



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA CASSANO MONTE BELLO

**A IMPORTÂNCIA DA VIA “TARGET OF RAPAMYCIN” (TOR) NA REGULAÇÃO DO
METABOLISMO PRIMÁRIO VEGETAL AO LONGO DO CICLO DIUTURNO**

THE ROLE OF THE “TARGET OF RAPAMYCIN” (TOR) PATHWAY IN CONTROLLING PLANT
PRIMARY METABOLISM ALONG THE DIEL CYCLE

CAMPINAS

2018

CAROLINA CASSANO MONTE BELLO

**A IMPORTÂNCIA DA VIA “TARGET OF RAPAMYCIN” (TOR) NA REGULAÇÃO DO
METABOLISMO PRIMÁRIO VEGETAL AO LONGO DO CICLO DIUTURNO**

**THE ROLE OF THE “TARGET OF RAPAMYCIN” (TOR) PATHWAY IN CONTROLLING PLANT
PRIMARY METABOLISM ALONG THE DIEL CYCLE**

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Genética e Biologia
Molecular, na Área de Genética
Vegetal e Melhoramento.*

*Thesis presented to the Institute of
Biology of the University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of PhD
in Genetics and Molecular Biology, in
the area of Plant Genetics and
Breeding.*

Este arquivo digital corresponde à versão
final da tese defendida pela aluna Carolina
Cassano Monte Bello e orientada pela Dra.
Camila Caldana.

Orientadora: Dra. Camila Caldana

Co-Orientadora: Dra. Marina Câmara Mattos Martins Soldi

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/10407-3
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0866-043>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M764i Monte-Bello, Carolina Cassano, 1987-
A importância da via "*target of rapamycin*" (TOR) na regulação do metabolismo primário vegetal ao longo do ciclo diurno / Carolina Cassano Monte Bello. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Camila Caldana.
Coorientador: Marina Câmara Mattos Martins Soldi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Crescimento (Plantas). 2. Plantas - Metabolismo. 3. Amido. 4. *Arabidopsis thaliana*. 5. Serina-treonina quinases TOR. I. Caldana, Camila. II. Martins, Marina Câmara Mattos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of the "target of rapamycin" (TOR) pathway in controlling plant primary metabolism along the diel cycle

Palavras-chave em inglês:

Growth (Plants)

Plants - Metabolism

Starch

Arabidopsis thaliana

TOR serine threonine kinases

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Michel Georges Albert Vincentz

Marcelo Menossi Teixeira

Danilo da Cruz Centeno

Willian Tadeu Lara Festuccia

Sandra Martha Gomes Dias

Data de defesa: 08-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 08 de agosto de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Prof. Dr. Danilo da Cruz Centeno

Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia

Profa. Dra. Sandra Martha Gomes Dias

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico esta tese à minha amada família, aos meus pais José Eduardo e Sandra, meu irmão Henrique e ao meu marido Luís Ricardo. Ao mesmo tempo, estendo esta dedicatória a minha orientadora Dra. Camila e coorientadora Dra. Marina a quem devo a confiança em meu trabalho e por podermos concluir juntas a primeira tese do nosso grupo.

AGRADECIMENTOS

Apesar de existir numa tese uma parte desafiadora e solitária de estudos, construção de pensamentos e experimentos a que estamos destinados, ela não existiria sem a contribuição de muitas pessoas. Desde o início do doutorado, pude contar com pessoas que contribuíram de diferentes maneiras, sem as quais esta tese não teria sido possível. Será difícil incluir todos nessa lista, mas sou grata a todos vocês.

Agradeço primeiramente à Deus que iluminou meu caminho durante esta caminhada e aos meus pais, meus exemplos e principais responsáveis pela minha vida, e a quem devo meu caráter, educação e disciplina. Se vocês não acreditassem em mim eu não chegaria aqui. Ao meu irmão a quem sempre tento mostrar meu melhor, pois acredito que devo cuidar e ser exemplo de pessoa e profissional. Ao meu amado marido Luis Ricardo Sarti (lindo rs), meu conforto, que sempre me alegrou, ajudou, foi paciente e esteve comigo em meus momentos de desânimo, falta de estímulo e de comemorações. Você não tem ideia de como seu abraço me dá força e energia para continuar em frente. Obrigada a toda minha família por me apoiarem com muito amor. Amo todos vocês!

Agradeço também à UNICAMP e ao CTBE pela oportunidade de realizar o doutorado. À agência de fomento FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2014/10407-3) e apoio financeiro para a realização desta pesquisa. À Dra. Camila Caldana pela orientação, preparo para a vida acadêmica e por confiar no meu trabalho. E à Dra. Marina Câmara Mattos Martins Soldi pela co-orientação e pelos ensinamentos para a execução dos experimentos e todos os momentos de discussão de resultados e por responder minhas perguntas. Acredito que esses 4 anos foram de muito aprendizado para nós 3 embarcando num mundo novo repleto de dificuldade, mas acima de tudo, de muito conhecimento e superação. Espero que assim como eu, vocês também acreditem que tenha valido todo esforço. Muito obrigada também a banca examinadora, pelo aceite do convite e pelas sugestões.

Obrigada ao professor Dr. Adriano Nunes-Nesi por me receber em seu laboratório e me orientar no meu primeiro contato com análise de fluxo metabólico em Viçosa. Obrigada aos pesquisadores Dr. Lothar Willmitzer por me acolher em seu grupo durante meu estágio no Instituto Max Planck e ao Dr. Toshihiro Obata pelos ensinamentos com análise de fluxo no mesmo instituto. Obrigada ao Dr. John Lunn pela colaboração através de discussões e sugestões referente aos açúcares e principalmente pela gentileza de realizar os ensaios de cromatografia líquida juntamente com a Regina Feil responsável por todo processo de análise. “Danke Regina”. Agradeço também ao pesquisador Dr. Christian Meyer pela colaboração e discussão na área da via TOR, e por nos ceder alguns anticorpos para serem testados no decorrer do trabalho.

Muito obrigada a todos os membros do grupo de Fisiologia Molecular de Plantas do CTBE por toda a ajuda quase diária na execução dos serviços de laboratório. Obrigada Maurício por me contagiar com sua alegria diária, e por estar ao meu lado nos obstáculos encontrados em nossos experimentos preliminares. Obrigada Vivi pela amizade e por compartilhar comigo a emoção e dificuldades do nosso intercâmbio internacional. Obrigada

Maju pela parceria no último ano. E um agradecimento especial aos meus mais que parceiros de laboratório, Valéria e Elias, pela imensa ajuda nas intermináveis montagens de experimentos e noites em claro devido as coletas noturnas. Obrigada principalmente pela amizade, risadas e momentos de conforto quando tudo não dava certo. Obrigada Val pelos conselhos e ensinamentos no laboratório. Estão todos anotados em meu caderninho. Obrigada Elias por toda parceria no laboratório, nos estudos e por me acolher em Viçosa.

Agradeço também minhas amigas da república “Lakukaratcha”, em especial à Nádia e Gabriela pelas infindáveis conversas compartilhando as experiências da pós-graduação e da vida, e momentos de muitas risadas, alegrias e dificuldades. Agradeço imensamente aos mais que professores e amigos da academia Cinética fitness por devolverem minha energia e garantirem minha alegria quase todas as noites. Muito obrigada!

“Seja mais forte que a sua melhor desculpa”

RESUMO

O crescimento e o desenvolvimento vegetal são mantidos por uma complexa rede controlada por fatores ambientais incluindo a disponibilidade de nutrientes, água e luz, e por diversas vias de sinalização que interagem entre si. Uma das principais vias que exerce papel fundamental na regulação do crescimento celular em eucariotos é a quinase “Target Of Rapamycin” (TOR). Em plantas, várias linhas de evidência apontam que a TOR desempenha uma função crucial no balanço entre carbono e nitrogênio, atuando como um regulador do metabolismo central controlando o crescimento e a produção de biomassa. Apesar disso, pouco se conhece sobre seu modo de ação em plantas. Para investigar a participação da TOR no controle do metabolismo, plântulas de *Arabidopsis thaliana* em fase inicial de desenvolvimento receberam tratamento com o inibidor químico da TOR, AZD-8055, e foram analisadas através de perfis metabólicos em larga escala (GC-TOF-MS e LC-MS/MS) combinados com análises enzimáticas ao longo do ciclo diurno. As respostas metabólicas da inibição dessa via a curto prazo ampliaram as evidências de uma forte regulação do metabolismo primário. A repressão desta via em períodos específicos do ciclo diurno permitiu elucidar que o fenótipo de acúmulo de amido ocorre graças à redução da degradação em períodos definidos do dia (primeiras e últimas horas de luz). Por outro lado, os baixos teores de sacarose não permitem comprovar que a inibição do complexo TOR apenas leve à diminuição da demanda de carbono para o crescimento. Ao contrário, a repressão desta via desacopla a percepção e sinalização de açúcares, indicando que o complexo TOR não apenas é afetado pelos níveis destes metabólitos, mas também atua em sua regulação. Um exemplo é a quebra da sólida relação entre sacarose e seu açúcar sinalizador trealose-6-fosfato (Tre6P) por mecanismo ainda não elucidado. Os resultados obtidos nessa tese expõem pela primeira vez a interação entre TOR e Tre6P, indicando um papel importante desta via em perceber os níveis de nutrientes para ajustar o crescimento vegetal.

ABSTRACT

Plant growth and development are maintained by a complex network controlled by environmental factors including the availability of nutrients, water and light, and by several signaling pathways that interact with each other. One of the most important pathways that plays a key role in regulating cell growth in eukaryotes is the kinase "Target of Rapamycin" (TOR). In plants, several lines of evidence point out that TOR has a crucial function in carbon and nitrogen balance, acting as a regulator of central metabolism controlling growth and biomass production. However, knowledge about its mode of action is limited in plants. To investigate the contribution of TOR to the control of metabolism, seedlings of *Arabidopsis thaliana* in the early-stage of development were treated with the chemical inhibitor of TOR, AZD-8055, and analyzed using large-scale MS-based metabolite profiling (GC-TOF-MS and LC-MS/MS) in combination with enzymatic assays during the diurnal cycle. Short-term metabolic responses to the inhibition of this pathway have provided further evidences for a strong regulation of primary metabolism. TOR repression in specific periods of the diel cycle made it possible to elucidate that the starch excess phenotype occurs due to reduced starch degradation in particular periods of the day (first and last hours of light). On the other hand, the low levels of sucrose could not confirm that inhibition of TOR complex leads simply to a reduction in carbon demand for growth. Conversely, repression of this pathway uncouples sugar sensing and signaling, indicating that TOR complex is not only affected by the levels of these metabolites, but also play a role on their regulation. One example is the breakage of the solid correlation between sucrose and the signal molecule trehalose-6-phosphate (Tre6P) by an unknown mechanism. The results obtained in this thesis expose for the first time the interaction between TOR and Tre6P pointing out an important role of this pathway to sense nutrient levels in order to adjust plant growth.

Sumário

1. Introdução	12
1.1. A regulação do crescimento vegetal e a produção de biomassa	12
1.2. Biossíntese de biomassa	14
1.3. Partição de C para o crescimento	18
1.4. Regulação da partição de C	19
1.5. O complexo TOR	23
1.6. Alvos conservados da TOR	26
1.7. O complexo TOR em plantas, um regulador central do crescimento e do metabolismo	29
1.8. Alvos cascata abaixo da TOR em plantas	31
1.9. O controle do TORC no metabolismo e crescimento (biossíntese de biomassa)	34
1.10. Novos inibidores químicos como ferramenta para identificação de alvos diretos da TOR	36
1.2. Objetivo desta tese	37
2. Material e Métodos	39
2.1 Reagentes	39
2.2. Material vegetal	39
2.3. Condições padrão de cultivo de plântulas	39
2.3.1. Esterilização de sementes	39
2.3.2. Condições para aplicação de tratamentos	39
2.4. Análises metabólicas	40
2.4.1. Soluções de uso	40
2.4.2. Extração e quantificação de metabólitos primários por cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas	40
2.4.3. Extração e quantificação de açúcares fosforilados para análise de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS)	42
2.5. Estimativa de taxa de respiração	43
2.5.1 Quantificação da emissão de CO ₂	43
2.6. Análises de conteúdo de amido	43
2.6.1. Teor qualitativo de amido	43
2.6.2. Teor quantitativo de amido – Análise enzimática	43
2.7. Ensaio da atividade catalítica máxima da enzima AGPase	44
2.8. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo	45
2.9. Imunodeteção de proteínas	46
2.9.1. Extração de proteínas totais	46
2.10. Análise dos Resultados	46

3. A Flexible Low-Cost Hydroponic Growth System for Assessing Plant Responses to Small Molecules in Sterile Conditions	48
4. Efeito da inibição da TOR por AZD-8055 no metabolismo primário de plântulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
4.1. Introdução	64
4.2. Resultados e discussão	66
4.3. Considerações finais	77
5. A inibição do TORC desacopla a sinalização de açúcar e a partição de carbono em plântulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
5.1. Introdução	79
5.2. Resultados e discussão	81
5.2.1. Inibição do TORC por AZD-8055 em plântulas de <i>Arabidopsis</i> resulta no aumento do conteúdo de amido dependente de luz	81
5.2.2. A inibição do TORC não afeta a síntese de amido mediada pela AGPase	84
5.2.3. A redução do crescimento pela inibição do TORC parece ocorrer por uma partição inapropriada de C	85
5.2.4. A inibição do TORC prejudica o sensoriamento do <i>status</i> de C	90
5.2.4. Inibição do TORC resulta em menor degradação de amido durante o período de luz	92
5.2.3. A inibição da TOR desacopla o sensoriamento de açúcares através da quebra do nexus Tre6P: sacarose	95
5.3. Considerações finais	99
6. Discussão geral	100
6.1. A versatilidade do sistema hidropônico para estudar respostas fisiológicas frente aplicação de tratamentos químicos	100
6.2. AsTORi uma ferramenta para investigar respostas metabólicas primárias do TORC	102
6.3. TORC regula a degradação de amido durante o período de luz para sustentar o crescimento, a partição e a translocação de C	104
6.4. A inibição do TORC desacopla a sinalização de açúcares	106
6.5. A Tre6P inibe a degradação de amido durante o período de luz	107
7. Referências	108
8. Apêndices	129
9. Anexos	145
9.1. Declaração de bioética e biossegurança	145
9.2. Declaração de direitos autorais	146

1. Introdução

1.1. A regulação do crescimento vegetal e a produção de biomassa

O crescimento vegetal depende da ação combinada da disponibilidade de recursos ambientais (luz, água e nutrientes) e uma complexa rede de sinalização que controla entre outros processos, a alocação de carbono (C) e o crescimento de células e órgãos através da interação entre metabolismo e programas celulares (GONZALEZ; VANHAEREN; INZÉ, 2012; POORTER; NAGEL, 2000). Devido a seu estilo de vida sésil, as plantas são capazes de se adaptar continuamente às variações ambientais para otimizar seu crescimento (GONZALEZ; VANHAEREN; INZÉ, 2012; POWELL; LENHARD, 2012). Em geral, há dois processos principais envolvidos no crescimento vegetal: biossíntese de biomassa (crescimento estrutural) e expansão celular (crescimento expansivo) (GONZALEZ; VANHAEREN; INZÉ, 2012; IVAKOV et al., 2017; PANTIN; SIMONNEAU; MULLER, 2012). Enquanto a biossíntese de biomassa é controlada pelo fornecimento intracelular de C, essencial para a construção de novas estruturas celulares e produção de fotoassimilados para os mecanismos energéticos (COSGROVE, 2015; IVAKOV et al., 2017; LASTDRAGER; HANSON; SMEEKENS, 2014), a expansão controlada pelo aumento de turgor é regulada por proteínas que afetam a extensibilidade da parede celular (COSGROVE, 2015).

A dinâmica do crescimento vegetal é controlada pelo aumento da evapotranspiração na luz, uma vez que a expansão exige um influxo massivo de água para os vacúolos, elevando o turgor celular (PANTIN et al., 2011; PANTIN; SIMONNEAU; MULLER, 2012). Desta forma, a disponibilidade de C, energia e água, são considerados os principais controladores da taxa de crescimento (ISHIHARA et al., 2015; KÖLLING et al., 2015; PANTIN et al., 2011; PANTIN; SIMONNEAU; MULLER, 2012; SULPICE et al., 2014) (**Figura 1.1**). Embora a taxa de expansão e o crescimento mudem à medida que o tecido se desenvolve, as plantas normalmente crescem ao longo do ciclo diuturno de acordo com a alocação de carboidratos (SULPICE et al., 2014; YAZDANBAKHS et al., 2011). Recentemente, foi mostrado que as taxas relativas de biossíntese de biomassa e expansão da parede celular ocorrem em períodos distintos do ciclo diuturno em *Arabidopsis* (APELT et al., 2015; ISHIHARA et al., 2015; IVAKOV et al., 2017). Interessantemente, a síntese de macromoléculas que constituem a biomassa estrutural da parede celular (celulose, hemicelulose, pectinas e proteínas) é maior no período de luz devido à grande disponibilidade de energia e C através da fotossíntese (ISHIHARA et al.,

2015; IVAKOV et al., 2017; SULPICE et al., 2014). No escuro, o crescimento biossintético é mais reduzido por ser dependente da mobilização de *pools* de reservas de C, como o amido sintetizado durante o dia (SULPICE et al., 2009). Além do crescimento, estas reservas também são utilizadas para processos de manutenção e reparo do metabolismo (ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2007). Em contraste, o crescimento por expansão é impulsionado pelo turgor principalmente durante a noite devido ao fechamento dos estômatos e consequente baixa na taxa de evapotranspiração, permitindo maior potencial hídrico nas células (APELT et al., 2015, 2017; PANTIN et al., 2011; PANTIN; SIMONNEAU; MULLER, 2012).

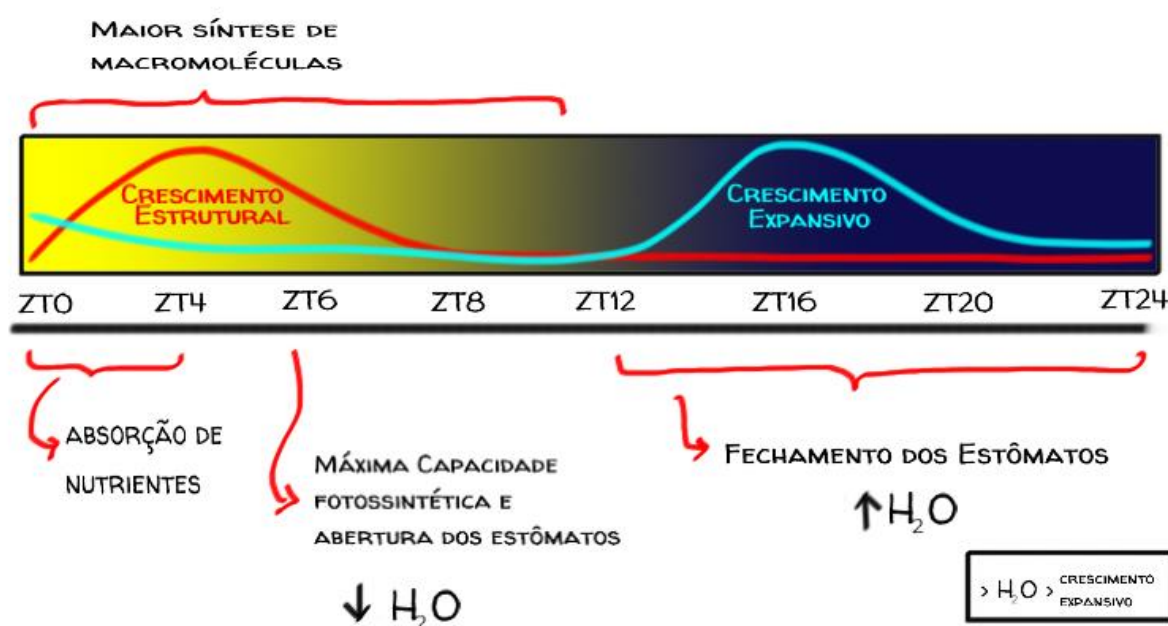


Figura 1.1. Dinâmica temporal e regulação do crescimento de plantas.

O crescimento biossintético ocorre predominantemente na luz quando a fotossíntese pode atender à exigência de energia e C necessária para esse processo. No escuro, o crescimento biossintético é muito baixo sendo dependente da quantidade de amido acumulado no período de luz e degradado à noite. Em contraste, o crescimento expansivo impulsionado pelo turgor celular predomina durante o período de escuro quando há menores taxas de evapotranspiração permitindo maior potencial hídrico.

