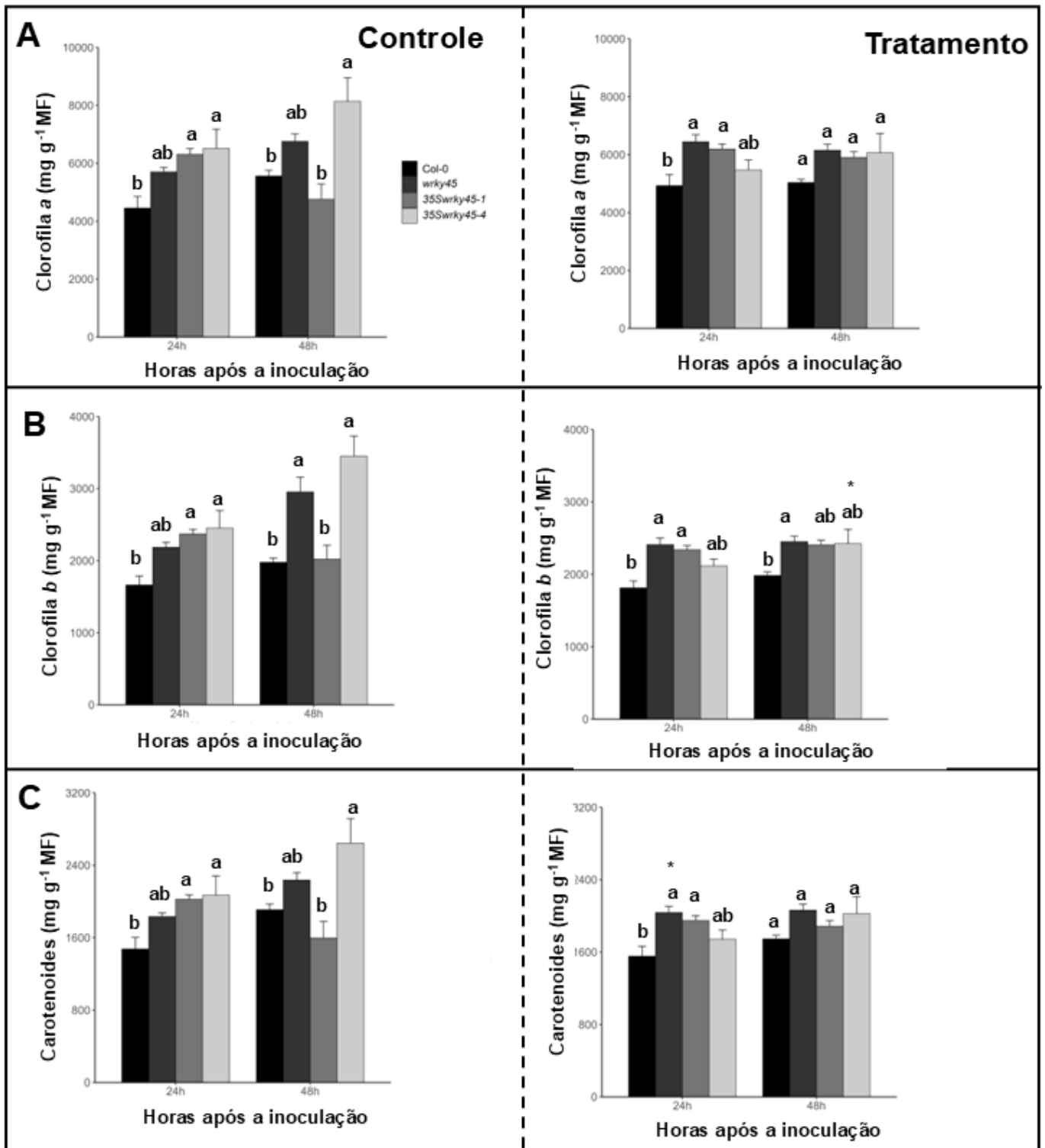


Figura 13: Teores de pigmentos fotossintéticos em *Arabidopsis thaliana* 24 e 48 horas após a aplicação de ácido salicílico (10 μ M). Foram quantificados os teores de A) clorofila a, B) clorofila b e C) carotenoides. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e tempos avaliados, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