A regulação da taxa de crescimento expansivo do hipocótilo é uma das principais funções do relógio circadiano nas plantas (NOZUE et al., 2007). O relógio circadiano é uma via de sinalização endógena que gera ritmos com períodos aproximados de 24 h mesmo em condições constantes de luz ou escuro e que pode ser sincronizado com estímulos ambientais sendo persistentes na ausência dos mesmos (DODD et al., 2014; GRAF; SMITH, 2011; SMITH; STITT, 2007; SULPICE et al., 2014). O relógio controla a expressão de fatores de transcrição promotores de crescimento do tipo *phytochrome interacting factor* (PIF) (DORNBUSCH et al.,

2014; MARTÍN et al., 2018; SEATON et al., 2015; SOY; LEIVAR; MONTE, 2014), que por sua vez induzem diretamente a expressão de uma rede de sinalização hormonal mediada por auxina, exercendo uma vantagem adaptativa às condições de sombreamento (HORNITSCHKE et al., 2012; NOZUE; HARMER; MALOOF, 2011). O efeito do relógio na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas com o afrouxamento da parede celular sugere que as expansinas são os alvos finais da regulação do crescimento expansivo regulado por esta via endógena (COSGROVE, 2015; IVAKOV et al., 2017).

1.2. Biossíntese de biomassa

A síntese de diversos componentes que possibilitam o acúmulo de biomassa é dependente da fixação de C pela fotossíntese. Durante este processo, ocorre uma transdução de energia com geração de ATP e poder redutor na forma de NADPH, que serão utilizados na biossíntese de carboidratos através do ciclo de Calvin-Benson (CBC) (**Figura 1.2**). A abertura dos estômatos permite a entrada de CO₂ atmosférico que precisa ser difundido até o cloroplasto das células do mesófilo, local no qual a enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RubisCO) catalisa o primeiro passo da fixação de C, incorporando o C do CO₂ ao receptor ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) e originando duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA) utilizadas para a formação de trioses-fosfato (triose-P). A maior parte das triose-P produzidas são usadas para regenerar RuBP no CBC após serem reduzidas a gliceraldeído-3-fosfato (G3P). Entretanto, elas também são utilizadas para a síntese de sacarose e amido, considerados os principais produtos finais da fotossíntese (STITT; SULPICE; KEURENTJES, 2010). Nos cloroplastos, as trioses-P formadas podem também ser interconvertidas a fosfoenolpiruvato (PEP) e piruvato no citosol através da glicólise. PEP é também substrato da enzima PEP carboxilase, responsável por catalisar a reação anaplerótica de síntese de oxaloacetato para reabastecer intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), enquanto o piruvato pode entrar diretamente na mitocôndria e ser usado pelo ciclo do TCA para a síntese de ácidos orgânicos e aminoácidos (PLAXTON; PODESTÁ, 2006; SZECOWKA et al., 2013).

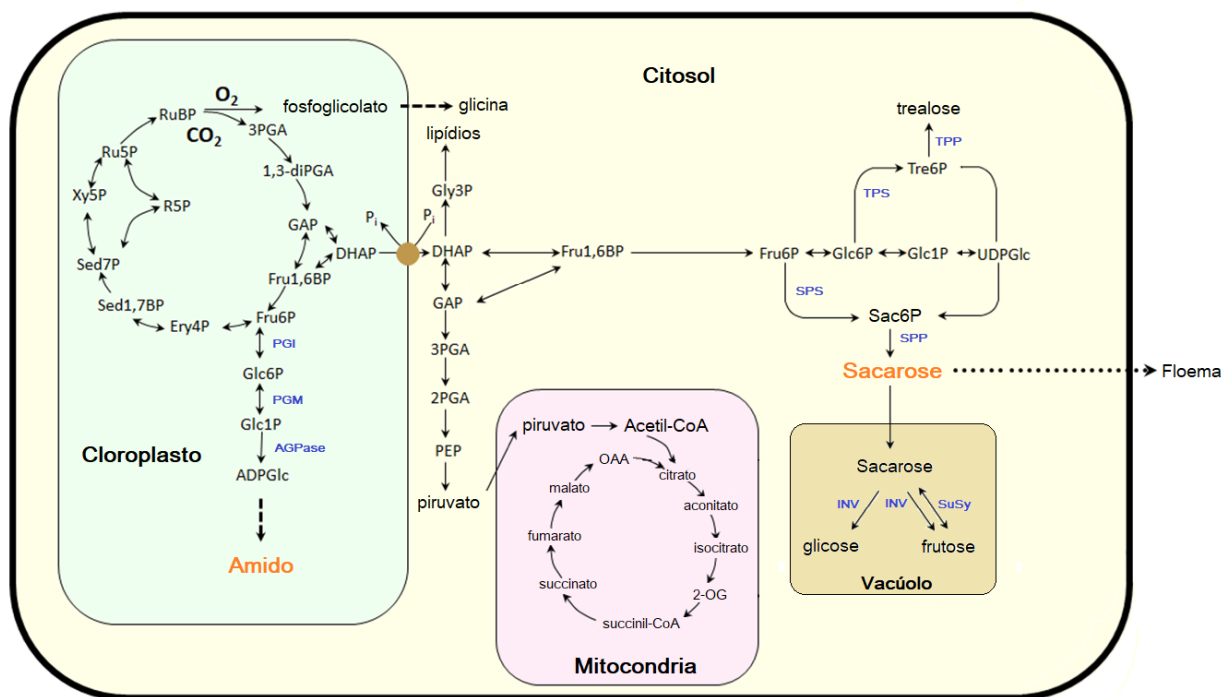


Figura 1.2. Esquema da via de síntese de amido e sacarose.

O C assimilado via ciclo de Calvin-Benson é direcionado para a síntese de sacarose no citosol e síntese de amido no cloroplasto. Adaptado de Stitt et al., (2010).

A síntese de sacarose é mediada pela exportação de triose-P do cloroplasto para o citosol em troca de ortofosfato inorgânico (Pi) através do translocador de triose-P: fosfato localizado na membrana interna do cloroplasto. Os reguladores chaves deste processo são as enzimas frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase) (CHO et al., 2012; DAIE, 1993; LEE et al., 2008) e sacarose fosfato sintase (SPS) (RUFTY; HUBER, 1983). No citosol, as triose-P são condensadas pela aldolase para formar frutose-1,6-bisfosfato (FBP), que é desfosforilada pela enzima frutose-1,6-bisfosfato (FBPase), convertendo em hexoses fosfato (hexose-P) no citosol (LUNN, 2016). A sacarose fosfato sintase (SPS) catalisa a reação reversível de transferência da porção glucosil da uridina difosfato glicose (UDPGlc) para a frutose-6-fosfato (Fru6P) produzindo sacarose-6-fosfato (Sac6P), que é então hidrolisada pela sacarose fosfato fosfatase (SPP) tornando a síntese global de sacarose essencialmente irreversível (LUNN; AP REES, 1990). Experimentos recentes sugerem a existência de uma associação entre essas duas enzimas formando um complexo multiproteico (MALONEY et al., 2015). Primeiramente, a sacarose pode ser utilizada diretamente pela glicólise ou translocada através do floema como a forma mais abundante de carboidrato solúvel podendo ser utilizada tanto em órgãos fontes (folhas maduras) quanto em drenos (folhas jovens e órgãos não fotossintetizantes como as raízes)

para a manutenção do metabolismo e do crescimento. O esqueleto de C na forma de sacarose pode ser utilizado para síntese de componentes estruturais como lipídios para membranas e parede celular, e para a biossíntese de proteínas (KÖLLING et al., 2015; LEMOINE et al., 2013). Porém, antes que possa ser utilizada como fonte de C, a sacarose precisa ser hidrolisada de forma reversível pela sacarose sintase, gerando UDPGlc e frutose (WINTER; HUBER, 2000) ou de forma irreversível pelas invertases, formando as hexoses glicose e frutose (TYMOWSKA-LALANNE; KREIS, 1998). Se a taxa de síntese de sacarose exceder a capacidade da folha para exportar ou armazenar sacarose, isso pode levar à inibição da sua síntese e desviar os fotoassimilados para a síntese de amido (LUNN, 2016; STITT; LUNN; USADEL, 2010).

A síntese de amido ocorre durante o dia no cloroplasto, quando as concentrações de Pi citosólica são baixas (RUAN, 2014; STITT; LUNN; USADEL, 2010). Este processo depende de uma enzima chave, a ADP-glicose pirofosforilase (AGPase), a qual catalisa a conversão irreversível de glicose-1-fosfato (Glc1P) gerado a partir do precursor Fru6P do CBC e ATP em adenosina-5-difosfoglicose (ADPGlc) e pirofosfato inorgânico (PPi) (PREISS, 1988). Após a síntese de ADPGlc, é desencadeada uma série de reações catalisadas por enzimas incluindo as sintases de amido solúvel e granuladas (SS e GBS, respectivamente), as de ramificação (SBE), e as de desramificação (isoamilases, ISA) até a síntese final do amido. Durante a noite, o amido estocado é degradado, inicialmente, pela ação das enzimas *glucan water dikinase* (GWD) e *phosphoglucan water dikinase* (PWD), que fosforilam resíduos de glicose nas posições C6 e C3, respectivamente, sendo que a PWD é capaz de agir somente após a fosforilação realizada pela GWD (HEJAZI et al., 2009). Posteriormente à ação dessas enzimas, ocorre uma desestabilização na superfície do grânulo de amido, mas para que outras enzimas possam finalizar a degradação do grânulo, é necessária a retirada dos grupos fosfatos feita principalmente pela fosfatase *starch excess 4* (SEX4), facilitando a ligação de outras hidrolases. As β -amilases (BAMs) são responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 entre os resíduos de glicose gerando maltose, o principal produto da degradação de amido em *Arabidopsis* (WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004). Enquanto que a ação das α -amilases (AMY) seguida pelas enzimas de desproporção (DPE) e α -glicano desfosforilase (PHS) são responsáveis por gerar moléculas de glicose e Glc1P (KÖTTING et al., 2010; STITT; ZEEMAN, 2012). Recentemente, foi mostrado que a degradação de amido também pode ocorrer durante o dia e é influenciada pelo decréscimo de intensidade luminosa em direção ao final do período de luz em dias longos, refletindo um baixo requerimento de C estocado nestas

condições para o curto período noturno (FERNANDEZ et al., 2017). Além disso, Seki et al., (2017) combinando um modelo matemático e dados experimentais propuseram que o padrão quase linear de regulação do *turnover* de amido é uma propriedade emergente para manter a homeostase do fluxo de sacarose para ajustar o crescimento.

As paredes celulares representam o maior depósito de C fotossinteticamente fixado nas plantas, sendo constituídas principalmente por polissacarídeos como as microfibrilas de celulose e hemiceluloses, embebidas em uma matriz de pectinas e proteínas estruturais (COSGROVE, 2016; LI et al., 2014; SOMERVILLE, 2004). A síntese de parede celular é um processo altamente complexo, envolvendo múltiplas enzimas e intermediários metabólicos, transportadores e compartimentos celulares (VERBANCIC et al., 2017). Os açúcares nucleotídeo-difosfato (açúcares NDP), como UDPGlc, são os principais substratos para a síntese de polissacarídeos da parede celular (KLECZKOWSKI; KUNZ; WILCZYNSKA, 2010) e a fonte de C para a síntese desses açúcares pode ser proveniente da via das pentoses fosfato (KLECZKOWSKI; KUNZ; WILCZYNSKA, 2010). A celulose é produzida na membrana celular por um complexo de enzimas da família celulose sintase contendo múltiplas subunidades de celulose sintase A (CesA), no entanto, como este processo é regulado ainda não está claro (IVAKOV et al., 2017; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2017). Diferente da celulose, a síntese de outros polissacarídeos da matriz (hemicelulose e pectina) ocorre no complexo de Golgi (MCFARLANE; DÖRING; PERSSON, 2014), onde os substratos açúcares NDPs e moléculas transportadoras acetiladas são importados do citosol e usados por uma variedade de enzimas glicosiltransferases, metiltransferases e acetiltransferases formando ligações glicosídicas transferindo porções de açúcar de moléculas doadoras para moléculas receptoras específicas, finalizando a síntese destas macromoléculas (ANDERSON, 2016; VERBANCIC et al., 2017). Um exemplo de uma das enzimas biossintéticas bem caracterizada é a galacturonosiltransferase1 (GAUT1) que catalisa a transferência de GalA de UDP-GalA para umceptor oligo-GalA no complexo de Golgi para a produção de pectina (ANDERSON, 2016; STERLING et al., 2006). A maior síntese de parede celular primária ocorre, principalmente, em folhas dreno, uma vez que estes órgãos estão em crescimento (VERBANCIC et al., 2017), enquanto em folhas fontes há pouca síntese devido ao fato de já estarem quase ou totalmente expandidas, e a maioria da UDPGlc é usada para a síntese de sacarose (STITT; SULPICE; KEURENTJES, 2010).

Para que todos estes processos biossintéticos ocorram, grande quantidade de proteína é investida na síntese de enzimas representando a maior parte do consumo total de

ATP para o crescimento (PROUD, 2007). A síntese de proteínas em condições normais de crescimento inicia-se no núcleo celular e consiste na transcrição de uma molécula de RNA mensageiro (RNAm) a partir de uma molécula de DNA, sendo o transcrito então traduzido por ribossomos no citosol para formar polissomos com carregamento dependente dos níveis de sacarose (PAL et al., 2013; PIQUES et al., 2009). A abundância de ribossomos e a taxa de *turnover* de proteínas são negativamente correlacionadas com a taxa de biomassa e crescimento das plantas, visto que pequenos acessos de *Arabidopsis* apresentam maior quantidade de ribossomos se comparado aos grandes (ISHIHARA et al., 2017). Consequentemente, a biogênese e o uso de ribossomos constituem um gargalo para o crescimento vegetal.

1.3. Partição de C para o crescimento

A quantidade de recursos de C disponível para o crescimento em plantas depende do tipo de tecido e do seu estágio de desenvolvimento. Enquanto folhas fonte adquirem C apenas através da fotossíntese, órgãos dreno não assimilam C suficiente e importam de órgãos fonte na forma de sacarose (KÖLLING et al., 2015). Estudos indicam que 80% do C fotossintético é exportado por folhas fonte (KALT-TORRES et al., 1987). A quantidade de sacarose disponível para a exportação depende de diversos fatores como a atividade fotossintética, a partição entre amido e sacarose, e armazenamento de sacarose no vacúolo para realização das atividades metabólicas (LEMOINE et al., 2013). Assim, em condições normais, durante a primeira hora de luz, há um pico de exportação de 25% do C assimilado de folhas fonte para drenos, que é reduzido ao longo do dia (KÖLLING et al., 2013, 2015). A quantidade de C fixado na folha que é transportado para a raiz atinge 6,9% ao final do dia, e considerando um ciclo de 24 h (incluindo a exportação de C noturna a partir da degradação de amido) sobe para 22,7% (ZEEMAN; AP REES, 1999). Experimentos realizados por Durand et al., (2018) em plantas jovens consideraram na quantificação de C transportado para a raiz não só o que foi exportado pela folha fonte, mas também o C liberado pelas raízes durante a respiração, somando assim ao final de um período de luz aproximadamente 37% de C translocado para este órgão. Em condição de baixa disponibilidade de C ou de água, as folhas jovens são priorizadas para receber o C exportado das fontes (HUMMEL et al., 2010). Durante o estágio de crescimento vegetativo, raízes e folhas jovens são os drenos dominantes, e ao fim desse estágio de desenvolvimento esses órgãos tornam-se competitivos por fonte de C e

seu fluxo é determinado pela “força de dreno” que direciona o C para o órgão que necessita de maior demanda (HO, 1988). O descarregamento de C de fontes para drenos pelo floema pode ocorrer através da membrana plasmática (via apoplástica) que requer transportadores dos tipos *sugar will eventually be exported transporters* (SWEETs) e *sucrose transporters* (SUTs) para conduzir a importação de sacarose do apoplasto contra o gradiente de concentração, e dependendo da necessidade, a sacarose pode ser hidrolisada pela ação da invertase de parede celular (ZHANG; TURGEON, 2018). Esta via tem sido considerada como a principal fonte de sacarose para raízes (LEMOINE et al., 2013; MILNE; GROF; PATRICK, 2018). Por outro lado, a sacarose pode também ser direcionada, através de plasmodesmos (via simplástica) que são interconexões que ligam o floema à células dreno sem a necessidade de transportadores (ZHANG; TURGEON, 2018). Além da exportação de C, a partição também é diferente entre órgãos fonte e dreno dependendo da necessidade energética do tecido. Em folhas fonte de *Arabidopsis*, ao meio do dia, após o acompanhamento do fluxo de ^{14}C por uma hora, 55% do C assimilado é alocado na forma de compostos solúveis em água, os quais são sub-fracionados em compostos neutros (açúcares como sacarose, glicose e frutose), ácidos (ácidos orgânicos e açúcares fosfatados) e básicos (principalmente aminoácidos); 40% do C é alocado em compostos insolúveis (amido, proteínas e material de parede celular) e 5% solúveis em etanol (lipídios e pigmentos) (KÖLLING et al., 2015). Em contraste, as folhas drenos dividem o C igualmente em compostos solúveis e insolúveis (45% cada) e 10% em compostos solúveis em etanol. Nas raízes, os açúcares solúveis foram distribuídos em quantidades semelhantes ao longo de todo o ciclo diurno (DURAND et al., 2018). Interessantemente, em *Arabidopsis* de 30 à 50% do total de fotoassimilados é convertido em amido nas folhas fontes (KÖLLING et al., 2013; STITT; ZEEMAN, 2012) enquanto as folhas drenos investem mais em C na forma de compostos estruturais (KÖLLING et al., 2015). Estes dados mostram que as altas taxas de exportação de C a partir dos tecidos fonte e as altas taxas de síntese de componentes celulares nos tecidos dreno acompanham a taxa de expansão foliar.

1.4. Regulação da partição de C

O padrão de assimilação, armazenamento e utilização de C durante o ciclo diurno depende de uma complexa e flexível rede de controle, importante para manter um balanço apropriado de C e sustentar as alterações ambientais, permitindo o correto

crescimento da planta (GRAF; SMITH, 2011; GREENHAM; MCCLUNG, 2015; SEKI et al., 2017). Parâmetros de comprimento de onda, intensidade, direção e duração da luz podem alterar a quantidade de C fixado no ciclo de 24 h. Alguns estudos descobriram que a regulação circadiana está intimamente relacionada com a fotossíntese e seus produtos metabólicos (DODD et al., 2005, 2014; HAYDON et al., 2013). Como já mencionado acima, o relógio circadiano é um importante regulador do crescimento nas plantas capaz de manter os ritmos endógenos na ausência de estímulos externos e assim permitir a antecipação de alterações ambientais regulares, como o ciclo de luz e escuro (DODD et al., 2005, 2014; GRAF; SMITH, 2011; SULPICE et al., 2014). Além da antecipação das transições, o relógio circadiano sincroniza, sequencia ou separa temporalmente processos biologicamente associados ou incompatíveis (HARMER et al., 2000). Através da transcrição de genes envolvidos na fotossíntese, o relógio circadiano prepara a maquinaria fotossintética antes do início da luz (DODD et al., 2014; HENNESSEY; FIELD, 1991), influencia na abertura dos estômatos (GORTON et al., 1989; HENNESSEY; FIELD, 1991), além de controlar a taxa de assimilação de C (HENNESSEY; FIELD, 1991; MÜLLER; VON KORFF; DAVIS, 2014) e genes associados à síntese e a acúmulo de clorofila (PAN et al., 2015). Acredita-se que o ajuste entre a regulação do relógio circadiano com as alterações ambientais envolvendo constantes oscilações de luz e temperatura, permite ao organismo antecipar mudanças das condições ambientais assegurando o crescimento e desenvolvimento ideal mesmo em condições de limitação de C (DODD et al., 2005, 2014; FERNANDEZ et al., 2017), garantindo que quase todo o C fixado seja investido em crescimento dentro de cada ciclo diurno (ISHIHARA et al., 2015; USADEL et al., 2008). No caso do crescimento biossintético, o relógio regula o suprimento de C rigidamente através da taxa de degradação de amido, assegurando sua mobilização gradual durante a noite a uma taxa tal que o amido esteja quase completamente esgotado ao amanhecer (GRAF et al., 2010; STITT; ZEEMAN, 2012). Como resultado, permite o fornecimento de C para manter os processos basais celulares, como respiração em períodos onde não há assimilação de C (SULPICE et al., 2014). Além disso, estudos recentes sugeriram que o *turnover* do amido é controlado pelo relógio circadiano atuando como um sensor dinâmico que monitora os sinais de sacarose para manter sua homeostase (SEKI et al., 2017). A regulação do amido através do relógio circadiano também pode ser observada em uma única célula como é na abertura e fechamento dos estômatos (YAKIR et al., 2007). A degradação do amido nas células-guarda tem um papel importante no controle do crescimento expansivo das plantas, por meio da

condução de respostas estomáticas à luz. Em *Arabidopsis*, durante o dia o amido é degradado nas células-guarda promovendo a abertura dos estômatos, favorecendo a assimilação de CO₂. Já a incorporação de CO₂ induz a síntese de amido necessário para o fechamento das células-guarda (AZOULAY-SHEMER et al., 2016; HERRER et al., 2016).