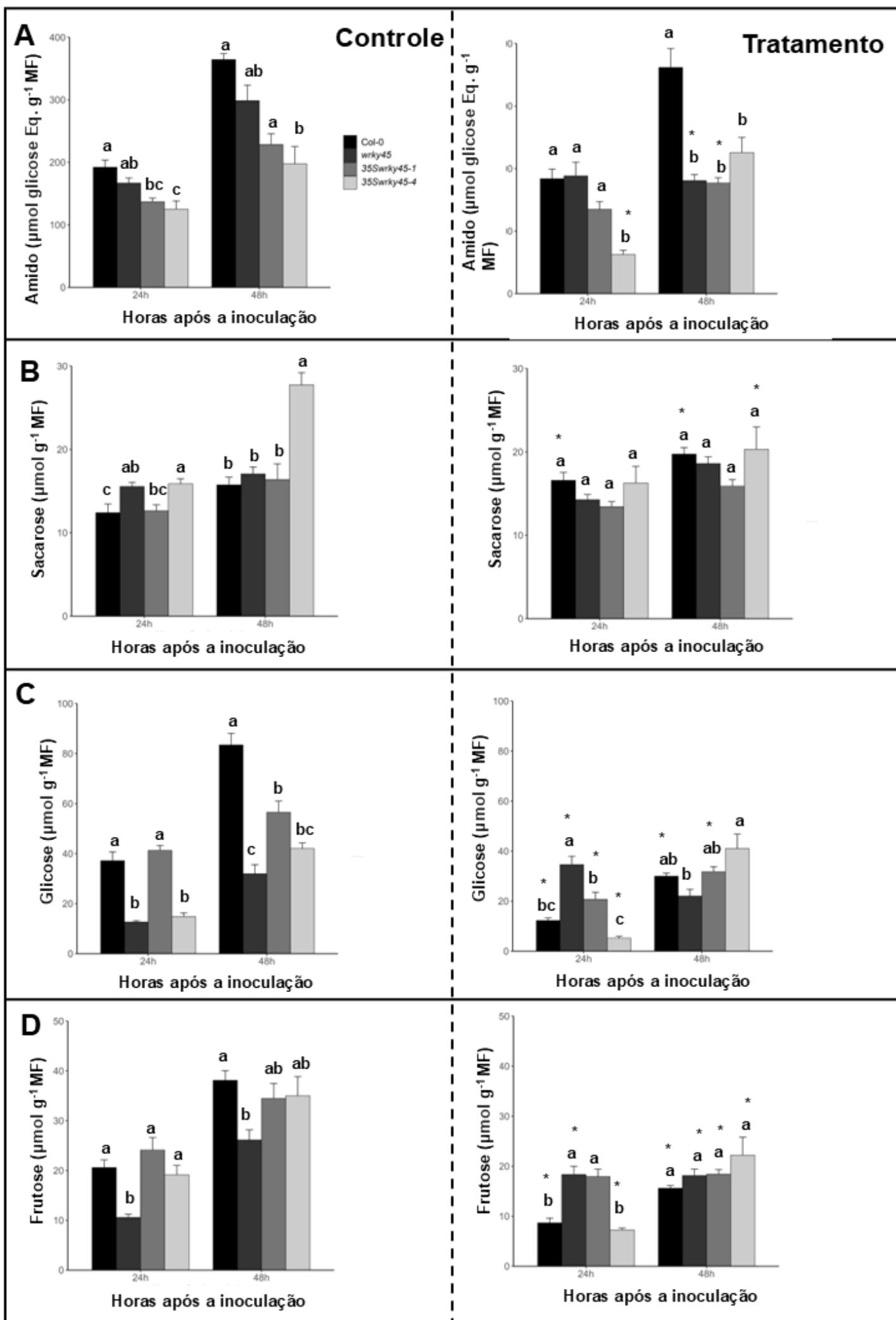


Figura 14: Impacto da inoculação de DC3000 nos parâmetros fisiológicos dos genótipos *Col-0*, *wrky45*, *35S::WRKY45-1* e *35S::WRKY45-4* após 24 e 48 horas (A) Concentração de amido. (B) Concentração de sacarose. (C) Concentração de glicose. (D) Concentração de frutose. Os gráficos posicionados à esquerda da linha pontilhada representam os resultados do grupo controle (aplicação de água), enquanto aqueles à direita correspondem ao grupo inoculado. Barras identificadas por letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

As plantas de superexpressão seguiram um padrão de acúmulo de amido, associado a um consumo de açúcares solúveis, em resposta ao tratamento (Figura 14). Interessantemente, o mutante *wrky45* apresentou um comportamento oposto, consumindo amido e elevando os níveis de açúcares solúveis, com um aumento mais pronunciado às 24 horas (Figura 14).

Os níveis de proteínas permaneceram constantes em todos os genótipos ao longo dos tempos avaliados (Figura 15), porém, *Col-0* apresentou concentrações mais elevadas (Figura 15). Além disso, no tratamento com *P. syringae* pv *tomato* DC3000, os níveis de aminoácidos aumentaram no *Col-0* em ambos os tempos analisados.

Foi observado também, uma redução nos níveis de aminoácidos em *wrky45*, comportamento semelhante ao do *35S::WRKY45-4*, enquanto o *35S::WRKY45-1* apresentou um acúmulo desses compostos às 24 horas (Figura 14).

Em relação aos ácidos orgânicos, os níveis de malato aumentaram no *Col-0* após 24 horas e no *35S::WRKY45-1* após 48 horas, enquanto o mutante *wrky45* apresentou um consumo desse substrato (Figura 15). Por outro lado, o fumarato foi consumido no *Col-0* em ambos os tempos, de forma similar as linhagens de superexpressão, sendo que o *wrky45* também demonstrou um consumo desse metabólito (Figura 15).

Interessantemente, apenas as linhagens de superexpressão apresentaram consumo de compostos fenólicos no tratamento (Figura 15). Destaca-se que, no controle, o mutante *35S::WRKY45-4* possuía os níveis mais elevados de compostos fenólicos, quando comparado aos demais genótipos.

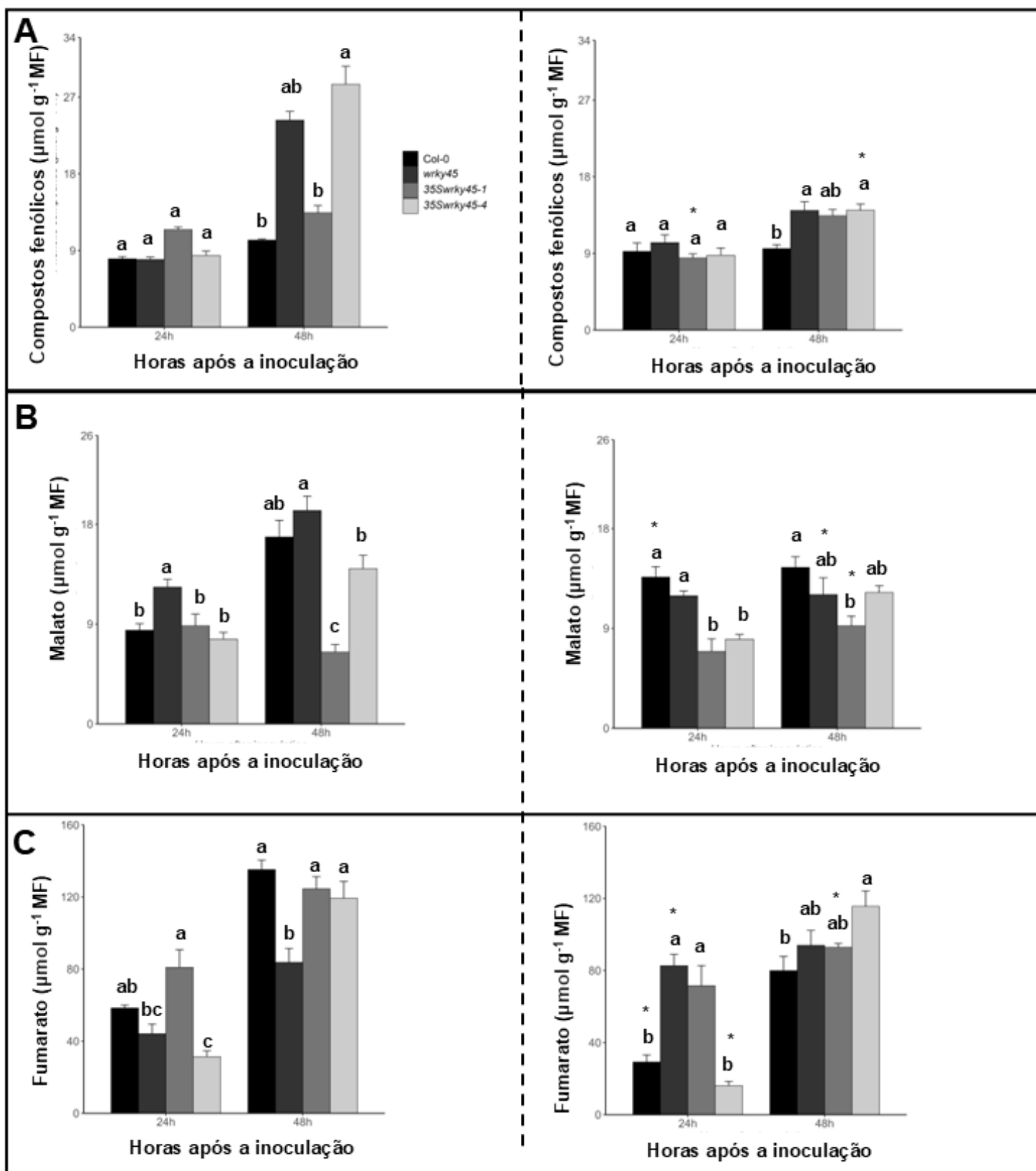


Figura 15: Variação nos níveis de metabólitos primários: malato (A), fumarato (B), compostos fenólicos (C). Os gráficos a esquerda do pontilhado correspondem ao controle e os gráficos a esquerda correspondem ao tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre controle e tratamento no mesmo genótipo e tempo, conforme determinado pelo teste t ($p < 0,05$).

Inoculação bacteriana afeta a expressão gênica

Com base no estudo *in silico*, alguns genes foram selecionados e avaliados quanto à sua expressão nos diferentes genótipos, considerando condições controle e pós-inoculação bacteriana, nos tempos de 24 e 48 horas. O gene *IVDH* (*Isovaleryl-CoA Dehydrogenase*) está envolvido na degradação de BCAA. O gene *NPR1* (*Nonexpressor of PR Genes 1*) atua como um regulador essencial da SAR, sendo responsável por ativar genes relacionados à defesa da planta. O gene *EDS1* (*Enhanced Disease Susceptibility 1*) desempenha um papel fundamental na via de sinalização da SAR e na resistência mediada por genes R sendo, portanto, um componente essencial da resposta imune em plantas. O gene *LKR-SDH* (*Lysine-Ketoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase*) participa do metabolismo da lisina, podendo estar envolvido na regulação da resposta ao estresse. Já o gene *ICSI* (*Isochorismate Synthase 1*) é uma enzima chave na biossíntese de SA, essencial para a ativação dos mecanismos de defesa contra patógenos. A regulação desses genes pareceu ser afetada pelo WRKY45 (Figura 3). No entanto, os ensaios *in vivo* apresentaram padrões distintos, sugerindo diferenças na regulação da expressão gênica em condições experimentais.

NPR1 foi mais induzido nos mutantes de superexpressão de WRKY45 às 24 horas, assim como o gene *LKR-SDH* (Figura 12). No entanto, o pico de expressão de *NPR1* ocorreu às 48 horas no mutante *35S::WRKY45-4*, enquanto *LKR-SDH* se estabilizou entre os mutantes e Col-0 (Figura 12). Já o gene *ICSI* apresentou uma expressão mais atenuada no mutante *wrky45* (Figura 12). Portanto, os resultados sugerem que o fator de transcrição *WRKY45* exerce influência na defesa contra patógenos, possivelmente por meio da regulação de *NPR1*. Contudo, a atenuação da expressão de *ICSI* nos mutantes *wrky45* sugere que a regulação de *NPR1* possa ocorrer de forma independente do AS.

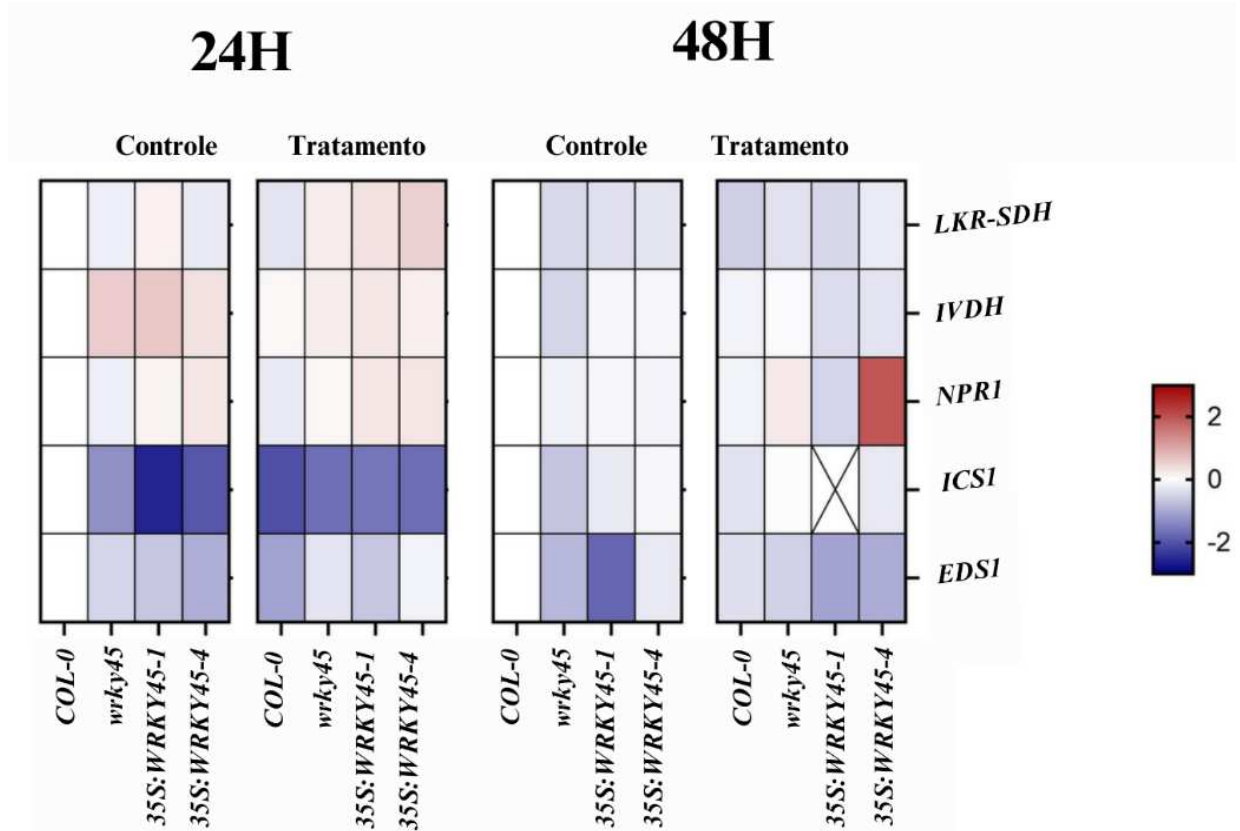


Figura 16: Níveis de transcritos de genes relacionados às vias de catabolismo de aminoácidos e à resposta imune em *Arabidopsis thaliana* (Col-0, wrky45, 35S::WRKY45-1, 35S::WRKY45-4) avaliados 24 e 48 horas após a inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Foram analisados os genes ICS1 (*Isocorismate Synthase 1*), EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*), NPR1 (*Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes 1*), LKR-SDH (*Lysine-Ketoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase*) e IVDH (*Isovaleryl-CoA Dehydrogenase*). Os dados foram normalizados em relação à média de Col-0 no controle de cada tempo experimental e ao gene de referência ACTIN. Os valores apresentados correspondem à média de três replicatas biológicas e estão expressos em escala \log_{10} .