O controle da alocação de C é ainda pouco compreendido, mas está claro que os açúcares não só funcionam como substratos para o crescimento, mas também atuam como sinalizadores regulando como, quando e onde essas moléculas serão utilizadas (ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006). A sacarose tem potencial para atuar como sinalizador de longa distância para a coordenação do crescimento em diferentes partes da planta (LALONDE, 1999) influenciando a expressão de uma grande quantidade de genes envolvidos em processos de síntese de parede celular, metabolismo, transporte de aminoácidos e estresse biótico (BLASING et al., 2005; GIBON et al., 2006; KOCH, 2004; RAMON; ROLLAND; SHEEN, 2008). Apesar de ser uma molécula estável, a sacarose é rapidamente metabolizada tornando incerto se as respostas das plantas são atribuídas a essa molécula por si só ou aos produtos de sua degradação, como glicose (TOGNETTI; PONTIS; MARTÍNEZ-NOËL, 2013).

A glicose foi o primeiro açúcar sinalizador descoberto por controlar a expressão de genes e proteínas envolvidos na progressão do ciclo celular, metabolismo central e secundário, além de programas de crescimento e desenvolvimento (RAMON; ROLLAND; SHEEN, 2008; ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006). Os sinais de glicose são percebidos e transduzidos por um mecanismo de detecção direta através de sensores como as hexoquinases (HXKs) (CHO et al., 2009; GRANOT et al., 2014; MOORE, 2003; XIAO; SHEEN; JANG, 2000). As HXKs estão presentes em todos os organismos eucariotos e são as únicas enzimas capazes de fosforilar a glicose em plantas (GRANOT; DAVID-SCHWARTZ; KELLY, 2013). Curiosamente, a enzima HXK1 possui função dupla, atuando como sensor dos níveis de glicose através da fosforilação de hexoses como glicose, frutose, manose e galactose formando hexose-6-fosfato, de forma independente de sua atividade catalítica, que serão ponto de partida para a glicólise e para a via oxidativa de pentose-fosfato (GRANOT et al., 2014; GRANOT; DAVID-SCHWARTZ; KELLY, 2013; MOORE, 2003; XIAO; SHEEN; JANG, 2000). Já em relação à sua atividade direta como sensor, a HXK1 medeia a repressão dos genes da fotossíntese e do desenvolvimento de órgãos fotossintéticos pela glicose através da integração e controle por fatores externos como luz, nutrientes, estresse e micróbios; e por fatores internos como hormônios, peptídeos e relógio circadiano (KIM et al., 2013; LI; SHEEN,

2016; ZHANG et al., 2010) atuando juntamente com outras vias de sinalização.

Outras duas vias centrais na sinalização energética mediada por açúcar, que atuam de formas antagônicas são as das proteínas quinases serina/treonina *sucrose non-fermenting-1-related protein* (SnRK1) e *target of rapamycin* (TOR) (BAENA-GONZÁLEZ, 2010; BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007; ROBAGLIA; THOMAS; MEYER, 2012; SMEEKENS et al., 2010). Enquanto em plantas, a SnRK1 é particularmente ativada em resposta à privação de açúcares (BAENA-GONZÁLEZ, 2010; BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007), TOR promove o crescimento em resposta a elevados níveis destes metabólitos (DEPROST et al., 2007; XIONG et al., 2013; XIONG; SHEEN, 2012). SnRK1 é formada pelo complexo heterotrimérico composto por uma subunidade catalítica α e duas subunidades reguladoras β e γ . Em *Arabidopsis*, há duas isoformas da subunidade catalítica (AKIN10 e AKIN11), três subunidades β (AKIN β 1, AKIN β 2 e AKIN β 3) e uma subunidade γ (AKING) todas bem conservadas em leveduras, mamíferos e plantas (GISSOT et al., 2006; POLGE; THOMAS, 2007; RAMON et al., 2013). Dessa forma, a quinase SnRK1 atua como um regulador central controlando o metabolismo, o crescimento e desenvolvimento, e a tolerância ao estresse abiótico e biótico em plantas (BAENA-GONZÁLEZ; SHEEN, 2008; LI; SHEEN, 2016; SHEEN, 2014). A atividade da SnRK1 é induzida em resposta à redução no fornecimento de energia (por exemplo, durante estresse), desencadeando a ativação de vias catabólicas e reprimindo vários processos anabólicos e de crescimento que consomem energia. Açúcares fosforilados como Glc1P, Glc6P e trealose-6-fosfato (Tre6P) também parecem bloquear a sinalização de SnRK1 através de um mecanismo ainda desconhecido (ZHANG et al., 2009).

Em geral, é conhecido que a SnRK1 regula diversas partes do metabolismo primário através da fosforilação direta de enzimas que catalisam reações chave, como é o caso da nitrato redutase (NR; uma enzima chave na assimilação de nitrato exógeno) e da sacarose fosfato sintase (SPS; que atua na síntese de sacarose) (BROECKX; HULSMANS; ROLLAND, 2016). Nesses dois casos, essa fosforilação leva à inativação das enzimas associadas à ligação com proteínas 14-3-3, provavelmente envolvidas na inibição reversível das atividades enzimáticas sob condições de estresse (KAISER; HUBER, 2001). Além disso, em resposta às condições de escuridão, açúcar e estresse aparentemente não relacionadas, SnRK1 exerce grande impacto no controle da reprogramação transcricional detectando e sinalizando a privação de açúcar e energia. Essa quinase tem como alvo uma matriz ampla de genes que orquestram redes de transcrição, promovem o catabolismo e suprimem o anabolismo

(BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007). SnRK1 fosforila e ativa diretamente diversos fatores de transcrição (FTs), que incluem por exemplo, os FTs do tipo *basic leucine zipper* (bZIPs) do grupo como S1/C e *B3-domain FUSCA3* (FUS3) (BROECKX; HULSMANS; ROLLAND, 2016; DRÖGE-LASER; WEISTE, 2018; TSAI; GAZZARRINI, 2012). Os genes ativados pela SnRK1 codificam uma variedade de vias catabólicas principais, incluindo parede celular, amido, sacarose, aminoácidos, autofagia e degradação de proteínas (DIETRICH et al., 2011). Em contraste, genes que codificam proteínas envolvidas na biogênese de ribossomos e em outros processos anabólicos que consomem energia, como crescimento e desenvolvimento são reprimidos (BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007; BAENA-GONZÁLEZ; SHEEN, 2008). Em condição de deficiência de C, SnRK1 inibe a síntese de proteínas a partir da repressão massiva de genes atribuídos à biogênese e à tradução de ribossomos (BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007; COOKSON et al., 2016) sugerindo que a ativação dessa quinase reduz a taxa de tradução em resposta à depleção energética através da repressão da atividade da polimerase I, que transcreve o RNA ribossomal (BROECKX; HULSMANS; ROLLAND, 2016; MCGEE, SEAN, 2008). Interessantemente, a ativação da SnRK1 também parece inibir a fosforilação da proteína ribossomal S6 através da S6K à qual é ativada pela TOR resultando na regulação da tradução (LI; SHEEN, 2016). Recentemente foi mostrado que em condições de escuro prolongando, a SnRK1 fosforila RAPTOR, proteína associada ao complexo TOR (TORC) responsável pelo recrutamento dos substratos do complexo para fosforilação (NUKARINEN et al., 2016) impedindo a ação do TORC. Enquanto a SnRK1 reprime processos anabólicos, a quinase TOR em plantas promove processos de crescimento e biossintéticos, como a biogênese de ribossomo e a síntese proteica em resposta à disponibilidade de energia (CALDANA et al., 2013; DEPROST et al., 2007; MOREAU et al., 2012; REN et al., 2012; XIONG et al., 2013), por exemplo, na presença de glicose (XIONG et al., 2013). No entanto, como exatamente a disponibilidade de açúcar afeta a atividade da via SnRK1 e TOR não é conhecida. É importante entender como TOR modula a regulação de processos tão dinâmicos e a produção, transporte, armazenamento e metabolismo de açúcares em plântulas.

1.5. O complexo TOR

A quinase TOR é uma proteína de tamanho relativamente grande (~280 kDa) pertencente à família das quinases fosfoinositol 3 (PI3K) (KUNZ et al., 1993). Esta proteína foi identificada na década de 90 em uma triagem em *Saccharomyces cerevisiae* na busca por

mutantes que fossem resistentes ao complexo formado entre o antibiótico rapamicina e a proteína imunofilina FK506 12 (FKBP12) causando redução na proliferação celular (HEITMAN; RAO MOVVA; HALL, 1991). Devido ao papel fundamental da TOR na regulação de processos metabólicos, essa quinase tem sido extensivamente estudada em organismos menos complexos como leveduras (LOEWITH et al., 2002), mas principalmente em células animais, pois quando TOR é desregulada pode causar doenças como câncer, obesidade, diabetes tipo 2 entre outras (LAPLANTE; SABATINI, 2012; SATO et al., 2010).

Em todos os eucariotos, a estrutura da TOR é bastante conservada e compreende entre suas regiões do N ao C terminal diferentes domínios com funções específicas (**Figura 1.3**). Os 20 elementos de repetições HEAT (*huntingtin, elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1*) estão na região N terminal e ocupam metade da sequência proteica sendo reiterados com 40 resíduos que formam um par de hélices antiparalelas envolvidas nas interações proteína-proteína, tornando-se a região de ligação para subunidades de outras proteínas que fazem parte do TORC (PERRY; KLECKNER, 2003). Seguido dos domínios HEATs, os domínios FAT (**FRAP, ATM e TRRAP**) e FRB (**FKBP-rapamycin binding**) parecem funcionar como domínio de proteína de ligação ou como um *scaffold* (BOSOTTI; ISACCHI; SONNHAMMER, 2000) interagindo e/ou se ligando a múltiplos membros de uma via de sinalização, prendendo-os em complexos para regular a transdução de sinal (SHAW; FILBERT, 2009). O domínio FRB é a região específica para a ligação dessa proteína com o complexo ternário de inibição da TOR FKBP12-rapamicina. O domínio quinase apresenta uma estrutura de dois lóbulos e uma fenda entre eles onde o ATP se liga permitindo as reações de transferência de fosfato e a ativação da proteína TOR (YANG et al., 2013). Na extremidade C terminal, o domínio FATC (*Carboxy-terminal FAT*) só ocorre em combinação com o FAT, sugerindo que eles interagem se dobrando em uma configuração que garanta o funcionamento adequado do domínio catalítico da TOR (BOSOTTI; ISACCHI; SONNHAMMER, 2000; SCHMELZLE, T., AND HALL, 2000; WULLSCHLEGER et al., 2005).

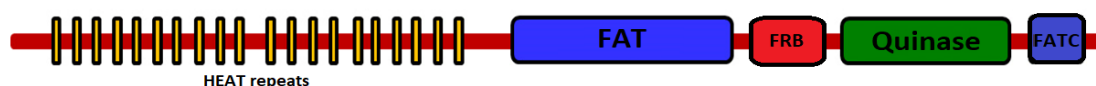


Figura 1.3. Arquitetura geral de uma proteína TOR, incluindo a organização dos domínios conservados.

A proteína TOR é composta por vários domínios que podem mediar interações proteína-proteína (FAT e FATC) e permite a ligação específica com o complexo ternário de inibição da TOR-FKBP12-rapamicina no domínio FRB.

Em leveduras e animais, a quinase TOR está presente em dois complexos distintos denominados TOR1 e TOR2 (TORC1 e TORC2), que diferem por sua composição, sensibilidade à rapamicina, e obviamente especificidade de substratos que regulam processos biológicos distintos (LAPLANTE; SABATINI, 2012). TORC1, que é sensível à rapamicina, é composto, além da proteína TOR, pelas proteínas *regulated-associated protein of TOR* (RAPTOR, homóloga a KOG1 em leveduras) e pela *lethal with sec thirteen 8* (LST8). RAPTOR é uma proteína reguladora que apresenta domínios de proteínas de ligação, sendo responsável pelo recrutamento de substratos para serem fosforilados pelo domínio quinase da TOR (ANDERSON; VEIT; HANSON, 2005; SALEM et al., 2017) enquanto que LST8 interage com TOR e estabiliza a interação entre TOR e RAPTOR (KIM et al., 2003). Acredita-se que LST8 seja necessária para a ativação da TOR, e sua superfície de interação pode influenciar na organização do sítio ativo dessa quinase. Estudos realizados por Yang et al., (2013) mostraram que a ativação da TOR depende da expressão simultânea de *LST8*.

Quando ativo, o TORC1 regula positivamente a síntese de proteínas, o metabolismo energético e o crescimento celular (HENRIQUES et al., 2014; VAN DAM et al., 2011). Em contraste, o TORC2, que consiste em TOR, LST8, *raptor independent companion of TOR* (RICTOR, homóloga a AVO3 em leveduras) e *stress-activated MAP kinase interacting protein 1* (SIN1, homóloga a AVO1 em leveduras) (LAPLANTE; SABATINI, 2012; SERFONTEIN et al., 2010; VAN DAM et al., 2011) é insensível à rapamicina devido a sobreposição na ocupação do domínio FRB pelo componente AVO3/RICTOR, impedindo a ligação do complexo FKBP12-rapamicina (GAUBITZ et al., 2015; LOEWITH et al., 2002; SARBASSOV; ALI; SABATINI, 2005). Membros da subfamília AGC quinase (*protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C-family*) como SGK1 e Akt são diretamente fosforilados e ativados por TORC2 (ZINZALLA et al., 2011), o qual promove a sobrevivência celular e age como mediador na organização do

citoesqueleto de actina (CYBULSKI; HALL, 2009; LAPLANTE; SABATINI, 2012; SARBASSOV; ALI; SABATINI, 2005).

1.6. Alvos conservados da TOR

Componentes centrais da via de sinalização da TOR são conservados entre espécies divergentes tendo progredido a partir de um núcleo evolutivo primitivo do último ancestral eucarioto comum (SERFONTEIN et al., 2010; TAKAHARA; MAEDA, 2013; VAN DAM et al., 2011). Este núcleo evolutivo compreende as proteínas TOR, RAPTOR e LST8 como componentes do complexo e a proteína quinase S6 (S6K) (SCHEPETILNIKOV et al., 2011; SERFONTEIN et al., 2010; URBAN et al., 2007), o regulador de fosfatase TAP42 (*type 2A phosphatase-associated protein 42*) (AHN et al., 2011; HARRIS; MYRICK; RUNDLE, 1999) e as proteínas relacionadas a autofagia (ATGs) (LIU; BASSHAM, 2010; NODA; OHSUMI, 1998; PATTINGRE et al., 2008) como alvos da TOR conservados em todos os organismos, dos quais a presença de componentes adicionais modifica os mecanismos regulatórios conforme a complexidade de cada espécie (HENRIQUES et al., 2014). Em leveduras, Sch9 (pertence à família de AGC quinase e é ortóloga da proteína quinase ribossomal S6K em mamíferos e plantas – (HUBER et al., 2009; LOEWITH; HALL, 2011; TURCK et al., 2004), atuando cascata abaixo do TORC1 controlando a biogênese de ribossomos, o início da tradução e a entrada na fase G0 do ciclo celular (URBAN et al., 2007). Porém, novos estudos apresentados por González et al., (2015) sugerem que o TORC1 é estimulado pela fosforilação de Rps6 independente de Sch9 e propõem que a ACG quinase Ypk3 seria ortóloga da S6K em leveduras (GONZÁLEZ et al., 2015; VAN DAM et al., 2011). Além da S6K, a fosfatase TAP42 exerce importante função nesses organismos na regulação do crescimento celular em coordenação com as condições nutricionais e ambientais, regulando a transcrição de genes envolvidos na resposta de limitação de N (CARDENAS et al., 1999; LI et al., 2017a), na regulação de genes do ciclo do TCA, na resposta à estresse, além de vários outros grupos funcionais também dependerem dessa fosfatase (SHAMJI; KURUVILLA; SCHREIBER, 2000). A TAP42/ $\alpha 4$ é uma subunidade reguladora da proteína fosfatase 2A (PP2A) em eucariotos (AHN et al., 2011), a qual associa-se diretamente às subunidades catalíticas da PP2A e suas fosfatases relacionadas PP4 e PP6 para formar um heterodímero (DÜVEL; BROACH, 2004) e atuar como um efetor central da transcrição mediada pela TOR (AHN et al., 2011). As fosfatases associadas à TAP42 formam um complexo com o TORC1 em condições normais de crescimento, e são liberadas e ativadas

quando as células são expostas às condições adversas (YAN; LAI; JIANG, 2012). Uma vez liberada, a fosfatase desfosforila muitos fatores abaixo da via TOR, incluindo glutamina 3 (Gln3), um fator de transcrição envolvido no metabolismo do N (CARDENAS et al., 1999; SCHMIDT et al., 1998). Em contraste, em leveduras, a inativação da TOR causa a desfosforilação da TAP42 e a dissociação do complexo TAP42-PP2A, sugerindo que TOR regula a fosforilação de proteínas indiretamente restringindo a atividade da PP2A através da fosforilação da TAP42 (URBAN et al., 2007). O homólogo da TAP42 em mamíferos, $\alpha 4$, regula a desfosforilação dos fatores de transcrição (c-jun e p53) e a inativação de $\alpha 4$ inicia rapidamente a apoptose tanto em células diferenciadas quanto em proliferação (KONG, 2004).

Em leveduras e animais, o TORC1 estimula de maneira conservada a síntese de proteína através da regulação das etapas de iniciação e alongamento da tradução de RNAm (BARBET et al., 1996). O início da tradução em eucariotos é uma etapa importante na síntese de proteínas, a qual requer vários fatores de iniciação eucariótica (eIF)4F que dirigem a montagem sequencial e o posicionamento dos ribossomos no códon de iniciação (tipicamente AUG) no RNAm (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010; MERRICK, 1992). Acredita-se que a maioria dos RNAm eucarióticos seja traduzida de uma maneira dependente de cap, por meio do complexo heterotrimérico do fator de iniciação eucariótica 4F (eIF4F) (composto de eIF4E (a subunidade de ligação da cap), eIF4A (uma RNA helicase) e eIF4G, que serve como uma proteína de suporte e interage diretamente com a estrutura cap (presente na extremidade 5' do RNAm) para guiar a ligação da subunidade 40S do ribossomo à essa região do RNAm (JARAMILLO et al., 1991; MERRICK, 1992). eIF4E é um alvo chave para vias de regulação que controlam as taxas de síntese de proteína. Em mamíferos, a atividade de eIF4E é modulada pela regulação transcricional do gene *eIF4E*, e a alteração no estado de fosforilação de eIF4E e sua interação com uma família de polipeptídeos conhecidos como 4E-BPs (proteínas de ligação eIF4E) são responsáveis por bloquear a formação do complexo eIF4E e reprimir a tradução (HAGHIGHAT et al., 1995). Essa repressão pode ser aliviada através da fosforilação da 4E-BP, o que diminui sua afinidade com o eIF4E (COSENTINO et al., 2000).

Em leveduras, Sch9 regula as RNA polimerases I e III, o início da tradução e a expressão dos genes que codificam as proteínas ribossomais e da biogênese de ribossomos (HUBER et al., 2009). Nesses organismos, não existem homólogos estruturais dos 4E-BPs. No entanto, o TORC1 estimula a fosforilação de proteínas associadas à eIF4E, a Eap1 e p20,

ortólogo de 4E-BPs em levedura que também bloqueiam a tradução dependente de cap (COSENTINO et al., 2000). Como em animais as redes de sinalização da TOR são mais elaboradas, novas etapas regulatórias foram adicionadas à coordenação desse processo (HENRIQUES et al., 2014). Assim, nesses organismos, TORC1 controla o início da tradução através da fosforilação direta da proteína S6K (HAY; SONENBERG, 2004) ou pela fosforilação de outras proteínas de ligação como a 4E-BP1 da família 4E-BPs (BERETTA et al., 1996). O TORC1 fosforila 4E-BPs, causando sua dissociação de eIF4E para promover o início da tradução de RNAm específicos que codificam proteínas envolvidas no crescimento, proliferação e sobrevivência da célula (BERETTA et al., 1996; RUGGERO; SONENBERG, 2005). Além de promover a tradução de RNAm, e consequentemente a síntese de proteínas através da fosforilação da S6K, o TORC também é conhecido por reprimir a autofagia e a degradação de proteínas através da desfosforilação de proteínas relacionadas a autofagia (ATGs). O complexo formado pelas quinases ATG1/ATG13/ATG17 desempenha um papel essencial no início da autofagia e é um dos substratos diretos do TORC1. Em leveduras, o TORC1 medeia a fosforilação de ATG13, prevenindo sua associação com ATG17 e bloqueando o início da autofagia. Já em animais, o TORC1 inibe a autofagia por meio da fosforilação de ambas as subunidades ATG13L (semelhante a ATG13) e ULK1 (ortóloga de ATG1) para reprimir a atividade da quinase ULK1 (JEWELL; RUSSELL; GUAN, 2013).