DISCUSSÃO

Metabólitos primários como marcadores de defesa vegetal

Sabe-se que WRKY45 desempenha um papel significativo na senescência, promovendo a remobilização de nutrientes e ativando vias de catabolismo de aminoácidos para a geração de energia (Chen et al., 2017; Barros et al., 2022a). A morte celular programada (PCD) também desempenha uma função essencial na resposta das plantas a patógenos, atuando de forma coordenada com múltiplas funções de defesa, limitando a disseminação do agente infeccioso e fortalecendo a resistência vegetal (Greenberg et al., 1994). O aumento dos níveis endógenos de

AS é esperado tanto em resposta à infecção por patógenos quanto à aplicação exógena desse hormônio. Esse incremento induz modificações redox na proteína NPR1, promovendo sua ativação e participação na resposta imune vegetal (Zhao et al., 2024). Como consequência, são desencadeadas respostas de PCD, mediadas principalmente pela ação do H₂O₂ (Torres, Dangl e Jones, 2002) e SAR. Além disso, a aplicação de 1,5 mM de AS é capaz de induzir a produção de H₂O₂ (War et al., 2011). Portanto, é plausível sugerir que respostas similares sejam observadas em ambos os ensaios experimentais, considerando a sinalização metabólica associada.

A infecção por *P. syringae* está associada à senescência e ao amarelecimento foliar, afetando a funcionalidade do cloroplasto e processos metabólicos relacionados, como biossíntese de ácidos graxos, produção de carotenoides, biossíntese de clorofila e fixação de carbono (Antoni Garcia-Molina e Pastor, 2023). Notavelmente, o mutante *wrky45* apresentou uma menor eficiência máxima quântica do PSII em ambos os ensaios (Figura 6 e 13), indicando redução na eficiência fotossintética, um fator intrínseco ao genótipo. Este fenômeno foi associado a um aumento nos níveis de clorofila *a* e carotenoides (Figura 7), no ensaio com *P. syringae* indicando um possível efeito compensatório. No entanto, os pigmentos não foram afetados pela aplicação de AS em nenhum dos genótipos (Figura 7).

Metabólitos relacionados ao carbono e a pigmentos desempenham um papel central na resposta sustentada ao estresse, promovendo a ativação de vias de defesa (Garcia-Molina e Pastor, 2023). Plantas infectadas frequentemente compensam a perda de açúcares e aminoácidos por meio do aumento da assimilação de carbono e da mobilização de compostos e reservas de nitrogênio (Pankaj Barah et al., 2013). Essa dinâmica foi observada nos mutantes de superexpressão, que apresentaram um padrão de acúmulo de amido no tratamento com *P. syringae* pv *tomato* DC3000, após 24h (Figura 14), acompanhado pelo consumo de açúcares solúveis (Figura 14).

Interessantemente, o mutante *wrky45* apresentou um comportamento oposto, consumindo amido e elevando os níveis de açúcares solúveis, com um aumento mais pronunciado após 24h. Todavia, o mutante *35s::WRKY45-4* manteve níveis mais elevados de açúcares solúveis do que os demais genótipos (Figura 14).

A sacarose é um importante marcador de resposta de defesa e frequentemente se acumula para suprir a demanda energética e ativar vias de defesa (Ward et al., 2010). Assim, a

dinâmica de açúcares solúveis observada nos diferentes genótipos pode refletir estratégias distintas em resposta ao estresse biótico. O mutante *35s::WRKY45-4* demonstrou uma vantagem energética, sendo capaz de suprimir o crescimento bacteriano sem comprometer significativamente o crescimento vegetal.

O mutante *35s::WRKY45-4* apresenta uma expressão mais atenuada de *WRKY45*, em comparação com o *35S::WRKY45-1*. Ademais, o *35S::WRKY45-1* exibiu um florescimento prematuro em resposta à infecção por *P. syringae* pv. *Tomato* DC3000, devido a reciprocidade entre as vias de florescimento e defesa (Korves e Bergelson, 2003; Wang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012; Fabian *et al.*, 2023), possivelmente modificando seu metabolismo energético em relação ao outro mutante de superexpressão (Hedhly *et al.*, 2016).

No tratamento AS, os mutantes de superexpressão apresentaram níveis elevados de açúcares solúveis e amido, com variações ao longo do tempo, mas sem diferenças significativas entre controle e tratamento (Figura 5). Esse comportamento é compatível com um desenvolvimento normal, considerando que os níveis de compostos de carbono sofrem flutuações naturais (Stitt, *et al.*, 2010). As concentrações de proteínas totais permaneceram relativamente constantes entre os genótipos (Tabela Suplementar 1), exceto em *Col-0*, que apresentou concentrações mais elevadas após infecção por *P. syringae* pv. *Tomato* DC3000 (Figura 10A), associadas ao aumento nos níveis de aminoácidos totais (Figura 10B), um comportamento esperado na resposta a patógenos.

Em plantas mutantes *wrky45*, observou-se uma redução nos níveis de aminoácidos. Por outro lado, em *35s::WRKY45-1* observou-se um acúmulo significativo desses compostos 24 horas após a infecção por *P. syringae* pv. *Tomato* DC3000 (Figura 10E), sugerindo uma possível regulação diferencial do metabolismo nitrogenado associada à expressão de *WRKY45*. No entanto, os níveis de aminoácidos podem não ser um indicador eficiente da capacidade de defesa vegetal, considerando-se que um aumento específico em aminoácidos (e.g valina, leucina, isoleucina, treonina, alanina, fenilalanina, tirosina e glutamina) é esperado em resposta à infecção (Ward *et al.*, 2010). Com efeito, Liu *et al.* (2023) demonstraram que os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), especialmente a leucina, desempenham um papel crucial na defesa do arroz contra patógenos. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que o perfil qualitativo dos aminoácidos pode ser mais relevante para a resposta imune vegetal do que o teor total de aminoácidos.