Para modular processos biológicos como os citados acima, as atividades do TORC1 são reguladas em resposta a sinais intra e extracelulares como estresse, *status* energético, nutrientes e aminoácidos (JEWELL; RUSSELL; GUAN, 2013). Além destes processos biológicos básicos conservados, a complexidade da regulação da via TOR acompanhou a evolução dos eucariotos, onde o aumento da complexidade em organismos multicelulares, por exemplo, fez com que a via adquirisse outras funções permitindo manter a coordenação do crescimento frente à disponibilidade de nutrientes (HENRIQUES et al., 2014). Um exemplo disto é a interação da via TOR com vias de sinalização hormonais, como é o caso de hormônios de crescimento e a insulina (LAPLANTE; SABATINI, 2012; VAN DAM et al., 2011). No caso da insulina, o TORC1 é regulado através do heterodímero esclerose tuberosa 1 (TSC1)/tuberina (TSC2) que funciona como uma proteína ativadora de GTPase (GAP) para o homólogo Ras enriquecido em GTPase cerebral (Rheb). A ligação de Rheb ao GTP ativa diretamente o TORC1 (INOKI, 2003; LAPLANTE; SABATINI, 2012). A TSC1/2 transmite muitos dos sinais que incidem no TORC1, incluindo a própria insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1)

e as quinases efetoras dessas vias - proteína Akt, quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2) fosforilam diretamente o complexo TSC1/TSC2 para inativá-lo e consequentemente ativam o TORC1 (INOKI, 2003; LAPLANTE; SABATINI, 2012).

1.7. O complexo TOR em plantas, um regulador central do crescimento e do metabolismo

A proteína TOR em *Arabidopsis* apresenta 75% de similaridade com a sequência de aminoácidos em humanos (XIONG; SHEEN, 2014), sugerindo que as mesmas compartilham propriedades e substratos semelhantes (MENAND et al., 2002). Diferentemente de leveduras, plantas possuem um único homólogo ao gene *TOR* (At1g50030) e até o momento foram identificadas apenas proteínas homólogas do complexo 1, cada uma codificando dois homólogos *LST8* (*Lst8-1* e *Lst8-2*; At3g18140 e At2g22040 respectivamente) e *RAPTOR* (*Raptor3g* e *Raptor5g*; At3g08850 e At5g01770, respectivamente) (ROBAGLIA; THOMAS; MEYER, 2012). Apesar da conservação dos componentes do TORC1, a formação do complexo ternário TOR-FKBP12-rapamicina é instável em plantas devido a substituições de alguns aminoácidos na proteína FKBP12 importantes para esta interação (MAHFOUZ et al., 2006). Desta forma, apenas concentrações de rapamicina 100 vezes superiores às aplicadas em leveduras resultam na inativação da fosforilação da quinase alvo da TOR, a S6K1, e em fenótipo claro de redução de crescimento em plantas (XIONG; SHEEN, 2012). Interessantemente, diferente de leveduras e animais, o TORC2 até hoje não foi encontrado em plantas e outros organismos fotossintetizantes (CYBULSKI; HALL, 2009; MAEGAWA et al., 2015; ROBAGLIA; THOMAS; MEYER, 2012). Similarmente a outros organismos, o TORC1 em plantas é regulado pelo *status* energético e nutricional. Contudo, uma série de estudos evidenciaram que a ativação da via TOR por luz e fitormônios como o ácido jasmônico (HAVKO et al., 2016; SONG et al., 2017), abscísico (KRAVCHENKO et al., 2015), salicílico (DE VLEESSCHAUWER et al., 2018), brassinosteroides (ZHANG et al., 2016), auxinas (DENG et al., 2016; PU; LUO; BASSHAM, 2017; SCHEPETILNIKOV et al., 2013) e citocininas (TURCK et al., 2004) interagem com a via de sinalização TOR em sua maioria por mecanismos ainda pouco conhecidos.

Apesar da ausência de inibição por rapamicina, a importância do gene *TOR* em organismos fotossintéticos como *Arabidopsis* foi comprovada através de *knockouts* que apresentaram o fenótipo letal em estágios embrionários, por cessar o desenvolvimento no

estágio dermatogênico (16 à 32 células) (MENAND et al., 2002). Além de *TOR*, há dados controversos sobre o papel de RAPTOR no desenvolvimento embrionário (DEPROST et al., 2005; SALEM et al., 2017). Linhagens transgênicas de *Arabidopsis* expressando o gene repórter *β-glucuronidase* (*GUS*) dirigido pelo promotor do *TOR* indicam sua expressão em embrião, endosperma e em todos os meristemas (MENAND et al., 2002). Alternativas para identificar as funções do gene *TOR* em plantas incluíram a geração de linhas transgênicas contendo sua repressão condicional através de RNA interferência (RNAi) ou microRNA artificial (amiR) (CALDANA et al., 2013; XIONG; SHEEN, 2012); além da recuperação da expressão constitutiva de *TOR* em linhagens contendo inserção de T-DNA (DEPROST et al., 2007); mutantes de componentes do complexo TORC1, como RAPTOR e LST8 (ANDERSON; VEIT; HANSON, 2005; DEPROST et al., 2005; MOREAU et al., 2012); e linhas transgênicas expressando o gene *FKBP12* de levedura sob o controle do promotor constitutivo 35S (REN et al., 2012; SONG et al., 2017). Estas ferramentas genéticas valiosas foram usadas para desvendar aspectos chave do crescimento de órgãos durante o desenvolvimento inicial de plântulas e em outras fases do ciclo de vida. Utilizando plântulas expressando o gene repórter *GUS* dirigido pelo promotor *LST8-1*, Moreau et al., (2012) mostraram que este gene é expresso nas raízes (meristema apical radicular, porções laterais e central do cilindro de raízes primárias e secundárias), folhas (vascularização dos cotilédones e nas células guarda dos estômatos), e flores (vascularização de pétalas e sépalas, anteras, filamentos e pólen). A superexpressão de *TOR* parece causar uma série de efeitos pleiotrópicos. Ren et al., (2011), por exemplo, reportaram que linhagens de superexpressão de *TOR* resultam em fenótipos de alteração no eixo proximal-distal, raízes tuberosas, folhas com coloração escura e assimétricas, perda de dominância apical, atraso na floração e na senescência, enquanto outros estudos descreveram aumento no comprimento das raízes, no tamanho das folhas e da roseta, além de células epidérmicas maiores e grande produção de sementes (DEPROST et al., 2007). Por outro lado, a repressão condicional de *TOR* (RNAi e amiR) retarda fortemente o desenvolvimento de folhas e raízes primárias e secundárias devido à redução no tamanho das células, além de provocar clorose nas folhas, morte celular e menor biomassa vegetal (CALDANA et al., 2013; DEPROST et al., 2007; XIONG; SHEEN, 2014). *Arabidopsis* transgênicas superexpressando *FKBP12* de levedura e tratadas com rapamicina floresceram tardiamente e o tempo de vida da planta foi estendido (REN et al., 2012). Em contraste, a senescência foi acelerada e as flores apresentaram desenvolvimento anormal nas linhas de repressão de *TOR* induzíveis por etanol e em mutantes *LST8* (DEPROST

et al., 2007; MOREAU et al., 2012). A repressão de outros componentes do TORC como *RAPTOR1*, *RAPTOR2*, e *RPS6A/B* também resultou em retardo no crescimento vegetativo, dominância apical reduzida e desenvolvimento anormal de flores (ANDERSON; VEIT; HANSON, 2005; DEPROST et al., 2005; DOBRENEL et al., 2011; REN et al., 2012), reforçando ainda mais o papel indispensável da sinalização da via TOR no crescimento e desenvolvimento das plantas.

1.8. Alvos cascata abaixo da TOR em plantas

Apesar do fenótipo claro de crescimento, em contraste com outros eucariotos, ainda há poucos alvos diretos do complexo TOR comprovados em plantas. A maior parte destes alvos são conservados em outros eucariotos como é o caso da proteína quinase S6K, envolvida na biogênese ribossomal e início da tradução (REN et al., 2011; SCHEPETILNIKOV et al., 2011), da proteína ATG13/1 envolvida no processo de autofagia (HE; KLIONSKY, 2009; LIU; BASSHAM, 2010, 2012) e a fosfatase TAP46 que desempenha um papel essencial no crescimento e sobrevivência de células vegetais (AHN et al., 2011; AHN; AHN; PAI, 2015) (**Figura 1.4**). Em plantas a TAP46, subunidade regulatória da PP2A, a qual é diretamente fosforilada pela TOR para inibir a atividade da PP2A, controla a tradução, autofagia e mobilização de N (AHN et al., 2011; AHN; AHN; PAI, 2015). A superexpressão constitutiva da TAP46 em *Arabidopsis* resulta em aumento da ativação da TOR e, consequentemente, em um estímulo global do crescimento aumentando o tamanho dos órgãos e, principalmente o tamanho das células das folhas (AHN; AHN; PAI, 2015). Porém, o mecanismo utilizado pela TOR para regular a TAP46 e quais funções são moduladas pela PP2A na sinalização da TOR ainda precisam ser melhor esclarecidos em plantas. Um processo conservado é a autofagia, processo de degradação de macromoléculas para reciclagem de nutrientes sendo uma estratégia das plantas para produzir energia e nutrientes em condições de estresse (como escassez de nutrientes) e durante transições de desenvolvimento (LIU; BASSHAM, 2010, 2012). Em *Arabidopsis*, três supostas proteínas ATG1 e duas ATG13 foram identificadas formando o complexo ATG1/ATG13, sendo seus papéis confirmados na regulação da autofagia em resposta à deficiência nutricional (SUTTANGKAKUL et al., 2011). Em condições com alta disponibilidade nutricional e energética, o TORC1 inibe a autofagia através da hiperfosforilação da proteína ATG13, diminuindo sua afinidade por ATG1 e impedindo seu deslocamento ao vacúolo para associar-se com corpos autofágicos (SUTTANGKAKUL et al.,

2011). Recentemente foi mostrado que tratamentos com a auxina na forma de ácido 1-naftalenoacético (ANA) é capaz de bloquear a autofagia induzida quando TOR está inibida, indicando que a auxina é um regulador acima da TOR nesse processo (PU; LUO; BASSHAM, 2017).

Além disso, novos alvos da via TOR foram identificados em plantas, tais como os fatores de transcrição *re-initiation supporting protein* (RISP) alvo do eixo de sinalização TORC1/S6K1 que quando fosforilado promove a reinicialização da tradução (SCHEPETILNIKOV et al., 2011). No caso do controle da tradução, sabe-se que a S6K parece ser recrutada pela RAPTOR para ser fosforilada por TORC (MAHFOUZ et al., 2006) nos resíduos Thr449 e Thr455, S6K1 e S6K2 respectivamente, que são conservados em todos os eucariotos e por esse motivo, o *status* de sua fosforilação tem sido usada como um *readout* para monitorar a atividade do TORC1 também em plantas (XIONG; SHEEN, 2012). Além da RISP, foi identificado outro mecanismo de reinicialização da tradução regulado por TOR/S6K1 envolvendo o fator de iniciação eIF3h para promover o reinício da tradução de um conjunto de RNAm que contém uma região 5' não traduzida (UTR) denominada *upstream open Reading frames* (uORFs) necessária para regular a tradução em plantas (SCHEPETILNIKOV et al., 2013). Este mecanismo parece ser regulado pela auxina que ativa diretamente *small GTPase Rho-related protein 2* (ROP2) associada à GTPase *small guanosine 59-triphosphatases* que por sua vez interage com TOR alterando seu *status* de fosforilação, permitindo manter o alto *status* da fosforilação da S6K1, e consequentemente, da subunidade eIF3h promovendo a reinicialização da tradução (LI et al., 2017a; SCHEPETILNIKOV et al., 2013, 2017; SCHEPETILNIKOV; RYABOVA, 2018). Além da regulação do início da tradução, TORC1 também parece estar envolvido na regulação das taxas de transcrição e tradução de genes nucleares que codificam proteínas ribossomais plastidiais (DOBRENEL et al., 2016a).

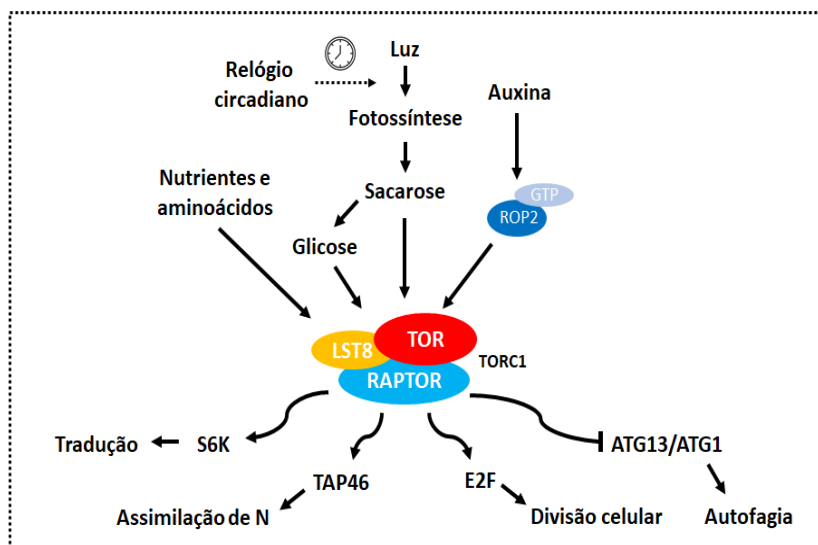


Figura 1.4. Esquema da via TOR em plantas.

Os ativadores estão representados acima do TORC1 e os alvos conservados abaixo.

Uma vez que plantas são organismos sésseis e autotróficos, outros mecanismos regulatórios dependentes de sua forma de vida foram encontrados. Um exemplo disto é a regulação da TOR dependente de fotossíntese que controla a transição do estágio heterotrófico-autotrófico, permitindo que a glicose seja transportada até a raiz, ativando o TORC que por sua vez fosforila diretamente o fator de transcrição E2Fa, envolvido na regulação da transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular e a replicação do DNA no meristema radicular (XIONG et al., 2013). De maneira similar, Pfeifer et al., (2016) mostraram que a via TOR é reprimida pelo componente negativo de sinalização luminosa *constitutive photomorphogenesis 1 (COP1)* no escuro. Curiosamente, a ativação das células-tronco encontradas no centro quiescente do meristema apical caulinar (MAC), que não percebem a luz diretamente, necessita que outras células reconheçam o sinal luminoso e transmitam a informação com a ajuda do hormônio citocinina e sinais metabólicos. Desta forma, a ativação das células-tronco depende de proteínas como o fator de transcrição WUSCHEL para transmitir estes sinais por mecanismo que é dependente da via TOR para a conversão destes sinais (PFEIFFER et al., 2016).

TOR pode também perceber e transduzir a sinalização da glicose derivada da fotossíntese, através da glicólise e do metabolismo energético mitocondrial, para controlar rapidamente a reprogramação global de transcritos e ativar o meristema apical radicular (MAR) e suas funções associadas, como o desenvolvimento dos pelos radiculares (XIONG et al., 2013). Ademais, recentemente, foi mostrado que além da glicose, para o controle da

proliferação celular no meristema apical, é necessária também sinalização por luz que ativa uma via independente de açúcar através da ação da auxina ambas convergindo na ativação da TOR e consequentemente fosforilação de um fator E2F (LI et al., 2017b). TORC parece controlar a elongação do hipocótilo dependendo não somente da glicose, mas também da disponibilidade de C, controlando o acúmulo do fator de transcrição *brassinosteroid (BR)-signaling* (BZR1) (ZHANG et al., 2016). Em condições de baixa disponibilidade de C, o TORC é inativado, permitindo a ativação da autofagia que por sua vez degrada a proteína BZR1, impedindo que regule a transcrição de genes envolvidos no crescimento.

1.9. O controle do TORC no metabolismo e crescimento (biossíntese de biomassa)

Além do controle da divisão celular, a modulação da expressão do gene *TOR* também acarreta numerosos fenótipos metabólicos. Tendo em vista que a principal função da TOR em eucariotos é o controle da biossíntese de macromoléculas (crescimento em biomassa), exceto pela regulação da tradução, onde a inibição dessa via resulta em menor eficiência na tradução de RNAm e consequentemente menor síntese de proteínas (DEPROST et al., 2007), pouco se sabe sobre o controle metabólico para o crescimento celular. A maioria dos estudos que investigaram o papel da TOR no controle do metabolismo utilizaram-se de uma abordagem ômica (CALDANA et al., 2013; DEPROST et al., 2007; DONG et al., 2015; MONTANÉ; MENAND, 2013; MOREAU et al., 2012; REN et al., 2011, 2012; XIONG et al., 2013), sendo que a abordagem sistemática mais completa envolvendo a repressão condicional de TOR e análise integrativa do efeito dessa repressão tanto na transcrição quanto no metabolismo foi conduzida por Caldana et al., (2013), através de mutantes *amiR-tor* induzíveis com estradiol. Estes autores estudaram o efeito a longo prazo da inibição da sinalização da TOR, utilizando para isso um perfil global transcriptômico e metabolômico que mostrou uma forte regulação de genes envolvidos no ciclo celular, modificações da parede celular e senescência, juntamente com uma grande reprogramação de transcritos e metabólitos das vias de metabolismo primário e secundário.

De formas geral, análises de plantas transgênicas *amiR* (CALDANA et al., 2013), RNAi ou *FKBP12* (REN et al., 2012) reduzindo os níveis de expressão de *TOR* ou mutantes *LST8* (MOREAU et al., 2012) sugerem uma redução na síntese proteica, resultando provavelmente em uma diminuição da incorporação de aminoácidos para tradução, causando acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e aromáticos (triptofano e

tirosina). Além disso, o acúmulo destes aminoácidos pode ser resultado da rápida degradação e reciclagem de proteínas através da autofagia. Alguns estudos concluíram que TOR é necessário para a percepção adequada da disponibilidade de nutrientes e de níveis de energia necessários para o desenvolvimento. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *FKBP12* de leveduras inibidas com rapamicina foram impedidas de ajustar seu metabolismo resultando em deficiência nutricional e, consequentemente, redução do crescimento mesmo quando os níveis de nutrientes foram restaurados (REN et al., 2012).

Várias linhas de evidência apontam que TOR exerce um papel fundamental sobre o metabolismo de C atuando como um regulador essencial do metabolismo central energético (CALDANA et al., 2013; DÜVEL et al., 2010; REN et al., 2012; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; XIONG et al., 2013). O amido, um dos compostos de C de reserva mais abundante em plantas, tem sua abundância negativamente correlacionada com o crescimento das plantas (SULPICE et al., 2009). Interessantemente, em plantas transgênicas amiR (CALDANA et al., 2013), RNAi e mutantes *Ist8* (MOREAU et al., 2012) foi observado o acúmulo de amido nas folhas. Esse fenótipo de aumento no armazenamento de C é similar ao observado em animais e leveduras através do acúmulo da molécula análoga ao amido, o glicogênio (CORNU; ALBERT; HALL, 2013; SCHMELZLE et al., 2004). Além do amido, os lipídios, e especialmente os triacilgliceróis (TAGs) representam uma importante forma de reserva de C e energia em plantas (GRAHAM, 2008; LI-BEISSON et al., 2013). Interessantemente, em linhas transgênicas amiR-*tor* os níveis de TAGs, principalmente, os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, apresentam-se aumentados, fornecendo um dreno importante para o C acumulado (CALDANA et al., 2013). TAGs normalmente se acumulam em folhas em resposta à senescência ou deficiência nutricional (KAUP, 2002). Além do armazenamento de C transitório ou de longa duração, a parede celular da planta também é um dreno de C adicional. Em *Arabidopsis*, foi previamente demonstrado que a via TOR regula a biogênese da parede celular (LEIBER et al., 2010) e quando essa via é inibida, os níveis de expressão de diversas expansinas e extensinas são reduzidos afetando a estrutura e extensão da parede (CALDANA et al., 2013; LEIBER et al., 2010; REN et al., 2012; XIONG et al., 2013).

Uma outra mudança significativa frente à inibição de componentes do complexo TOR é o aumento significativo de ácidos orgânicos intermediários do ciclo do TCA (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; REN et al., 2012). Tal alteração pode ser parcialmente explicada pelo decréscimo das atividades anabólicas (como tradução e síntese de parede

celular) e aumento das catabólicas com a autofagia. Além disso, substratos chave para o metabolismo de C (acetato e piruvato) e substratos alternativos (aminoácidos de cadeia ramificada, aromáticos e GABA) também aumentam seus níveis em plantas transgênicas com supressão de *TOR* (CALDANA et al., 2013; REN et al., 2012). Quando os níveis de C são escassos, as plantas podem metabolizar ácidos orgânicos, proteínas e lipídios como substratos alternativos para respiração, e embora sejam menos eficientes, estes representam uma importante fonte alternativa de energia (ARAÚJO et al., 2011a). Além disso, outra estratégia para produção de energia é através da autofagia (SORMANI et al., 2007) que de fato resulta da degradação de componentes celulares como ribossomos ou organelas.