O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) desempenha um papel central no metabolismo energético, conectando a respiração celular ao metabolismo de aminoácidos, assimilação de nitrogênio e síntese de metabólitos secundários (Sweetlove *et al.*, 2010a). Nas plantas, o acúmulo de malato pode estar associado à biossíntese elevada de um ou mais dos precursores do TCA (Casati *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 2011), fornecendo energia e blocos de construção para compostos de defesa (Levitt, 1980; Schaff *et al.*, 1995; Casati *et al.*, 1998; Rudrappa *et al.*, 2008). A infecção por DC3000 induziu mudanças nos níveis de malato e fumarato, indicando que o metabolismo de ácidos orgânicos é fundamental na resposta ao estresse biótico. No Col-0, o malato aumentou às 24 horas, enquanto no 35s::WRKY45-1 esse aumento ocorreu às 48 horas. Já no mutante *wrky45*, observou-se um consumo de malato, sugerindo que, na ausência de WRKY45, esse metabólito pode estar sendo rapidamente utilizado.

Os resultados sugerem que o WRKY45 desempenha um papel central na defesa contra patógenos, influenciando o metabolismo de carboidratos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos em resposta ao estresse biótico. O consumo de reservas de carboidratos no mutante *wrky45* 48 horas pós-infecção indica uma maior suscetibilidade desse genótipo à infecção bacteriana, reforçando a importância da proteína WRKY45 na regulação da resposta imune. Já a aplicação de AS não apresentou um padrão metabólico claro nos mutantes de superexpressão. No entanto, no *wrky45*, foi observada uma redução na eficiência F_v/F_m e nos níveis de açúcares solúveis, sugerindo uma indução precoce da senescência em resposta ao tratamento com 10 μ M de AS.

WRKY45 é capaz de suprimir o crescimento bacteriano

Diversos genes induzidos por patógenos codificam proteínas com funções regulatórias em vias de transdução de sinais, desempenhando um papel essencial nas respostas de defesa das plantas. A regulação desses genes é crucial para a defesa vegetal e, portanto, a elucidação dos mecanismos subjacentes pode auxiliar no entendimento das bases moleculares da resistência a doenças. A regulação transcricional da expressão gênica ocorre, em grande parte, por meio do reconhecimento específico de elementos *cis*-regulatórios e promotores por FT que se ligam ao DNA de forma sequência-específica (Dong, Chen e Chen, 2003).

Entre as diversas classes de FTs associados às respostas de defesa vegetal, destacam-se as proteínas WRKY, que contêm um domínio conservado WRKYGQK, seguido por um grupo

de ligação ao zinco do tipo Cys2His2 ou Cys2HisCys, essencial para sua função regulatória na resposta imune inicial (Eulgem, 1999; Eulgem *et al.*, 2000). Foi observado que, em resposta à infecção por *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* em Col-0, diversos genes WRKY do grupo III foram induzidos dentro de 24 horas pós-inoculação (Kalde *et al.*, 2003). Seguindo esse padrão, a análise da expressão de *WRKY45* revelou um aumento às 24h no tratamento (Figura 11), em concordância com os dados obtidos por análises *in silico* (Figura 3).

Interessantemente, ao observar a Figura 7, nota-se uma supressão do crescimento bacteriano em comparação com Col-0 nesse mesmo período, sugerindo a ativação de vias de defesa mais eficientes. A defesa mediada pelos FTs WRKY do grupo III apresenta sua função dependente de AS na transdução de sinal, sendo induzida pela aplicação desse fitormônio (Kalde *et al.*, 2003). Algumas proteínas centrais estão associadas à resposta imune mediada por AS. Neste contexto, a *EDS1* (*Enhanced Disease Susceptibility 1*) é uma lipase essencial associada à resposta de hipersensibilidade (HR) e desempenha um papel crucial na sinalização de defesa das plantas, sendo fundamental para a resistência mediada por genes *R* do tipo *TIR-NBS-LRR*. Sua interação com outras proteínas sinalizadoras, como *PAD4* e *SAG101*, contribui para a amplificação da resposta imune, reforçando a ativação de genes de defesa e limitando o crescimento de patógenos biotróficos (Parker *et al.*, 1996; Rietz *et al.*, 2011; Bernacki *et al.*, 2020). Outra enzima essencial na biossíntese de AS é *ICS1* (*ISOCHORISMATE SYNTHASE 1*), cuja regulação transcricional parece estar associada a FTs WRKY. A região promotora de *ICS1* é enriquecida com caixas *W*, sugerindo que esse gene seja um alvo potencial de regulação por WRKYs (Kalde *et al.*, 2003). No entanto, as identidades dos fatores WRKY específicos que controlam *ICS1* e *NPRI* ainda não são totalmente conhecidas (Kalde *et al.*, 2003).

Nos mutantes *35S::WRKY45*, observou-se uma indução mais elevada de *NPRI* após 24 horas, assim como em *LKR-SDH* (Figura 12). No entanto, o pico de expressão de *NPRI* ocorreu após 48 horas no mutante *35S::WRKY45-4*, enquanto *LKR-SDH* se estabilizou entre os mutantes e *Col-0* (Figura 12). Cumpre registrar também *ICS1* apresentou uma expressão reduzida nos mutantes *35S::WRKY45* (Figura 12). É plausível sugerir, portanto, que o FT *WRKY45* influencia a defesa contra patógenos, possivelmente por meio da regulação de *NPRI* através do fitormônio derivado de L-Lys ácido N-hidroxipipecólico (NHP) (Yildiz *et al.*, 2021; Löwe *et al.*, 2023)

No entanto, a atenuação da expressão de *ICS1* nos mutantes T-DNA *wrky45* sugere que a modulação de *NPRI* possa ocorrer independentemente do AS. Apesar da regulação dependente de AS observada em alguns membros do grupo III, os genes *AtWRKY30* e

AtWRKY55 não foram induzidos após a aplicação exógena com AS, indicando que nem todos os WRKYs desse grupo respondem diretamente a esse sinalizador (Kalde *et al.*, 2003). Registre-se, contudo, que *ICSI* foi induzida nos mutantes *T-DNA*, sugerindo uma potencial autorregulação envolvendo outros FTs WRKY.

Uma característica marcante da rede de sinalização WRKY é a sua autorregulação e a regulação cruzada envolvendo diferentes membros da família. Neste contexto, os FTs WRKY podem interagir com seus próprios promotores e com os de outros WRKYs, promovendo um controle dinâmico da expressão gênica (Eulgem *et al.*, 2000; Rushton *et al.*, 2010).

CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos demonstraram que WRKY45 desempenha um papel central na regulação do metabolismo de carboidratos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos em resposta à infecção por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. O consumo diferencial de amido e a dinâmica de açúcares solúveis observados nos genótipos analisados sugerem que a expressão de *WRKY45* influencia diretamente a alocação de recursos energéticos durante a infecção, conferindo uma vantagem adaptativa às plantas que superexpressam esse fator de transcrição. Com efeito, a ativação diferencial da sinalização de NPR1, de forma independente de AS, indica que WRKY45 desempenha um papel central na resposta de defesa, possivelmente por meio de vias regulatórias alternativas mediadas pela Lisina.

A regulação transcricional mediada por WRKY45 envolve uma interação complexa com outros membros da família WRKY, bem como com vias de sinalização clássicas da defesa vegetal. Assim, a supressão do crescimento bacteriano em plantas que superexpressam WRKY45 reforça a ideia de sua atuação como um regulador central da resposta imune, modulando a ativação de genes envolvidos tanto na imunidade ativada por padrões (PTI) quanto na imunidade ativada por efetores (ETI). Coletivamente, os resultados aqui obtidos contribuem para uma melhor compreensão do papel de WRKY45 na regulação da resposta imune e na adaptação metabólica ao estresse biótico por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, fornecendo informações relevantes para estratégias futuras com vistas a melhoria da resistência vegetal a patógenos.

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, Y. K. *et al.* Plant phenolics: neglected secondary metabolites in plant stress tolerance. **Brazilian Journal of Botany**, v. 47, n. 3, p. 703–721, 2 nov. 2023.
- ANDRZEJ BAJGUZ; ALICJA PIOTROWSKA-NICZYPORUK. Biosynthetic Pathways of Hormones in Plants. **Metabolites**, v. 13, n. 8, p. 884–884, 25 jul. 2023.
- ANGELOVICI, R. *et al.* Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 4, p. 211–218, 1 abr. 2010.
- ANTONI GARCIA-MOLINA; PASTOR, V. Systemic analysis of metabolome reconfiguration in *Arabidopsis* after abiotic stressors uncovers metabolites that modulate defense against pathogens. **Plant Communications**, v. 5, n. 1, p. 100645–100645, 4 jul. 2023.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* Identification of the 2-Hydroxyglutarate and Isovaleryl-CoA Dehydrogenases as Alternative Electron Donors Linking Lysine Catabolism to the Electron Transport Chain of *Arabidopsis* Mitochondria . v. 22, n. 5, p. 1549–1563, 1 maio 2010.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 9, p. 489–498, 1 set. 2011.
- BARROS, J. A. S. *et al.* The significance of WRKY45 transcription factor in metabolic adjustments during dark-induced leaf senescence. **Plant, Cell & Environment**, v. 45, n. 9, p. 2682–2695, 25 jul. 2022.
- BERNACKI, M. J. *et al.* EDS1-Dependent Cell Death and the Antioxidant System in *Arabidopsis* Leaves is Dereglated by the Mammalian Bax. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2454–2454, 10 nov. 2020.
- BOUREAU, T. *et al.* Localization of hrpA-induced *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 in infected tomato leaves. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 6, p. 451–460, 31 out. 2002.
- CAO, H. *et al.* The *Arabidopsis* NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 57–63, jan. 1997.
- CASATI, P. *et al.* UV-B, red and far-red light regulate induction of the C4 isoform of NADP-malic enzyme in etiolated maize seedlings. **Functional Plant Biology**, v. 25, n. 6, p. 701, 1998.
- CHEN, L. *et al.* *Arabidopsis* WRKY45 Interacts with the DELLA Protein RGL1 to Positively Regulate Age-Triggered Leaf Senescence. **Molecular Plant**, v. 10, n. 9, p. 1174–1189, set. 2017.
- CORREDOR-MORENO, P. *et al.* The branched-chain amino acid aminotransferase TaBCAT1 modulates amino acid metabolism and positively regulates wheat rust susceptibility. **The Plant Cell**, 5 fev. 2021.
- CUI, J. *et al.* Signals Involved in *Arabidopsis* Resistance to *Trichoplusia ni* Caterpillars Induced

by Virulent and Avirulent Strains of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Physiology**, v. 129, n. 2, p. 551–564, 1 jun. 2002.

DELANEY, T. P.; FRIEDRICH, L.; RYALS, J. A. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 14, p. 6602–6606, 3 jul. 1995.

DONG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z. **Plant Molecular Biology**, v. 51, n. 1, p. 21–37, 2003.

DONG, X. *et al.* Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. **The Plant Cell**, v. 3, n. 1, p. 61–72, 1 jan. 1991.

EULGEM, T. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 17, p. 4689–4699, 1 set. 1999.

EULGEM, T. *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 5, p. 199–206, maio 2000.

FABIAN, M. *et al.* The flowering time regulator FLK controls pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 191, n. 4, p. 2461–2474, 20 jan. 2023.

FEI, J. *et al.* An efficient protein extraction method applied to mangrove plant *Kandelia obovata* leaves for proteomic analysis. **Plant Methods**, v. 17, n. 1, 29 set. 2021.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 839–863, 29 abr. 2013.

GALILI, G. *et al.* The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 3 set. 2014.

GAO, X. *et al.* Bifurcation of Arabidopsis NLR Immune Signaling via Ca²⁺-Dependent Protein Kinases. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003127, 31 jan. 2013.

GIBON, Y. *et al.* A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in Arabidopsis Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness[W]. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3304–3325, 1 dez. 2004.

GOTO, S. *et al.* Development of disease-resistant rice by pathogen-responsive expression of WRKY45. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 4, p. 1127–1138, 8 out. 2015.

GREENBERG, J. T. *et al.* Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. **Cell**, v. 77, n. 4, p. 551–563, maio 1994.

GULLÌ, M. *et al.* A stress-related transcription factor belonging to the YL-1 family is differently regulated in durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 170, p. 307–315, jan. 2022.

GUO, P. *et al.* A Tripartite Amplification Loop Involving the Transcription Factor WRKY75, Salicylic Acid, and Reactive Oxygen Species Accelerates Leaf Senescence. **The Plant Cell**, v.

29, n. 11, p. 2854–2870, 23 out. 2017.

HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; KRUEGER, S. Amino acids – A life between metabolism and signaling. *v. 229, p. 225–237, 1 dez. 2014.*

HEDHLY, A. *et al.* Starch Turnover and Metabolism during Flower and Early Embryo Development. **Plant Physiology**, v. 172, n. 4, p. 2388–2402, 28 out. 2016.

HERBERT, R. B. **The Biosynthesis of Secondary Metabolites**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981.

HILDEBRANDT, T. M. *et al.* Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2 nov. 2015.