Em resumo, estes dados sugerem um papel da TOR no controle do metabolismo não apenas de C, como também no metabolismo de N, regulando o balanço entre estes elementos para a biossíntese de macromoléculas que permitem o crescimento celular. Vale ressaltar, porém, que a maior parte destas descobertas foi identificada após longos períodos de repressão da TOR na presença de sacarose. Contudo, ainda não se sabe se essas alterações observadas em processos metabólicos ocorrem devido à regulação direta ou indireta da via e nem quais são seus substratos diretos.

1.10. Novos inibidores químicos como ferramenta para identificação de alvos diretos da TOR

Nos últimos anos, muitas pesquisas foram direcionadas para o desenvolvimento de novos inibidores do sítio catalítico da TOR em mamíferos devido à importância desta via em doenças como câncer e diabetes (ALBERT et al., 2010; BENJAMIN et al., 2011; FRUMAN; ROMMEL, 2014). Estes novos inibidores, que atuam no sítio catalítico competindo pelo ATP, nomeados *active-site mTOR inhibitors* (asTORi) foram desenvolvidos e analisados em ensaios clínicos (FRUMAN; ROMMEL, 2014) e mais recentemente, testados em plantas como alternativas promissoras para superar a insensibilidade do TORC1 à rapamicina (DENG et al., 2016; DONG et al., 2015; LI et al., 2015; MONTANÉ; MENAND, 2013; SONG et al., 2017; XIONG et al., 2017, 2013). Em animais os asTORi PP242, PP30, Torin1, AZD-8055, WYE-354 e KU0063794, com exceção do LY294002, suprimem a atividade de mTORC1 e mTORC2 com seletividade significativa sobre as isoformas de PI3K (CHRESTA et al., 2010; DOWLING et al., 2010; FELDMAN et al., 2009; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2009; YU et al., 2009). Além disso, estes inibidores reprimem a proliferação de células primárias mais completamente e eficientemente do que a rapamicina (DOWLING et al., 2010; FELDMAN et al., 2009; GARCÍA-

MARTÍNEZ et al., 2009; YU et al., 2009). Estudos realizados por Montané e Menand, (2013) testaram esses inibidores em plantas e sugeriram fortemente que a eficiência e especificidade da inibição da TOR pelos inibidores competitivos de ATP é semelhante entre plantas e mamíferos. Porém, apesar de serem bastante eficientes, apresentam diferenças potenciais, como por exemplo KU63794, Torin1 e AZD-8055 que demonstraram baixo, moderado e alto potencial inibitório, respectivamente, tanto em animais quanto em plantas (DONG et al., 2015; MONTANÉ; MENAND, 2013). Em plantas, estes inibidores, especialmente o AZD-8055 limitam o tamanho do meristema de forma dose-dependente através da redução do número de células na zona meristemática, sugerindo que TOR pode regular a expansão celular (MONTANÉ; MENAND, 2013). Foi demonstrado que plântulas tratadas com asTORi não conseguem estabelecer o crescimento fotoautotrófico durante a fase de transição de semente para plântula (DONG et al., 2015). Devido sua aplicação rápida e versátil esta ferramenta tem sido utilizada em uma série de experimentos para buscar alvos direto desta via como, por exemplo, estudos de transcriptômica usando RNA-seq (DONG et al., 2015), identificação da interação com outras vias de sinalização como ABA (KRAVCHENKO et al., 2015) e em outras espécies como algodão (SONG et al., 2017) também utilizaram AZD-8055 para estudar a relação existente entre a sinalização da TOR e o metabolismo. Em conjunto, estes dados revelam a eficiência de asTORi para inibir a atividade da TOR e o potencial de sua aplicação para elucidar os alvos desta quinase em plantas.

1.2. Objetivo desta tese

Apesar do papel central da via da quinase TOR no controle do crescimento e desenvolvimento vegetal, principalmente na regulação do metabolismo central energético para a biossíntese de macromoléculas, pouco se conhece sobre seu modo de regulação. Tendo em vista que o crescimento em biomassa é realizado durante o ciclo diurno, esta tese teve como objetivo investigar a contribuição da TOR no controle do metabolismo, mais especificamente:

- (1) Investigar de maneira global como a cinética da inibição da via TOR afeta plântulas de *A. thaliana* em fase inicial de desenvolvimento, através de análise de perfis metabólicos ao longo do ciclo diurno.

(2) A repressão da TOR resulta em um redirecionamento do metabolismo de C e N, por mecanismos poucos conhecidos. Desta forma, objetivou-se elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na partição de C, além das interações com o metabolismo de N.

2. Material e Métodos

2.1 Reagentes

Todos os químicos e reagentes foram obtidos pela Sigma-Aldrich/Merck/Fluka (Brasil), a menos que seja afirmado o contrário. Reagentes para meio de cultura de plantas foram obtidos pela Duchefa Biochemie (Holanda). O inibidor químico da TOR foi adquirido pela LC Laboratories (Estados Unidos). Enzimas para medidas de atividade enzimática foram adquiridas pela Roche Diagnostics (Brasil) ou Sigma-Aldrich (Brasil) e os kits moleculares foram adquiridos pela Qiagen (Brasil), Promega (Brasil), Ambion (Brasil), Thermo Fisher (Estados Unidos) e Applied Biosystems (Estados Unidos). Os anticorpos S6-S6P foram gentilmente doados pelo pesquisador Christian Meyer (INRA, França).

2.2. Material vegetal

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn ecótipo Columbia-0 (Col-0) foram obtidas da coleção de sementes do laboratório nacional de ciência e tecnologia do Bioetanol (CTBE).

2.3. Condições padrão de cultivo de plântulas

2.3.1. Esterilização de sementes

Sementes de *A. thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) foram esterilizadas da seguinte maneira: a) incubação em 1 mL de etanol 70% por 2 min, b) incubação com 1 mL de solução de esterilização (10% de hipoclorito de sódio contendo 2 µL de Tween 20®) por 5 min em agitação constante e c) lavagem das sementes com 1 mL de água esterilizada, por cinco vezes, ou até que todo hipoclorito tenha sido removido. Após a esterilização, as sementes mantidas em água foram estratificadas à 4 °C no escuro por 5 dias para sincronizar a germinação.

2.3.2. Condições para aplicação de tratamentos

Todas as sementes foram germinadas em um sistema hidropônico estéril elaborado pelo grupo de pesquisa como descrito no artigo anexado como **capítulo 3** desta tese. Os sistemas hidropônicos foram introduzidos em câmara de crescimento (modelo SGC 120 ou HGC 1514, Fitotron, Weiss Technik, Reino Unido) sob condições climáticas controladas. Utilizou-se fotoperíodo padrão de 12 h, temperaturas 21 °C/19 °C (dia/noite), 75% de umidade relativa e

irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O crescimento das plântulas foi acompanhado por 12 dias até atingirem o estágio de 1.04 (cotilédones totalmente abertos e expansão total do primeiro par de folhas) de acordo com a escala BASF, Bayer, Ciba-Geigy, Hoechst (BBCH) (BOYES et al., 2001). Neste estágio, as plântulas foram submetidas à ensaios para modulação da atividade da TOR sendo submetidas aos tratamentos com AZD-8055 (inibidor químico da TOR) na concentração de $2 \mu\text{M}$ diluído no solvente DMSO à 0,05%, ou tratamento com 0,05% de DMSO como controle. As concentrações de aplicação das drogas foram previamente estipuladas. Para aplicação dos tratamentos, a solução nutritiva (MS) líquida presente no sistema hidropônico foi substituída por uma nova solução MS contendo as respectivas drogas diluídas.

Após o tratamento, plântulas foram coletadas em nitrogênio líquido em séries temporais, sendo cada ponto de coleta composto por pelo menos 4 réplicas biológicas (*pools*) contendo no mínimo 40 plântulas de *Arabidopsis*. Em alguns experimentos a parte aérea foi coletada separadamente da raiz. Os tecidos foram macerados em um moedor robotizado (Genogrinder 2010, SPEX, Metuchen, EUA) e armazenados à -80°C até o uso.

2.4. Análises metabólicas

2.4.1. Soluções de uso

Para a preparação de 100 mL da mistura de solventes de extração 1 (M1), 75 mL de *Methyl-tert-butyl-ether* (MTBE) foram adicionados à 25 mL de metanol UHPLC (3:1, v/v). 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina ($50 \mu\text{L}$ de uma solução *stock* de 1 mg/mL em clorofórmio) e ^{13}C sorbitol ($50 \mu\text{L}$ de uma solução *stock* de 1 mg/mL em água) foram adicionados como padrões internos para a análise de metabólitos polares por GC-TOF-MS. Para a mistura de solventes de extração 2 (M2) que induz a separação de fases, foram adicionados 75 mL de água UHPLC à 25 mL de metanol (3:1, v/v).

2.4.2. Extração e quantificação de metabólitos primários por cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas

Metabólitos primários foram extraídos a partir de 20 mg de material vegetal fresco em pó seguindo metodologia descrita por Giavalisco et al., (2011), com pequenas modificações. Um volume de 1 mL da mistura de extração M1 pré-resfriado (-20°C) foi adicionado aos tecidos homogeneizados. Depois de adicionar a mistura, os tubos foram agitados em vortex por 1 min e então incubados em um agitador orbital (100 RPM) por 10 min

à 4 °C, seguido por 10 min de sonificação. Esta extração permite a separação entre fases apolar e polar, além de *pellet* contendo proteínas e amido (**Figura 2.1**). Dessa forma, para a separação de fases, um volume de 500 µL da mistura de extração M2, foi adicionado a cada tubo e as amostras foram novamente misturadas por 5 min em vortex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à uma velocidade de 20.000 g por 10 min à 4 °C. Após remover a fase apolar, alíquotas de 150 µL e 200 µL da fase polar de parte aérea/planta inteira e raiz, respectivamente, foram transferidas para um novo tubo de 1,5 mL e as amostras foram secas em concentrador à vácuo (SpeedVac) e os *pellets* derivatizados para análise por cromatografia gasosa (7890N, Agilent) acoplada à espectrômetro de massas por tempo de voo (*time of flight*-TOF) (Pegasus HT, Leco) (GC-MS) usando método publicado por Lisec et al., (2006). Resumidamente, os *pellets* foram ressuspensos em solução de cloridrato de metoxiamina/piridina para metoxiamação de grupos carbonil seguido de aquecimento à 37 °C durante 90 min. As amostras foram ainda derivatizadas com N-metil-N-trimetilsililtrifloroacetamida (MSTFA) durante 30 min à 37 °C. A solução MSTFA contém uma mistura de 13 ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) com diferentes comprimentos de cadeia, utilizados na pós-medição como padrões de tempo de retenção. 1 µL da mistura de amostras derivadas foi injetado na coluna GC e medido. Os parâmetros de aquisição dos cromatogramas foram idênticos aos descritos por Weckwerth, Wenzel e Fiehn (2004). Todos os cromatogramas foram processados usando o *software* Pegasus ChromaTOF (version 3.25), e o tempo de retenção calculado baseado nas FAMES. Detecção dos picos, alinhamento dos tempos de retenção e busca em bibliotecas foram realizadas por uso do pacote *TargetSearch* do Bioconductor (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009). Metabólitos foram quantificados pela intensidade dos picos levando em consideração a contagem total de íons e posteriormente, normalizados pela massa fresca das amostras sendo feita transformação logarítmica em base 2. Toda análise de normalização dos dados e análise estatística foram feitas utilizando um *script* no *software* R. versão 3.2.2.

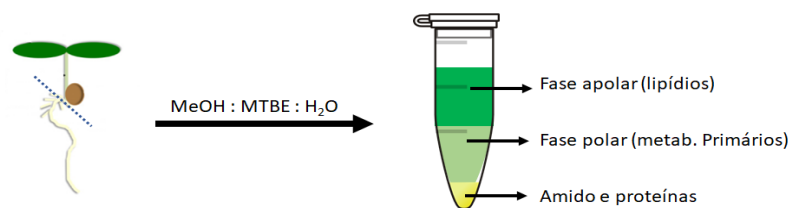


Figura 2.1. Esquema das frações de metabólitos do procedimento de extração por MTBE para a análise metabolômica e de amido por GC-TOF-MS.

Separação de diferentes frações obtidas pelo procedimento de extração de MTBE.

2.4.3. Extração e quantificação de açúcares fosforilados para análise de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS)

Tre6P e intermediários fosforilados foram extraídos conforme descrito por Lunn et al., (2006). Alíquotas de 20 mg de material vegetal congelado foram extraídas com 250 µL de solução clorofórmio: metanol (3:7, v/v). Os componentes solúveis em água como a Tre6P foram extraídos da fase de clorofórmio adicionando 200 µL de água. Os açúcares fosforilados foram medidos por cromatografia líquida de alta performance em sistema ICS 5000⁺ (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, USA; <http://www.dionex.com>) acoplado à espectrometria de massas tipo triplo quadrupolo QTrap 5500 (Sciex, Foster City, USA; <http://www.sciex.com/>) (FIGUEROA et al., 2016). Tre6P e outros açúcares foram selecionados usando um íon parental de 421,1 *m/z*. Os metabólitos foram quantificados por comparação da área de pico de sinal MS-Q3 integrada com uma curva de calibração obtida usando padrões autênticos. O sinal do padrão interno de Tre6P foi utilizado para corrigir efeitos de matriz e supressão iônica na análise por LC-MS/MS. Outros metabólitos foram determinados em paralelo com Tre6P, mas sem padrões internos correspondentes. As configurações do quadrupolo e transições utilizadas para medir outros metabólitos foram previamente otimizadas por injeção direta de padrões. A integração e cálculo dos cromatogramas foi realizada com o software Analyst (Sciex).

Estes ensaios foram realizados em parceria com Dr. John E. Lunn do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de Plantas (Postdam-Golm, Alemanha).

2.5. Estimativa de taxa de respiração

2.5.1 Quantificação da emissão de CO₂

A evolução de ¹⁴CO₂ foi realizada em plântulas de *Arabidopsis* crescidas por 12 dias em sistema hidropônico e tratadas com 2 µM de AZD-8055 ou DMSO à 0,05%, 15 min antes do amanhecer. Após 2 horas em contato com a droga, tecidos de 40 plântulas foram divididos em parte aérea e raiz e incubados separadamente em Erlenmeyers devidamente fechados, contendo 50 mM MES (pH 5,8) e 0,3 mM de glicose marcada (6,2 MBq mmol⁻¹ de ¹⁴C). O ¹⁴CO₂ dissipado pelos tecidos foi capturado em microtubo de 1,5 mL contendo 400 µL de NaOH 10% (v/v) inserido dentro do Erlenmeyer. Coletas do ¹⁴CO₂ foram realizadas após 1,5 e 3 horas de incubação com a glicose marcada. O NaOH contendo o ¹⁴CO₂ foi adicionado à 4 mL de coquetel de cintilação (Rotizint Ecoplus, ROTH) e a radioatividade quantificada por contagem de cintilação líquida (LS6500, Beckman Coulter). Os resultados foram interpretados segundo (REES; BEEVERS, 1960).

2.6. Análises de conteúdo de amido

2.6.1. Teor qualitativo de amido

Plântulas de *Arabidopsis* coletadas a cada 12 h por um período de 24 h de tratamento (AZD-8055; DMSO ou sem tratamento) foram incubadas em etanol 80% por 5 min à 95°C em banho seco, para despigmentação das amostras. Em seguida, foram lavadas com água destilada e imersas por 5 min em solução de lugol contendo iodo (I₂) 8 mM em 30 mM de iodeto de potássio (KI) de acordo com Lunn (1997). Posteriormente, o excesso da solução corante foi retirado com lavagem em água destilada e imediatamente as plântulas foram fotografadas em estereomicroscópio Discovery V20, pelo programa Axio Vision 4.8, utilizando objetiva de 0,63x, aproximação de 20x e magnitude 7,5x, para comparações do padrão de acúmulo de amido a partir da intensidade de coloração.

2.6.2. Teor quantitativo de amido – Análise enzimática

Para a determinação de amido, *pellets* remanescentes da extração de metabólitos por MTBE: metanol: água (item 2.4.2), foram ressuspensos em 400 µL de NaOH 0,1 M e incubados à 95 °C por 30 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, os extratos foram neutralizados com solução de HCl/acetato de sódio pH 4,9 (pH final em torno de 6), e

alíquotas dos sobrenadantes (40 μ L) foram digeridas com amiloglicosidase (Roche) e α -amilase (Roche) em tampão acetato 50 mM (pH 4,9 ajustado com NaOH) à 37 °C como descrito por Hendriks et al., (2003). O conteúdo de glicose liberada foi determinado enzimaticamente por espectrofotometria a 340 nm, acoplando a redução de NADP⁺ à NADPH em um leitor de microplacas (SpectraMax M2, Molecular Devices) (STITT et al., 1989). Para o cálculo do conteúdo de glicose foi utilizada uma curva padrão com diferentes concentrações de glicose (0 – 20 – 40 – 80 nmols). Para analisar o perfil de amido foi aplicada regressão linear para comparar as taxas de acúmulo ou degradação entre plântulas controle e tratadas com inibidor da TOR. A regressão foi realizada para avaliar o nível de amido ao amanhecer ou anoitecer (interceptação) e acúmulo de amido ou taxa de degradação (declive). Análise de covariância foi utilizada para testar a significância estatística da diferença de declive entre plantas controle e tratadas que foram representadas como o efeito sinérgico do tempo $\times$ tratamento. Todas as análises foram feitas usando o software R. versão 3.2.2 (seção 2.10).

2.7. Ensaio da atividade catalítica máxima da enzima AGPase

Alíquotas de 20 mg de folhas de *A. thaliana* em triplicatas, foram extraídas com 0,5 mL de tampão contendo glicerol 20% (v/v), 0,25% (m/v) de albumina de serum bovina, 0,1% (v/v) de Triton X-100, 50 mM de HEPES/KOH pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de benzamidina, 1 mM de ácido aminocapróico, 1 mM de fluoreto de metilsulfonil, 10 mM de leupeptina e 0,5 mM de ditioneitol (GIBON et al., 2004b).

A AGPase foi ensaiada na direção inversa medindo a produção de ATP dependente de pirofosfato inorgânico (PPi) da ADP-glucose. As concentrações utilizadas para os substratos e para o ativador 3-fosfoglicerato (3-PGA) foram escolhidos de acordo com Merlo et al., (1993). Extratos e padrões ATP foram preparados no tampão de extração e variaram de 0 a 1 nmol, incubados num meio contendo 50 mM de HEPES/KOH, pH 7,5, 5 mM de MgCl₂, 1 unidade.mL⁻¹ de glicerol quinase (GK) (produzida no CTBE conforme Gibon et al., 2009), 0 (em branco) ou 1 mM (atividade máxima) ADP-glucose, 5 mM 3-PGA, 1,5 mM de fluoreto de sódio e 120 mM de glicerol. A reação foi iniciada pela adição de PPi para uma concentração final de 2 mM. A reação foi interrompida com 20 μ L de HCl 0,5 M/tricina 100 mM/KOH pH 9. O conteúdo de glicerol-3P foi mensurado por espectrofotometria na presença de 1,8 U. mL⁻¹

glicerol-3P oxidase (GPOX), 0.7 U. mL⁻¹ glicerol-3P desidrogenase (G3PDH), 1 mM NADH e 1,5 mM Mg Cl₂ Gibon et al., (2004b).

2.8. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo

RNA total foi extraído a partir de três *pools* de 35 mg de tecidos de plântulas para cada tempo de coleta e tratamento, previamente maceradas e armazenadas à -80 °C, usando o kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ou SV Total RNA Isolation System (Promega) conforme instruções do fabricante. Contaminação com DNA genômico foi eliminada através de tratamento com a enzima TURBO DNase (Thermo Fisher) e a ausência de contaminação confirmada por PCR. Para a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) 1 µg de RNA total (tratado) foi usado para transcrição reversa através do kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher) seguindo o protocolo do fabricante. Os ensaios de RT-qPCR foram realizados usando placa óptica de 384 poços através do sistema “ViiATM7 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems), usando 2x SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) e condições térmicas padrão. As sequências de primer estão fornecidas na **tabela 2.1**. Quantificação relativa foi realizada com três réplicas biológicas e técnicas usando como gene de referência ubiquitina 10 (UBQ) ou *protodermal fator 2* (PDF2). A expressão relativa foi calculada pela subtração do valor CT do gene de interesse pelo valor do CT do gene de referência, resultando no Δ CT.

Tabela 2.1. Informações sobre os primers utilizados para análise de RT-qPCR.

Identificação do gene	Nomenclatura	5'-3' Sequências dos primers (F/R)
At4g05320	Ubiquitina 10/ <i>UBQ</i>	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG; AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
At4g04890	<i>Fator Protodermal 2/PDF2</i>	TAACGTGGCCAAAATGATGC; GTTCTCCACAACCGCTTGGT
At3g47340	<i>Asparagina Sintase 1/ASN1</i>	AGGTGCGGACGAGATCTTTG; GTGAAGAGCCTTGATCTTGC
At4g17770	<i>Trealose fosfato sintase/TPS5</i>	CTGCTCTGATGCTCCTTCTTCC; AAGCTGGTTTCCAACGATGATG
At3g59940	<i>Kiss me Deadly 4/KMD4</i>	GGAAGGTAATTATGGATACGAT; CGTCGTCTTCACCATCATC
At3g30775	<i>Prolina desidrogenase/PRODH</i>	CGCTATACCGTATCTTCTCC; CTCTTAAGTTCCATCCTCATG

2.9. Imunodetecção de proteínas

2.9.1. Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais, 50 µL de tampão de extração Laemmli [(0,125 M de Tris-HCl, pH 6,5; 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol e 0,2M de Ditioneitol (DTT)] foi adicionado à 50 mg de tecido vegetal (folha ou raiz) previamente macerado. O homogeneizado foi aquecido à 95 °C por 10 min e em seguida centrifugado à 14000 RPM por 10 min à 4°C, repetindo esse processo duas vezes. O sobrenadante foi quantificado por ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Para o ensaio de imunodetecção foi utilizada eletroforese de proteínas sob condição desnaturante (SDS-PAGE) com gel de 12% acrilamida, Tris-HCl e 100 µg de proteína total foi aplicada em cada linha. A eletroforese em gel foi realizada a 150 V durante 1 h. Os géis de poliacrilamida foram então incubados numa solução de transferência juntamente com a membrana e os filtros utilizados para transferência. As proteínas foram transferidas do gel para membrana de PVDF usando um sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell - BioRad) por 1 h à 15 V. As membranas com as proteínas transferidas foram bloqueadas por 1 h com solução bloqueadora (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,5 e 0,5% de BSA). As membranas foram sondadas por 16 h com anticorpos primários S6 e S6P (Agrisera) na diluição de 1:5000. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário “anti-mouse” (Agrisera) na diluição de 1:5000. A detecção das proteínas foi realizada por quimioluminescência utilizando o revelador WESTAR (Cyanagen) e o fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare). A análise das imagens foi realizada pelo *software* ImageJ (www.imagej.net).

2.10. Análise dos Resultados

Dados do perfil de amido, expressão gênica e níveis de metabólitos foram analisados utilizando o software R (www.r-project.org). Análises multivariadas de componentes principais (PCs) foram realizadas utilizando o pacote *pcaMethods* do *bioconductor* (STACKLIES et al., 2007) e seleção dos *loadings* das PCs responsáveis pelas principais fontes de variação foram selecionados pela função *boxstat* do R. *Heatmaps* foram produzidos através da transformação logarítmica dos dados em base 2 e gerados utilizando excel. Adicionalmente, intervalos de confiança foram também gerados por amostragem

bootstrap utilizando os valores imparciais de P . Os gráficos de metabólitos e expressão gênica foram construídos utilizando o software Origin. Para identificar as respostas de metabólitos nos experimentos, foram comparadas plântulas tratadas com o inibidor da quinase TOR (AZD-8055) e seu respectivo controle DMSO. Diferenças foram consideradas significativas quando o teste t pareado, seguido pela correção da falsa taxa de positivos (FDR) resultaram em $P < 0,05$.

3. A Flexible Low-Cost Hydroponic Growth System for Assessing Plant Responses to Small Molecules in Sterile Conditions

URL VIDEO: Com vídeo ensinando a montar o sistema.

AUTHORS & AFFILIATIONS:

Carolina C. Monte-Bello^{1,2} *, Elias F. Araújo^{1,3} *, Marina C. M. Martins¹, Valéria Mafra⁴, Viviane C. H. da Silva^{1,2}, Viviane Celente¹, Camila Caldana^{1,5}

¹Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in energy and materials (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil.

²University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

³University of Viçosa (UFV), Viçosa, Minas gerais, Brazil. Present address: Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

⁴CTBE, CNPEM, Campinas, São Paulo, Brazil. Present address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, Januária, Minas Gerais, Brazil.

⁵Max Planck Partner Group, Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE/CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil. Present address: Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm/Potsdam, Germany.

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding Author:

Camila Caldana (caldana@mpimp-golm.mpg.de)

Tel: 0049 3315678623

CITATION: Monte-Bello, C.C., Araujo, E.F., Martins, M.C., Mafra, V., da Silva, V.C., Celente, V., Caldana, C. A Flexible Low Cost Hydroponic System for Assessing Plant Responses to Small Molecules in Sterile Conditions. J. Vis. Exp. (), e57800, doi:10.3791/57800 (2018).

KEYWORDS:

Hydroponic system, *in vitro* culture, small molecules, *Arabidopsis thaliana*, *Setaria viridis*, pipette tip rack, target of rapamycin inhibitor, AZD-8055

SUMMARY:

A simple, versatile, and low-cost *in vitro* hydroponic system was successfully optimized, enabling large-scale experiments under sterile conditions. This system facilitates the application of chemicals in a solution and their efficient absorption by roots for molecular, biochemical, and physiological studies.

ABSTRACT:

A wide range of studies in plant biology are performed using hydroponic cultures. In this work, an *in vitro* hydroponic growth system designed for assessing plant responses to chemicals and other substances of interest is presented. This system is highly efficient in obtaining homogeneous and healthy seedlings of the C₃ and C₄ model species *Arabidopsis thaliana* and *Setaria viridis*, respectively. The sterile cultivation avoids algae and microorganism contamination, which are known limiting factors for plant normal growth and development in

hydroponics. In addition, this system is scalable, enabling the harvest of plant material on a large scale with minor mechanical damage, as well as the harvest of individual parts of a plant if desired. A detailed protocol demonstrating that this system has an easy and low-cost assembly, as it uses pipette racks as the main platform for growing plants, is provided. The feasibility of this system was validated using *Arabidopsis* seedlings to assess the effect of the drug AZD-8055, a chemical inhibitor of the target of rapamycin (TOR) kinase. TOR inhibition was efficiently detected as early as 30 min after an AZD-8055 treatment in roots and shoots. Furthermore, AZD-8055-treated plants displayed the expected starch-excess phenotype. We proposed this hydroponic system as an ideal method for plant researchers aiming to monitor the action of plant inducers or inhibitors, as well as to assess metabolic fluxes using isotope-labeling compounds which, in general, requires the use of expensive reagents.

INTRODUCTION:

The advantages of growing plants using hydroponics have been widely recognized in the production of large and uniform plants, enabling reproducible experiments¹⁻³. In this system, the composition of the nutritive solution can be properly controlled and recycled along all stages of plant growth and development. Furthermore, roots are not subjected to abiotic stresses, as can happen in soil-grown plants, such as nutrient starvation and water deficiency⁴. As plants grown hydroponically present morphological and physiological traits fairly similar to the ones cultured in soil, this system has been broadly employed in research because it allows the monitoring of root/shoot growth and their harvesting without injuries^{2,5}.

Due to the possibility of changing the composition and concentration of the nutritive solution, most of the research using hydroponic conditions has been performed to characterize the functions of micro- and macronutrients^{1,3,6-8}. However, this system has proved to be very useful to a broad range of applications in plant biology, such as to elucidate the functions of hormones and chemicals in plants. For instance, the discovery of strigolactones as a new class of hormones⁹ and the accelerated growth phenotype triggered by brassinosteroid application¹⁰ were performed under hydroponic conditions. Moreover, this system enables experiments with labeled isotopes (e.g., ¹⁴N/¹⁵N and ¹³CO₂)^{11,12} to evaluate their incorporation into proteins and metabolites by mass spectrometry.

Considering the importance of this system in plant research, a high number of hydroponic cultures has been designed in the last few years, including systems that use (i) the transference of seedlings from plates to hydroponic containers^{3,13}; (ii) rockwool that limits access to the early stages of root development^{2,14,15}; (iii) polyethylene granulate as the floating body, which makes the homogeneous application of small molecules/treatments difficult¹⁶; or (iv) a reduced number of plants^{9,17}. The volume of hydroponic tanks described in many of those protocols are usually large (small volumes ranging from 1 - 5 L, up to 32 L)¹⁸, which makes the application of chemicals extremely expensive. Although few studies do describe a hydroponic cultivation under aseptic conditions^{8,19}, the assembly of the system is usually quite laborious, consisting of the perfect adjustment of nylon meshes into plastic or glass containers^{5,8,17,20}.

Due to the importance of *Arabidopsis thaliana* as a model plant, the majority of hydroponics systems were designed for this species^{1,2,8,14,18-20}. Nevertheless, there are a few studies reporting the hydroponic growth features of other plant species with a pretreatment of seeds

to improve their germination and synchronization rates *in vitro*^{8,16}. In order to work on a large scale, we developed a protocol for setting up a simple and low-cost maintenance hydroponic system that enables sterile conditions for growing plants, including *A. thaliana* and other species, such as the grass *Setaria viridis*. The method described here is suitable for different experiments, as the seedling growth can be maximized, synchronized, and easily monitored. Furthermore, this system has many advantages as: (i) its assembly is straightforward and its components can be reused; (ii) it allows the easy application of different chemicals into the liquid medium; (iii) the seedlings germinate and grow directly in the culture medium without the need of transference to the hydroponics system; (iv) the shoot and root development/growth can be closely supervised and the seedlings are harvested without damages; and (v) it makes it possible to work on a large scale, maintaining physiological conditions.

PROTOCOL:

1. Preparation of Liquid and Solid Culture Media

1.1. Prepare a liquid medium using half-strength Murashige and Skoog (MS) medium with vitamins [0.0125 mg/L of cobalt(II) chloride pentahydrate, 0.0125 mg/L of copper(II) sulfate pentahydrate, 18.35 mg/L of ethylenediaminetetraacetate ferric sodium, 3.10 mg/L of boric acid, 0.415 mg/L of potassium iodide, 8.45 mg/L of manganese sulfate monohydrate, 0.125 mg/L of sodium molybdate dihydrate, 4.30 mg/L of zinc sulfate heptahydrate, 166.01 mg/L of calcium chloride, 85 mg/L of potassium dihydrogen phosphate, 950 mg/L of potassium nitrate, 90.27 mg/L of magnesium sulfate, 825 mg/L of ammonium nitrate, 1 mg/L of glycine, 50 mg/L of myo-inositol, 0.25 mg/L of nicotinic acid, 0.25 mg/L of pyridoxine hydrochloride, and 0.05 mg/L of thiamine hydrochloride] supplemented with 0.25 g/L of MES, and adjust the pH to 5.8 with 10 M KOH.

1.2. Add 10 g/L of agar to make a half-strength MS-solid medium. Autoclave the medium at 121 °C for 20 min prior to use.

2. Hydroponic System Assembling

Note: These steps should be followed meticulously to build the hydroponic system.

2.1. Material sterilization

2.1.1. Pack in the autoclave bag the pipette tip racks (without covers) that will be used as minitanks. Autoclave the racks at 121 °C for 20 min, 15 psi.

Note: The polypropylene pipette tip rack we used had the following dimensions: 120 mm (length) x 89 mm (width) x 55 mm (height). The pipette tip flat surface must have an area for the addition of culture medium. Other tip racks can be used (see **Table of Materials**).

Note: Throughout the assembly procedure of the hydroponic system, it is necessary to use a laminar flow hood, which must be cleaned and disinfected with 70% ethanol prior to use. The

experimenter must wear a lab coat, wash their hands and any exposed skin, and disinfect them with 70% ethanol. Gloves are optional, except for drug application.

2.1.2. Clean all the accessories described above (disposable plastic boxes, adhesive tape, pipettes, scissors, and tweezers) with 70% ethanol before entering the laminar flow hood. If the hood allows, turn on the UV light for 10 min prior to the assembling of the hydroponic system in order to keep the work area decontaminated.

2.2. Minitank assembling

2.2.1. Seal the upper surface of the pipette tip flat with adhesive tape (**Figure 1B**). If possible, leave it under UV light for 10 min.

2.2.2. Add 180 μL of melted solid MS culture medium (slightly warm) to each well using a multichannel pipette (**Figure 1C**).

Note: When preparing many tanks, use a hotplate to prevent the MS medium from solidifying.

2.2.3. Allow the medium to solidify completely (for about 30 min).

Note: During the solidification period, the UV light can be turned on.

2.2.4. Fill up the pipette tip rack completely with liquid MS culture medium (**Figure 1D**) and ensure there is close contact between the solid and the liquid media.

2.2.5. Remove the adhesive tapes of the upper surface of the pipette tip flat and fit it on the rack carefully. The hydroponic system is now ready to receive the sterilized seeds.

3. Seed Sterilization

3.1. Place 500 *Arabidopsis* seeds in a 1.5 mL microtube. Use as many microtubes as necessary according to the number of plants required for the experiment.

3.2. Wash the seeds with 70% ethanol for 2 min with a gentle agitation. Let the seeds settle down, then remove the ethanol carefully.

3.3. Add 1 mL of a 10% sodium hypochlorite solution containing 2 μL of a polysorbate 20 detergent. Agitate the solution for 5 min. Remove the solution carefully.

3.4. Rinse the seeds with sterile distilled water until all the bleach residue is completely removed (approximately 5x).

Note: After the surface sterilization, the seeds were immersed in sterile distilled water and stratified at 4 °C in the dark for 5 d to synchronize the germination.

Note: Seeds of *Setaria viridis* (accession A10.1) were preincubated in concentrated sulfuric acid for 15 min (to break the physical dormancy), washed thoroughly in sterile distilled water,

and then disinfested with a 5% sodium hypochlorite solution containing 0.1% polysorbate 20 for 5 min with a gentle agitation²¹. The remaining sterilization steps were identical to those described for *Arabidopsis* seeds.

4. Seed Application

4.1. Cut slightly the extremity of a 200 μ L tip with the aid of a sterile scalpel.

4.2. Pipette the *Arabidopsis* seeds into the solid culture medium on the upper surface of the pipette tip flat. Take care that the medium does not loosen from the flat; otherwise, the seeds will be shaded and the seedlings will not grow properly (**Figure 1E**).

Note: Use a sterile tweezer for *Setaria* seeds (with the embryo positioned upward).

4.3. Store as many minitanks as possible inside a disposable plastic box to maintain a high humidity and keep the environment free from microorganisms (**Figure 1F**).

4.4. Seal the disposable plastic box thoroughly using adhesive tape to avoid contamination.

4.5. Place the hydroponic systems into a growth chamber with the appropriate growth conditions for the plant of interest.

Note: In this work, the following conditions were used: 75% of humidity, and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of irradiance and equinoctial conditions of 12 h light (21 °C)/12 h dark (19 °C) for *Arabidopsis*, or 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of irradiance and 12 h light (28 °C)/12 h dark (25 °C) for *Setaria* (**Figures 1G and 1H**).

5. Validating the Use of this Hydroponic System to Inhibit the Target of Rapamycin Kinase

Note: This hydroponic system was initially developed to facilitate the administration of chemicals to plants, which, in general, are very expensive to be applied in large-scale experiments. As a proof of concept, the ATP-competitive inhibitor AZD-8055, which is known to specifically target the ATP binding site of the TOR protein kinase²², was employed to follow the repression of TOR activity in seedlings of *A. thaliana* Columbia-0 (The Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC ID: N22681). Here, the protocol used is briefly described.

5.1. Grow seeds hydroponically until stage 1.04 according to the BBCH scale²³ (for about 11 d) under the climatic conditions described above. Replace the nutrient solution, either with fresh medium containing 0.05% DMSO (control), 2 μ M AZD-8055 (TOR inhibitor) diluted in DMSO, or without treatment (mock), at the end of the night (EN).

5.2. Harvest some seedlings at different time points after the treatment and separate them into roots and shoots. Freeze the samples in liquid nitrogen, grind them to a fine powder in a robotic grinder (see **Table of Materials**), and store the powder at -80 °C until use.

5.3. Immunoblot against phosphorylated and non-phosphorylated forms of 40S ribosomal protein S6 (RPS6) according to Dobrenel *et al.*²⁴.

5.4. Bleach intact seedlings for sample depigmentation, wash them in distilled water, immerse them in an iodine solution for 5 min²⁵, and photograph the seedlings in a stereomicroscope (0.63X objective, 20x approximation, and 7.5x magnitude) for a qualitative assessment of the starch content.

5.5. Quantify the starch following the enzymatic degradation and measurement of the released glucose spectrophotometrically by coupling it to the reduction of NADP⁺ to NADPH^{26,27}.

5.6. Perform a total RNA extraction, a cDNA synthesis, and quantitative RT-PCR assays as described by Caldana *et al.*²⁸ to evaluate the expression level of genes related to different sorts of stresses.

5.7. Optionally, grow seedlings on a horticultural substrate in plastic pots with a 0.1 L capacity under similar climatic conditions [60% of humidity, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of irradiance, and equinoctial conditions of 12 h light (21 °C)/12 h dark (19 °C)] in order to compare them with seedlings grown hydroponically.

Note: The target genes used for the gene expression assays were *ABF3* (At4g34000), *ASN1* (At3g47340), and *TPS5* (At4g17770), and their expression levels were normalized employing the delta-Ct method²⁹ using *ACT2* (At3g18780) or *PDF2* (At4g04890) as the internal reference genes, assuming 100% of PCR amplification efficiency across all samples. The oligonucleotide pairs used for the quantitative PCR were:

ABF3 (GTTCTCAACCTGCAACACAGTGC; TCCAGGAGATACTGCTGCAACC);

ASN1 (AGGTGCGGACGAGATCTTTG; GTGAAGAGCCTTGATCTTGC);

TPS5 (CTGCTCTGATGCTCCTTCTTCC; AAGCTGGTTTCCAACGATGATG);

ACT2 (CGTACAACCGGTATTGTGCTGG; CTCTCTCTGTAAGGATCTTCATG);

PDF2 (TAACGTGGCCAAAATGATGC; GTTCTCCACAACCGCTTGGT).

REPRESENTATIVE RESULTS:

The TOR kinase is a major regulator that integrates nutrient and energy signaling to promote cell proliferation and growth in all eukaryotes. Efforts to elucidate TOR functions in plants include the generation of *Arabidopsis* transgenic lines containing TOR conditional repression through RNA interference or artificial microRNA^{28,30,31}, given the embryo lethal phenotype of TOR knockout plants³²⁻³⁵. Most of the conditional transgenic lines are under the control of estradiol-, dexamethasone-, or ethanol-inducible promoters, which could also make use of this hydroponic system.

One of the well-known targets of TOR activity in *Arabidopsis* is the direct phosphorylation of the ribosomal protein S6 kinase (S6K)^{34,36-38}. Upon phosphorylation, S6K further phosphorylates the 40S ribosomal protein S6 (RPS6), affecting the ribosomal protein translation^{24,39,40}. Recently, it has been demonstrated that the phosphorylation of an RPS6 Ser240 site is a good marker of TOR activity²⁴. Immunoblotting assays confirmed that soon after 30 min of drug administration, a significant decrease in the Ser240 phosphorylation was

observed in both roots and shoots (**Figure 2**). Under the experimental conditions used, AZD-8055 has also shown to be a potent TOR inhibitor, which rapidly represses its kinase activity.

Transgenic *Arabidopsis* lines with a reduced expression of the TOR gene or components of the TOR complex present a clear starch excess phenotype^{28,31}. Qualitative analysis of starch using Lugol's solution revealed the expected pattern of starch accumulation and degradation during the diel cycle (**Figure 3**). Seedlings that did not receive an application of DMSO or AZD-8055 showed no greater accumulation of starch in their leaves at the end of the night (EN), and the starch accumulation in the control plants (which received 0.05% DMSO) was consistent with the literature^{41,42}. Furthermore, plants treated with AZD-8055 presented a greater amount of remaining starch at the EN when compared to the control seedlings. These results indicated the usefulness of the proposed hydroponic system in growing seedlings mimicking physiological conditions. This system also enabled the confirmation of the starch excess phenotype typical of a repression of the TOR complex components^{24,28,31}.

Starch content was also accurately measured using a sensitive methodology, demonstrating that the AZD-8055 treatment led to seedlings containing significantly higher levels of starch at both the end of the day (ED) and EN in comparison to the DMSO-treated control plants (**Figure 4**). Starch accumulates in the leaves during the day and is remobilized overnight to sustain metabolic activity, mainly the respiration and the continuous export of sucrose to other plant organs^{41,42}. Under normal conditions, only a small fraction of starch (between 5% and 10% of the amount at the ED) remains at the EN⁴³⁻⁴⁵. These results attested that the starch excess phenotype observed under the TOR repression occurs all over the diel cycle.