HUANG, W. *et al.* Biosynthesis and Regulation of Salicylic Acid and N-Hydroxypipicolinic Acid in Plant Immunity. **Molecular Plant**, v. 13, n. 1, p. 31–41, jan. 2020.

ISHIZAKI, K. *et al.* The Critical Role of Arabidopsis Electron-Transfer Flavoprotein:Ubiquinone Oxidoreductase during Dark-Induced Starvation. **The Plant Cell**, v. 17, n. 9, p. 2587–2600, 29 jul. 2005.

JIANG, J. *et al.* WRKY transcription factors in plant responses to stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 59, n. 2, p. 86–101, fev. 2017.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, nov. 2006.

JOSHI, R. *et al.* Overview of Methods for Assessing Salinity and Drought Tolerance of Transgenic Wheat Lines. **Methods in molecular biology**, p. 83–95, 1 jan. 2017.

KALDE, M. *et al.* Members of the Arabidopsis WRKY Group III Transcription Factors Are Part of Different Plant Defense Signaling Pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 4, p. 295–305, abr. 2003.

KORVES, T. M.; BERGELSON, J. A Developmental Response to Pathogen Infection in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 339–347, 1 set. 2003.

KRÜSSEL, L. *et al.* The Mitochondrial Sulfur Dioxygenase ETHYLMALONIC ENCEPHALOPATHY PROTEIN1 Is Required for Amino Acid Catabolism during Carbohydrate Starvation and Embryo Development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 92–104, 1 abr. 2014.

LAWTON, K. Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis Requires Salicylic Acid but Not Ethylene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 6, p. 863, 1995.

LEVITT, J. PRESS. **Responses of Plants to Environmental Stresses**. [s.l.] Academic Press., 1972.

LI, L. *et al.* The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 3, p. 329–338, mar. 2014.

- LI, S. *et al.* Transcriptomic Analysis Revealed Key Defense Genes and Signaling Pathways Mediated by the *Arabidopsis thaliana* Gene SAD2 in Response to Infection with *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 4229–4229, 20 fev. 2023.
- LIU, J. *et al.* The U-Box E3 Ligase SPL11/PUB13 Is a Convergence Point of Defense and Flowering Signaling in Plants. **Plant Physiology**, v. 160, n. 1, p. 28–37, 1 jun. 2012.
- LIU, X. *et al.* Phyllosphere microbiome induces host metabolic defence against rice false-smut disease. **Nature Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 1419–1433, 4 maio 2023.
- LÖWE, M. *et al.* N-hydroxypipelic acid primes plants for enhanced microbial pattern-induced responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 14 ago. 2023.
- MENG, C.; SUI, N. Overexpression of maize MYB-IF35 increases chilling tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 135, p. 167–173, 1 fev. 2019.
- MINE, A. *et al.* The Defense Phytohormone Signaling Network Enables Rapid, High-Amplitude Transcriptional Reprogramming during Effector-Triggered Immunity. **The Plant Cell**, v. 30, n. 6, p. 1199–1219, 23 maio 2018.
- MOU, Z.; FAN, W.; DONG, X. Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. **Cell**, v. 113, n. 7, p. 935–944, jun. 2003.
- NAIR, A. *et al.* N-hydroxypipelic acid-induced transcription requires the salicylic acid signaling pathway at basal SA levels. **Plant physiology (Bethesda)**, v. 187, n. 4, p. 2803–2819, 16 set. 2021.
- NEINAST, M.; MURASHIGE, D.; ARANY, Z. Branched Chain Amino Acids. **Annual review of physiology**, v. 81, p. 139–164, 10 fev. 2019.
- PANKAJ BARAH *et al.* Molecular Signatures in *Arabidopsis thaliana* in Response to Insect Attack and Bacterial Infection. v. 8, n. 3, p. e58987–e58987, 25 mar. 2013.
- PARKER, J. E. *et al.* Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. v. 8, n. 11, p. 2033–2046, 1 nov. 1996.
- POMBO, M. A. *et al.* Use of RNA-seq data to identify and validate RT-qPCR reference genes for studying the tomato-*Pseudomonas* pathosystem. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 20 mar. 2017.
- PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384–394, ago. 1989.
- RAMOS, R. N. *et al.* Loss-of-function mutations in WRKY22 and WRKY25 impair stomatal-mediated immunity and PTI and ETI responses against *Pseudomonas syringae* pv. tomato.

Plant molecular biology, v. 112, n. 3, p. 161–177, 24 maio 2023.

RIETZ, S. *et al.* Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in Arabidopsis immunity. **New Phytologist**, v. 191, n. 1, p. 107–119, 17 mar. 2011.

RUDRAPPA, T. *et al.* Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1547–1556, 26 set. 2008.

RUSHTON, P. J. *et al.* WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 5, p. 247–258, 1 maio 2010.

SALEM, M. A. *et al.* Protocol: a fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. **Plant Methods**, v. 12, n. 1, 10 nov. 2016.

SAVARY, S. *et al.* The Global Burden of Pathogens and Pests on Major Food Crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 4 fev. 2019.

SCHAAF, J.; WALTER, M. H.; HESS, D. Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues). **Plant Physiology**, v. 108, n. 3, p. 949–960, 1 jul. 1995.

SCHWESSINGER, B.; RONALD, P. C. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 451–482, 2 jun. 2012.

STITT, M.; LUNN, J.; USADEL, B. Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - more than the icing on the cake. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 1067–1091, mar. 2010.

SU, Y. *et al.* Dynamic metabolites: A bridge between plants and microbes. **Science of The Total Environment**, v. 899, p. 165612–165612, 1 nov. 2023.

SWEETLOVE, L. J. *et al.* Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 8, p. 462–470, ago. 2010.

TAN, W. *et al.* Soil bacterial diversity correlates with precipitation and soil pH in long-term maize cropping systems. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 7 abr. 2020.

THIAGO ALVES NAPOLEÃO *et al.* Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. **Plant science**, v. 263, p. 46–54, 1 out. 2017a.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 517–522, 8 jan. 2002.

TZIN, V. *et al.* Expression of a bacterial bi-functional chorismate mutase/prephenate dehydratase modulates primary and secondary metabolism associated with aromatic amino

acids in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 60, n. 1, p. 156–167, out. 2009.

VERK, M. C. VAN; BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. WRKY Transcription Factors Involved in Activation of SA Biosynthesis Genes. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 89, 2011.

WANG, W. *et al.* New insights into the metabolism of aspartate-family amino acids in plant seeds. **Plant reproduction**, v. 31, n. 3, p. 203–211, 5 fev. 2018.

WANG, Y.-S. *et al.* Rice XA21 Binding Protein 3 Is a Ubiquitin Ligase Required for Full Xa21-Mediated Disease Resistance. **The Plant Cell**, v. 18, n. 12, p. 3635–3646, dez. 2006.