Hydroponically grown plants were compared to seedlings grown in a horticultural substrate under very similar climatic conditions concerning the expression level of the abscisic acid-responsive element-binding factor 3 (*ABF3*) gene (**Figure 5A**), which directly correlates with internal ABA levels, a class of hormones widely known as a marker due to its role in multiple abiotic stress responses⁴⁶⁻⁴⁸. Although seedlings grown in the hydroponic system did present a significant increase in the level of *ABF3*, the expression of asparagine synthase 1 (*ASN1*) was not affected by the DMSO or AZD treatments (**Figure 5B**). However, trehalose phosphate synthase 5 (*TPS5*) was significantly increased after 8 h of TOR inhibition (**Figure 5B**). *ASN1* and *TPS5* respond to low and high sugar levels⁴⁹⁻⁵⁴, respectively, suggesting that these plants were not experiencing energetic stress.

FIGURE AND TABLE LEGENDS:

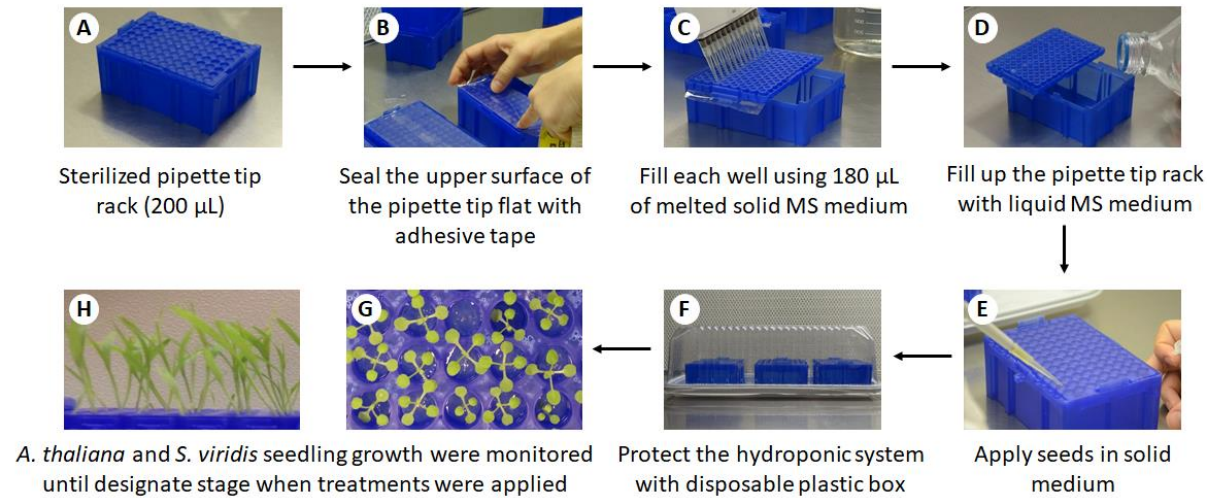


Figure 1: Workflow for assembling the hydroponic system.

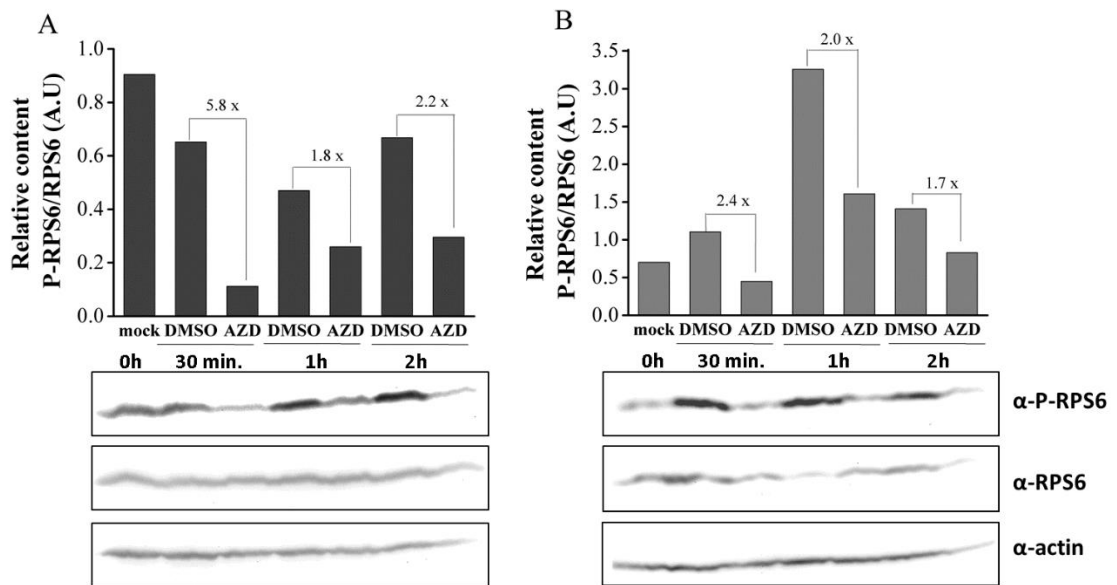


Figure 2: Effect of TOR inhibition on the RPS6 phosphorylation in different tissues of *Arabidopsis thaliana*.

Immunoblotting shows the abundance of the total and phosphorylated RPS6 in the (A) root and (B) shoot extracts of seedlings treated with 2 µM AZD-8055 or 0.05% DMSO (control). Values represent the ratios normalized by the non-phosphorylated protein RPS6. Anti-actin antibody was used as a loading control.

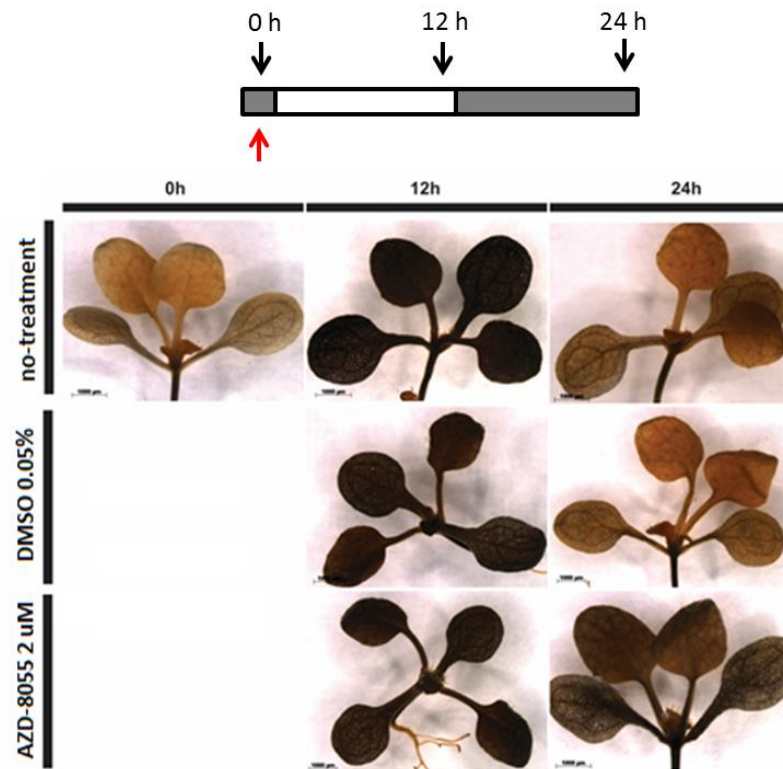


Figure 3: *Arabidopsis thaliana* seedlings stained with Lugol's reagent.

Treatments with 2 μM AZD-8055 or 0.05% DMSO (control) were applied at the EN (red arrow) and compared to mock seedlings (no-treatment). Seedlings were harvested before the treatment application (0 h) and at 12 h (ED) and 24 h (EN) after the treatment, indicated by black arrows.

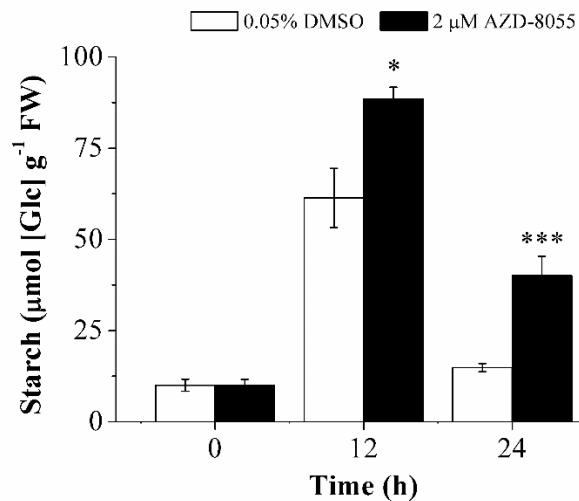


Figure 4: Effect of TOR inhibition on the starch content of *Arabidopsis thaliana* seedlings.

Starch was measured enzymatically before (0 h) and at 12 h (ED) or 24 h (EN) after the treatment with 2 μM AZD-8055 (black) or 0.05% DMSO (control, white). The values shown are the mean $\pm$ the standard error (SE) ($n = 4$). Significant differences between seedlings treated with AZD-8055 and DMSO, using Student's t -test, are indicated by asterisks: * ($P < 0.05$) and *** ($P < 0.001$).

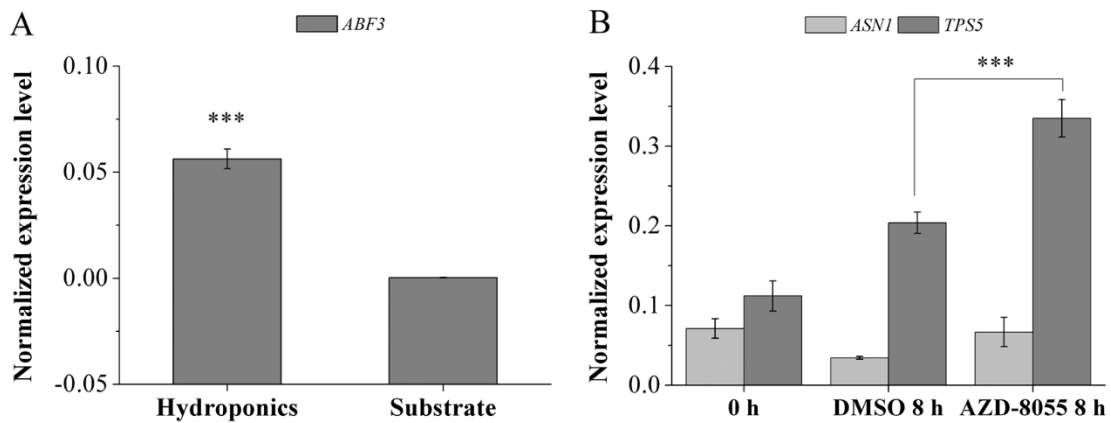
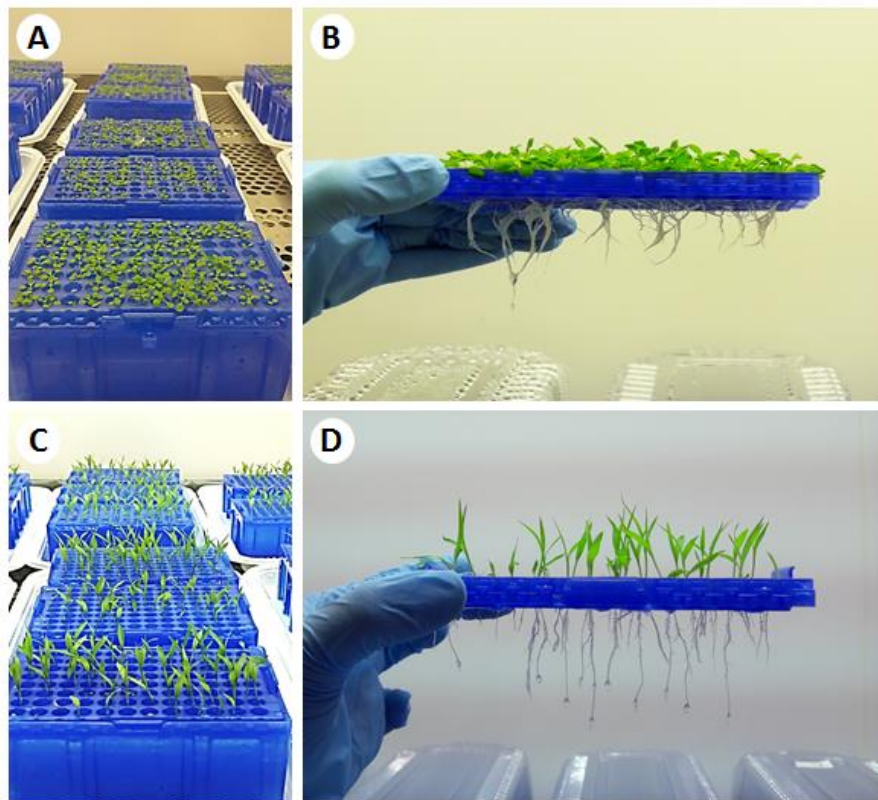


Figure 5: Expression level of stress-related genes.

(A) Comparison of *ABF3* transcripts in hydroponically and substrate-grown *Arabidopsis* Col-0 seedlings. (B) Comparison of *ASN1* and *TPS5* transcripts in *Arabidopsis* seedlings treated with 2 μ M AZD-8055 and 0.05% DMSO. The normalized expression levels are shown as $2^{-(\Delta\text{Ct})}$. The values shown are the mean $\pm$ SE ($n = 3$). Significant differences, using Student's *t*-test, are indicated by asterisks: *** ($P < 0.001$).



Supplementary Figure 1: This *in vitro* hydroponic system makes it possible to synchronize germination and obtain homogeneous seedlings.

Seeds of *A. thaliana* (C3) and *S. viridis* (C4) were germinated directly in this system. (A and C) The seedlings were homogeneous in relation to the developmental stage and the treatment was applied after 11 d (*Arabidopsis*) or 7 d (*Setaria*). (B and D) The roots grow directly toward the nutritive solution, facilitating the addition of different substances and their absorption. These results strongly indicate that this system offers an optimal environment for plant growth and can be used to efficiently perform a wide range of assays. In addition, this hydroponic system is very useful for large-scale experiments.

DISCUSSION:

This optimized hydroponic structure enables the successful *in vitro* culture of plants. Seeds germinate well on the solid medium at the pipette tip flat surface, a considerable gain in comparison to systems where seeds are soaked with the nutrient solution. A great advantage of this system is that during the seedling development, roots get directly in contact with the liquid medium without the need of transference. Moreover, chemical treatment can be easily applied in the liquid medium in a reduced volume. Humidity is kept high, avoiding the evaporation of the nutrient solution and its replenishment. In addition, homogenous growth and development during the seedling establishment can be easily obtained, and aeration is not required when working with small tanks and seedlings at this developmental stage^{1,10,18}. In order to guarantee that the system will be completely free from contaminants, a critical step is the sterilization of any material used and intensive care during its assembly. Due to the impossibility to sterilize some components in the autoclave (*e.g.*, disposable plastic boxes), it is strongly recommended to first clear them with 70% ethanol and then apply a short period of UV light before use. In our experience, the use of UV light, after sealing the flat surface with adhesive tape and during the media solidification, also avoids bacterial and fungal contamination. Furthermore, be cautious not to touch the media, always moving the pipette racks by its lateral side.

To assure the optimal growth of the seedlings, it is important to monitor the close contact between solid and liquid media, ensuring the complete immersion of the roots after the seed germination. The solid medium must be adequately dense (10 g/L agar) and totally solidified so as not to loosen from the flat surface and float into the nutrient solution. Besides *Arabidopsis*, this system can be used for growing other plant species, as long as the seeds are small enough to fit the wells of the flat. In this sense, the hydroponic method presented here was also efficient for growing *Setaria viridis*, a small grass that has recently emerged as a novel model system for studying C₄ photosynthesis, stress biology, and other bioenergy crop traits⁵⁵. Similar to *Arabidopsis*, this system allows to produce uniformly growing *Setaria* seedlings with a good root system and on a large scale (**Supplementary Figure 1**), because every rack supports 96 seeds, ensuring many seedlings per biological replicate and, consequently, sufficient material for a myriad of downstream applications. A higher number of replicates increases the efficiency of statistical testing, leading to more accurate and reliable results in experimental studies⁵⁶. For example, using a growth chamber with an area of only 1.5 m², we were able to grow 6,000 seedlings simultaneously, making it possible to perform temporal kinetics of the response to a desired treatment. Additionally, the harvested samples can be used for multiple and complementary 'omics' analyses that can demand a great amount of tissue (*e.g.*, immunoblotting). This hydroponic structure is of special interest for groups aiming to analyze distinct plant organs (*e.g.*, roots and shoots), because it enables their easy and fast separation.

A small number of studies described the use of pipette tip boxes during the initial plant development prior to a transference to bigger hydroponic tanks^{11,20}, and more recently, a very similar system was employed to evaluate the amino acid uptake and translocation in 5-week-old *Arabidopsis* plants⁵⁷. The protocol described here provides additional benefits in terms of cultivating the plants under sterile conditions.

Although this system was initially developed to grow seedlings, it could also be suitable for bigger plants. In this scenario, it is worth mentioning that care must be taken to place the seeds more distant from each other to avoid as much shading as possible during growth. Furthermore, aeration can be introduced into the racks to prevent hypoxia through one well of the pipette tip flat, a common problem in submerged *Arabidopsis* roots growing for longer periods. Due to their sessile nature, plants are subjected to several sorts of abiotic and biotic stresses, depending on their surrounding environment. Therefore, considering the aim of the study and the developmental stage, it might be important to monitor if the plants growing in this system are suffering from some sort of stress.

The results presented here have shown that this hydroponic system is very useful for the application of chemicals to the nutritive solution, particularly when working with expensive substances, due to the small volume of the pipette tip racks. We have succeeded in using this system to effectively repress the activity of TOR kinase by AZD-8055 and confirmed that the phosphorylation status of its downstream target RPS6 is already affected after 30 min of treatment application. Moreover, TOR inhibition leads to seedlings containing higher starch levels during the day and night in comparison to the control seedlings. Such assays can be easily employed to extend the observations already obtained with transgenic lines, allowing an inducible repression of the gene-encoding components of the TOR complex, or any other pathway of interest. In summary, the proposed hydroponic system possesses many advantages because it is very easy and simple to assemble, has a low cost (the major components are cheap and can be extensively reused), is versatile (enables the study of intact seedlings or distinct tissues, in specific or along plant developmental stages), and is highly scalable (it allows the cultivation of a huge number of seedlings in a very small area).

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; Grant 12/19561-0) and the Max Planck Society. Carolina C. Monte-Bello (FAPESP; Grant 14/10407-3), Elias F. Araújo (FAPESP; Grant 14/30594), Valéria Mafra (FAPESP; Grant 14/07918-6), and Viviane C. H. da Silva (CAPES/CNPq 24/2013) are grateful for the fellowships. The authors thank Christian Meyer from the Institut Jean Pierre Bourgin (INRA, Versailles, France) for generously providing antibodies against RPS6. The authors thank RTV UNICAMP and Ed Paulo Aparecido de Souza Manoel for their technical support during the audio recording.

DISCLOSURES:

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES:

1. Conn, S. J. *et al.* Protocol: Optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods*. **9**, 4 (2013).
2. Gibeaut, D. M., Hulett, J., Cramer, G. R., Seemann, J. R. Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiology*. **115**, 317-319 (1997).
3. Nguyen, N. T., McInturf, S. A., Mendoza-Cózatl, D. G. Hydroponics: A Versatile System to Study Nutrient Allocation and Plant Responses to Nutrient Availability and Exposure to Toxic Elements.

Journal of Visualized Experiments. (113), e54317 (2016).

4. Koevoets, I. T., Venema, J. H., Elzenga, J. T. M., Testerink, C. Roots Withstanding their Environment: Exploiting Root System Architecture Responses to Abiotic Stress to Improve Crop Tolerance. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 1335 (2016).

5. Arteca, R. N., Arteca, J. M. A novel method for growing *Arabidopsis thaliana* plants hydroponically. *Physiologia Plantarum*. **108**, 188-193 (2000).

6. Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., Crawford, N. M. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*. **132**, 556-567 (2003).

7. Hirai, M. Y. *et al.* Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 10205-10210 (2004).

8. Alatorre-Cobos, F. *et al.* An improved, low-cost, hydroponic system for growing *Arabidopsis* and other plant species under aseptic conditions. *BMC Plant Biology*. **14**, 69 (2014).

9. Umehara, M. *et al.* Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*. **455**, 195-200 (2008).

10. Arteca, J. M., Arteca, R. N. Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown *Arabidopsis* plants. *Physiologia Plantarum*. **112**, 104-112 (2001).

11. Bindschedler, L. V., Palmblad, M., Cramer, R. Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry*. **69**, 1962-1972 (2008).

12. Huege, J. *et al.* GC-EL-TOF-MS analysis of in vivo carbon-partitioning into soluble metabolite pools of higher plants by monitoring isotope dilution after ¹³CO₂ labelling. *Phytochemistry*. **68**, 2258-2272 (2007).