WANI, S. H. *et al.* WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 7, p. 1071–1085, 15 abr. 2021.

WAR, A. R. *et al.* Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum*L.). **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1787–1792, nov. 2011.

WARD, J. L. *et al.* The metabolic transition during disease following infection of Arabidopsis thaliana by Pseudomonas syringae pv. tomato. **The Plant Journal**, v. 63, n. 3, p. 443–457, 18 maio 2010.

XIN, X.-F.; HE, S. Y. Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 473–498, 4 ago. 2013.

YALPANI, N. *et al.* Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. **The Plant Cell**, v. 3, n. 8, p. 809–818, ago. 1991.

YAO, J.; WITHERS, J.; SHENG YANG HE. Pseudomonas syringae Infection Assays in Arabidopsis. **Methods in molecular biology**, p. 63–81, 1 jan. 2013.

YILDIZ, I. *et al.* The mobile SAR signal N-hydroxypipercolic acid induces NPR1-dependent transcriptional reprogramming and immune priming. **Plant Physiology**, v. 186, n. 3, p. 1679–1705, 19 abr. 2021.

ZAVALIEV, R.; DONG, X. NPR1, a key immune regulator for plant survival under biotic and abiotic stresses. **Molecular cell**, v. 84, n. 1, p. 131–141, 1 jan. 2024.

ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085–2103, 17 maio 2013.

ZHAO, S. *et al.* Enhancement of broad-spectrum disease resistance in wheat through key genes involved in systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 23 fev. 2024.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 353–360, ago. 2005.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Genótipos	0h	24h	48h
Col-0	b	b	a
<i>wrky45</i>	a	a	b
<i>35S::WRKY45-1</i>	b	c	c
<i>35S::WRKY45-4</i>	b	c	c

Tabela 1: Dados estatísticos da curva de crescimento bacteriano 0h, 24h e 48h após a inoculação da bactéria DC3000. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

CONTROLE

EDS1				
Genótipos	24h	<i>p</i>	48h	<i>p</i>
Col-0	0.1006982 a	0.4511686	0.05669278 a	0.1034224
<i>wrky45</i>	0.4998732 a		0.18655679 a	
<i>35S::WRKY45-1</i>	0.3957598 a		0.04703815 a	
<i>35S::WRKY45-4</i>	0.2007772 a		0.88683513 a	

ICS1				
Genótipos	24h	<i>p</i>	48h	<i>p</i>
Col-0	0.02426314 a	0.6493734	0.03132003 a	0.3139428
<i>wrky45</i>	0.06627003 a		0.23920199 a	
<i>35S::WRKY45-1</i>	0.03687165 a		1.16720902 a	
<i>35S::WRKY45-4</i>	0.02651686 a		0.80831082 a	

npr1				
Genótipos	24h	<i>p</i>	48h	<i>p</i>
<i>WT</i>	0.5000696 a	0.5806987	0.5637404 a	0.4886952
<i>WRKY45</i>	1.9205161 a		0.7460229 a	
<i>ox1</i>	1.8023774 a		1.5121839 a	
<i>ox4</i>	2.0605243 a		1.6456868 a	

ivdh				
Genótipos	24h	<i>p</i>	48h	<i>p</i>

<i>WT</i>	0.04314652	a	0.3926842	0.07352879	a	0.09922452
<i>WRKY45</i>	3.97112456	a		0.38305833	a	
<i>ox1</i>	9.02652861	a		0.96181263	a	
<i>ox4</i>	2.47557106	a		0.89210569	a	

lkrsdh						
Genótipos	24h		<i>p</i>	48h		<i>p</i>
<i>WT</i>	0.0005079855	a	0.2450626	0.001877518	a	0.06783629
<i>WRKY45</i>	0.9121060657	a		0.447488731	a	
<i>ox1</i>	1.3334325837	a		0.424593024	a	
<i>ox4</i>	1.1201613508	a		0.506538827	a	

Dados - Tratamento

EDS1						
Genótipos	24h		<i>p</i>	48h		<i>p</i>
<i>WT</i>	0.1286437	a	0.3865093	0.7471239	a	0.6606607
<i>WRKY45</i>	0.6793351	a		0.3103296	a	
<i>ox1</i>	0.4767451	a		0.1697946	a	
<i>ox4</i>	0.8140292	a		0.6184654	a	

ICS1						
Genótipos	24h		<i>p</i>	48h		<i>p</i>
<i>Col-0</i>	0.01386254	a	0.7319985	0.5233873	ab	0.03180701
<i>wrky45</i>	0.02571923	a		0.9413309	a	
<i>35S::WRKY45-1</i>	0.02789887	a		0.0000000	b	
<i>35S::WRKY45-4</i>	0.02099663	a		0.7611333	ab	

npr1						
Genótipos	24h		<i>p</i>	48h		<i>p</i>
<i>WT</i>	0.5777838	b	0.01573807	0.8104147	b	0.01052677
<i>WRKY45</i>	1.2877784	ab		1.9433072	b	
<i>ox1</i>	1.9390298	a		0.4205626	b	
<i>ox4</i>	2.0952701	a		189.9630616	a	

ivdh						
Genótipos	24h		<i>p</i>	48h		<i>p</i>
<i>Col-0</i>	1.325248	a	0.7164787	0.7211417	a	0.5658329
<i>wrky45</i>	1.611807	a		0.9362595	a	

<i>35S::WRKY45-1</i>	1.958252	a		0.4532892	a
<i>35S::WRKY45-4</i>	1.906580	a		0.9539077	a

lkrsdh				
Genótipos	24h		48h	<i>p</i>
Col-0	0.6048894	b	0.3354079	a
<i>wrky45</i>	1.6567045	b	0.5210086	a
<i>35S::WRKY45-1</i>	2.3114839	ab	0.3812299	a
<i>35S::WRKY45-4</i>	3.6507480	a	0.6231404	a
				0.006054182
				0.5928533

Tabela 5: Níveis de transcritos de genes relacionados às vias de catabolismo de aminoácidos e à resposta imune mediada pelo ácido salicílico (AS)- *ICS1*-(*isocorismato sintase 1*); *EDSI* (*Enhanced Disease Susceptibility 1*); *NPR1* (*Nonexpressor de Pathogenesis-Related Genes 1*); *LKR-SDH* (*Lysine-Ketoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase*); *IVDH* (*Isovaleryl-CoA Dehydrogenase*)- avaliados em 24h e 48h após inoculação de *P. syringae*. Os dados foram normalizados em relação à média de Col-0 no controle de cada tempo. Os valores apresentados correspondem à média de três repetições biológicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).