13. Berezin, I., Elazar, M., Gaash, R., Avramov-Mor, M., Shaul, O. The Use of Hydroponic Growth Systems to Study the Root and Shoot Ionome of *Arabidopsis thaliana*. In *Hydroponics: A Standard Methodology for Plant Biological Researches*. Edited by Asao, T., 135-152, InTechOpen (2012).

14. Smeets, K. *et al.* Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **46**, 212-218 (2008).

15. Huttner, D., Bar-zvi, D. An improved, simple, hydroponic method for growing *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter*. **21**, 59-63 (2003).

16. Battke, F., Schramel, P., Ernst, D. A novel method for in vitro culture of plants: Cultivation of barley

in a floating hydroponic system. *Plant Molecular Biology Reporter*. **21**, 405-409 (2003).

17. Negi, M., Sanagala, R., Rai, V., Jain, A. Deciphering Phosphate Deficiency-Mediated Temporal Effects on Different Root Traits in Rice Grown in a Modified Hydroponic System. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 550 (2016).

18. Tocquin, P. *et al.* A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. **3**, 2 (2003).

19. Schlesier, B., Bréton, F., Mock, H.-P. A hydroponic culture system for growing *Arabidopsis thaliana* plantlets under sterile conditions. *Plant Molecular Biology Reporter*. **21**, 449-456 (2003).

20. Norén, H., Svensson, P., Andersson, B. A convenient and versatile hydroponic cultivation system for *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. **121**, 343-348 (2004).

21. Martins, P. K., Ribeiro, A. P., da Cunha, B. A. D. B., Kobayashi, A. K., Molinari, H. B. C. A simple and highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. *Biotechnology Reports*. **6**, 41-44 (2015).

22. Montané, M.-H., Menand, B. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *Journal of Experimental Botany*. **64**, 4361-4374 (2013).

23. Boyes, D. C. *et al.* Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*. **13**, 1499-1510 (2001).

24. Dobrenel, T. *et al.* The *Arabidopsis* TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 1611 (2016).

25. Lunn, J. E., Furbank, R. T. Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C4 plants. *Planta*. **202**, 106-111 (1997).

26. Hendriks, J. H. M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., Geigenberger, P. ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of *Arabidopsis* and Other Plant Species. *Plant Physiology*. **133**, 838-849 (2003).

27. Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R., Heldt, H. W. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In *Methods in Enzymology*. Edited by Fleischer, S., Fleischer, B, **174**, 518-552, Academic Press. Amsterdam, The Netherlands (1989).

28. Caldana, C. *et al.* Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **73**, 897-909 (2013).

29. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative

PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. **25**, 402-408 (2001).

30. Dobrenel, T. *et al.* Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? *Frontiers in Plant Science*. **4**, 93 (2013).

31. Moreau, M. *et al.* Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/G β L, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *The Plant Cell*. **24**, 463-481 (2012).

32. Deprost, D. *et al.* The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*. **8**, 864-870 (2007).

33. Menand, B. *et al.* Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 6422-6427 (2002).

34. Mahfouz, M. M., Kim, S., Delauney, A. J., Verma, D. P. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase in Response to Osmotic Stress Signals. *The Plant Cell*. **18**, 477-490 (2006).

35. Zhang, R. *et al.* ScFKBP12 bridges rapamycin and AtTOR in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*. **8**, e26115 (2013).

36. Schepetilnikov, M. *et al.* TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *The EMBO Journal*. **32**, 1087-1102 (2013).

37. Schepetilnikov, M. *et al.* Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *The EMBO Journal*. **30**, 1343-1356 (2011).

38. Xiong, Y. *et al.* Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*. **496**, 181-186 (2013).

39. Creff, A., Sormani, R., Desnos, T. The two Arabidopsis RPS6 genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent. *Plant Molecular Biology*. **73**, 533-546 (2010).

40. Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S. C., Thomas, G., Nagy, F. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **134**, 1527-1535 (2004).

41. Gibon, Y. *et al.* Adjustment of diurnal starch turnover to short days: Depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the followin. *Plant Journal*. **39**, 847-862 (2004).

42. Smith, A. M., Stitt, M. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment*. **30**, 1126-1149 (2007).

43. Smith, A. M., Zeeman, S. C., Smith, S. M. Starch Degradation. *Annual Review of Plant Biology*. **56**, 73-98 (2005).
44. Orzechowski, S. Starch metabolism in leaves. *Acta Biochimica Polonica*. **55**, 435-445 (2008).
45. Gibon, Y. *et al.* Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell & Environment*. **32** (7), 859-874 (2009).
46. Kim, J. B., Kang, J. Y., Soo, Y. K. Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal*. **2**, 459-466 (2004).
47. Vishwakarma, K. *et al.* Absciscic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*. **8**, 161 (2017).
48. Yoshida, T. *et al.* Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*. **38**, 35-49 (2015).
49. Koch, K. E. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **47**, 509-540 (1996).
50. Price, J., Laxmi, A., St Martin, S. K., Jang, J.-C. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **16**, 2128-2150 (2004).
51. Thimm, O. *et al.* mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*. **37**, 914-939 (2004).
52. Bläsing, O. E. *et al.* Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **17**, 3257-3281 (2005).
53. Osuna, D. *et al.* Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*. **49**, 463-491 (2007).
54. Yadav, U. P. *et al.* The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *Journal of Experimental Botany*. **65**, 1051-1068 (2014).
55. Brutnell, T. P. *et al.* *Setaria viridis*: A Model for C4 Photosynthesis. *The Plant Cell*. **22**, 2537-2544 (2010).
56. Altman, N., Krzywinski, M. Points of Significance: Clustering. *Nature Methods*. **14**, 545-546 (2017).
57. Pratelli, R., Boyd, S., Pilot, G. Analysis of amino acid uptake and translocation in *Arabidopsis* with a low-cost hydroponic system. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. **179**, 286-293 (2016).

4. Efeito da inibição da TOR por AZD-8055 no metabolismo primário de plântulas de *Arabidopsis thaliana*

4.1. Introdução

O metabolismo é uma rede dinâmica complexa e altamente integrada, cuja função biológica é sustentar o crescimento, síntese ou *turnover* de compostos de reserva, e acúmulo de metabólitos que possuem um papel importante para a adaptação aos estresses bióticos e abióticos, maximizando a sobrevivência e reprodução (STITT; SULPICE; KEURENTJES, 2010; SULPICE; MCKEOWN, 2015). Uma das principais respostas da inibição da via TOR em eucariotos, incluindo plantas, é o impacto causado no metabolismo primário, uma vez que essa quinase atua como um regulador central integrando a sinalização de nutrientes (C, N e S) e energia para conduzir diversos módulos da rede metabólica envolvida no controle do crescimento (BROACH, 2012; CALDANA et al., 2013; CRESPO et al., 2002; REN et al., 2012; XIONG; SHEEN, 2013). Um exemplo é a função desta quinase como um importante sensor da disponibilidade de N, atuando na percepção dos níveis do aminoácido glutamina em leveduras e mamíferos. Em condições normais de crescimento e disponibilidade de N em leveduras, TOR fosforila o ativador transcricional GLN3, que por sua vez interage com a proteína repressora URE2, restringindo sua localização ao citoplasma (CARDENAS et al., 1999; TATE et al., 2009). Contudo, em situações de limitação de N ou frente à inibição da TOR por rapamicina, GLN3 é desfosforilada pela ação das fosfatases SIT4 e PP2A (BECK; HALL, 1999; TATE et al., 2006, 2009), liberada da interação com URE2 e translocada para o núcleo, onde ativa a expressão de genes envolvidos na assimilação de fontes alternativas de N gerando precursores para a síntese de proteínas (CARDENAS et al., 1999; CRESPO et al., 2002; TATE; COOPER, 2013). Atualmente, apesar do exato mecanismo de detecção de N permanecer desconhecido em plantas (GENT; FORDE, 2017), diversas linhas de evidências apontam para um papel importante da TOR no sensoramento deste nutriente. Redução nos níveis de expressão de TOR e outros componentes do complexo levam à alterações massivas no conteúdo de diversos aminoácidos e na expressão de genes que codificam transportadores e enzimas envolvidas no metabolismo de N (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; REN et al., 2012). Entretanto, os sinalizadores, sejam metabólitos nitrogenados ou outros alvos cascata acima, bem como os substratos diretos da TOR ainda são desconhecidos. Muitos dos módulos controlados por TOR são dependentes do metabolismo e além de terem a mesma função biológica, possuem

as proteínas alvos conservadas em todos os eucariotos, como é o caso do controle da autofagia e síntese proteica (HENRIQUES et al., 2014). Contudo, há certos processos, que apesar de controlarem o mesmo recurso biológico, possuem regulações mediadas por TOR que são espécie- ou tecido-específica, como é o caso da influência da TOR no acúmulo dos compostos de reserva análogos - amido e glicogênio. O acúmulo de amido em plantas com repressão da TOR é remanescente ao fato de que a repressão do TORC1 em leveduras e mamíferos ocasiona acúmulo de glicogênio (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; SCHMELZLE et al., 2004). Ademais, TOR afeta o conteúdo de triacilgliceróis (TAGs) (CALDANA et al., 2013; IMAMURA et al., 2015; JÜPPNER et al., 2018), modula a composição da parede celular (LEIBER et al., 2010) e a transdução de sinais mediados por hormônios como a auxina (DENG et al., 2016; SCHEPETILNIKOV et al., 2013).

Grande parte dos estudos em plantas mostram o envolvimento da via TOR na regulação de módulos metabólicos de forma mais descritiva. Contudo, eles avaliam respostas tardias de supressão desta quinase (pelo menos 3 dias após a repressão) (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; REN et al., 2012), dificultando a distinção entre respostas primárias e efeitos pleiotrópicos. Em outros eucariotos, como animais e leveduras, grande parte dos avanços na elucidação dos mecanismos envolvendo TOR no controle do metabolismo se deve a facilidade de inibir específica e reversivelmente o complexo TOR através do inibidor rapamicina (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Recentemente, uma nova classe de inibidores químicos que atuam no sítio ativo de ligação de ATP do domínio quinase da TOR (AZD-8055, TORIN1, KU63794) (DOWLING et al., 2010) tem sido usada para caracterizar a sinalização da TOR em plantas (DONG et al., 2015; MONTANÉ; MENAND, 2013). Diferentemente da abordagem com linhagens transgênicas de RNAi e microRNA artificial, as quais apresentam redução na expressão dos transcritos dos genes alvos, estes inibidores químicos bloqueiam todo o TORC fornecendo um sistema altamente rápido, induzível, seletivo e reversível (DONG et al., 2015; MONTANÉ; MENAND, 2013; SCHEPETILNIKOV et al., 2013). Portanto, estes inibidores devem ajudar consideravelmente na identificação de novos alvos da quinase TOR em plantas, bem como sua interconexão específica com o *status* energético celular. A constatação de que estas drogas inibem eficientemente o crescimento de diferentes espécies de plantas (*Nicotiana benthamiana*, *Lotus japonicus*, *Panicum miliaceum* e *Oryza sativa*) mostra que elas podem ser usadas para entender o grau de conservação da via TOR entre as angiospermas (MONTANÉ; MENAND, 2013).

Um outro desafio nos estudos que investigam a função da TOR no metabolismo vegetal está relacionado a sua natureza fotoautotrófica. O estágio de desenvolvimento mais crítico no ciclo de vida das plantas é o período após a germinação, quando as plântulas necessitam passar do estágio heterotrófico (em que são dependentes da reserva da semente e não necessitam de luz para o crescimento) para o autotrófico antes que os nutrientes estocados nos cotilédones se esgotem (fase que compreende de 4 a 5 dias em *Arabidopsis*) (KIRCHER; SCHOPFER, 2012). Após esta transição, diferentemente de outros organismos que obtêm energia e nutrientes fornecidos a partir de uma dieta, plantas utilizam a energia luminosa para fixar C atmosférico em açúcares pelo processo de fotossíntese (KOCH, 2004; LI; TERZAGHI; DENG, 2012). Além do seu papel nutricional, os açúcares também atuam como sinalizadores do *status* energético (LASTDRAGER; HANSON; SMEEKENS, 2014; WINGLER, 2018). Foi comprovado que TOR participa na transição do crescimento heterotrófico para autotrófico promovendo o crescimento das raízes através da detecção de um sinal de glicose gerado no meristema radicular (XIONG et al., 2013). Na parte aérea, porém, para que TOR seja ativada no meristema apical caulinar é necessário combinar a sinalização de glicose e luz (LI et al., 2017b). Por serem organismos sésseis, as plantas estão frequentemente expostas à mudanças ambientais como a alteração de ciclos entre luz e escuro, que modifica massivamente o metabolismo em diferentes níveis (BLASING et al., 2005; GIBON et al., 2006) e têm como resultado final do balanço entre estes ciclos o crescimento e produção de biomassa. Um exemplo é a dependência das reservas provenientes da fotossíntese estocadas durante o dia para suportar o crescimento e a manutenção das atividades metabólicas durante a noite (SMITH; STITT, 2007; STITT; LUNN; USADEL, 2010). Nenhum estudo até o momento avaliou o impacto da TOR no metabolismo de maneira dinâmica e levando em consideração a importância do ciclo diurno para o crescimento das plantas.

O objetivo deste capítulo foi investigar de maneira global como a cinética da inibição da via TOR afeta plântulas de *A. thaliana* em fase inicial de desenvolvimento, através de análise de perfis metabólicos ao longo de um ciclo diurno.

4.2. Resultados e discussão

Como forma de identificar as respostas primárias da inibição da via TOR no metabolismo central, plântulas de *A. thaliana* no estágio de duas folhas não cotiledonares totalmente expandidas - estágio 1.04 da escala BBCH (BOYES et al., 2001) foram tratadas com

o AZD-8055 (2 μ M) ou DMSO (0,05%, controle) cerca de 15 min antes do início do período de luz (Item **2.3.2. Material e Métodos**). Amostras foram coletadas a cada 4 h após o início do tratamento ao longo de um ciclo diuturno e analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (GC-TOF-MS), uma plataforma sensível e robusta amplamente utilizada para a caracterização de metabólitos primários em plantas (HILL; UTE, 2013; LISEC et al., 2006). Esta análise permitiu a identificação de 66 compostos associados ao metabolismo central, incluindo ácidos orgânicos, açúcares, açúcares álcoois e aminoácidos. Diante da complexidade dos dados - número de compostos, pontos de coleta e tratamentos - foi, primeiramente, realizada uma análise multivariada, denominada análise de componentes principais (PCA) para obter uma visão global dos dados. A PCA permite a redução da dimensão dos dados através da transformação das informações originais em vetores ortogonais, com o primeiro vetor cobrindo a maior variância subjacente no conjunto de dados e mostrando uma separação clara ao longo da componente principal 1 (PC1), seguida pela PC2. Os resultados desta análise demonstram uma separação entre os tratamentos ao longo da PC1 (responsável por 40% da variação entre os dados), sendo que os metabólitos ornitina (0,17) e sacarose (0,11) foram os compostos que mais contribuíram para a separação das amostras tratadas com DMSO, enquanto que os aminoácidos isoleucina (-0,36), leucina (-0,35) e lisina (-0,33) foram responsáveis pela distinção das amostras tratadas com AZD-8055 (**Figura 4.1**). Conforme esperado, o acúmulo de aminoácidos, especialmente os de cadeia ramificada, já foi reportado após a repressão de componentes do complexo TOR em *Arabidopsis* (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012), na alga *Chlamydomonas reinhardtii* (JÜPPNER et al., 2017; LEE; FIEHN, 2013) e em leveduras (CHEN; KAISER, 2003). Esta resposta foi previamente associada a uma consequência da alteração na interação do TORC e seus alvos diretos como a inibição da tradução mediada pela fosforilação da proteína ribossomal S6 quinase (S6K) (SCHEPETILNIKOV et al., 2011) ou aumento na reciclagem de proteínas através da repressão da fosforilação de quinases envolvidas no processo de autofagia como *autophagy-related 1* (ATG1) e sua proteína parceira ATG13 (HE; KLIONSKY, 2009; KIM; GUAN, 2011; PU; LUO; BASSHAM, 2017).

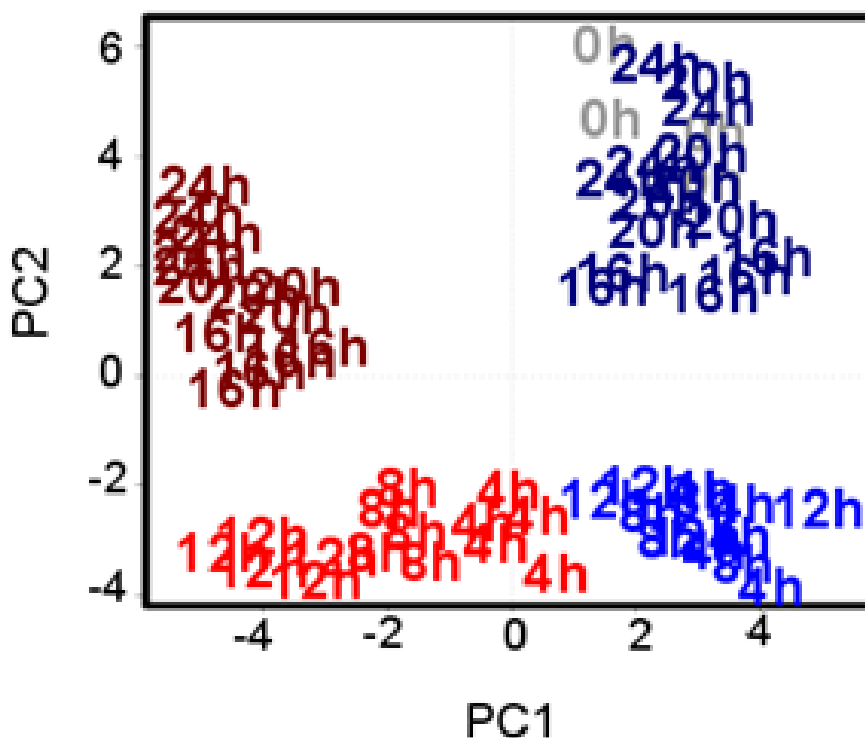


Figura 4.1. Efeito da repressão da atividade de TOR no metaboloma de plântulas de *Arabidopsis* ao longo de um ciclo diurno.

Diferenças nos metabólitos primários obtidos através de GC-TOF-MS foram avaliadas pela análise de componentes principais (PCA). Plântulas Col-0 foram cultivadas em fotoperíodo de 12 horas e tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou 2 μ M de AZD-8055 por 24 horas. A aplicação do tratamento ocorreu ao fim da noite. Amostras estão codificadas por tempo (h) de coleta e tipo de tratamento (plântulas controle estão representadas pela cor azul, e as tratadas com AZD-8055 em vermelho). Plântulas coletadas antes da aplicação dos tratamentos correspondente ao tempo 0 h estão em cinza (n = 4).

A segunda maior componente responsável pela variação dos dados, PC2 (31%), pode ser atribuída às diferenças no metabolismo primário ao longo do ciclo diurno. Neste caso, glicina (-0,44), sorbose (-0,36) e malato (-0,21) foram responsáveis pela separação das amostras durante o período de luz, enquanto que maltose (0,31), GABA (4-aminobutanoato) (0,19) e citrato (0,18) distinguiram as amostras coletadas no escuro (**Figura 4.1**). Maltose, GABA e citrato apresentam um padrão similar de baixos níveis ao longo do dia, mas acumulam durante a noite. A maltose é o principal produto da degradação de amido e é a forma na qual o C é exportado para o citosol para sustentar a respiração foliar, síntese e exportação de sacarose (HEJAZI et al., 2009; WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004; ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2007). GABA tem sido considerado como uma molécula armazenadora de N. Em condições normais de suprimento de N, GABA aumenta durante o período noturno, porém este acúmulo é reduzido sob privação de N (ALLAN; SHELPS, 2006). A expressão de genes que codificam

enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos incluindo citrato sintase, 2-oxoglutarato desidrogenase e succinato desidrogenase apresentam alterações diurnas acompanhadas pelo acúmulo ou degradação dos metabólitos correspondentes (POPOV et al., 2010; SCHEIBLE; KRAPP; STITT, 2000). Além disso, a luz regula a enzima citrato sintase que catalisa a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato para formar citrato, e inibir a síntese do mesmo durante o dia (BUDDE; RANDALL, 1990; SCHEIBLE; KRAPP; STITT, 2000). Assim, o citrato sintetizado no escuro é armazenado no vacúolo e usado para a síntese de 2-oxoglutarato na mitocôndria ou aminoácidos no citosol durante o período de luz (GAUTHIER et al., 2010; SWEETLOVE et al., 2010). Devido a distinção das amostras tratadas e controles já nas primeiras horas de tratamento, foi avaliada a dinâmica da resposta dos metabólitos individuais frente à inibição da TOR ao longo do ciclo diurno através da análise de um *heatmap* (**Figura 4.2**).

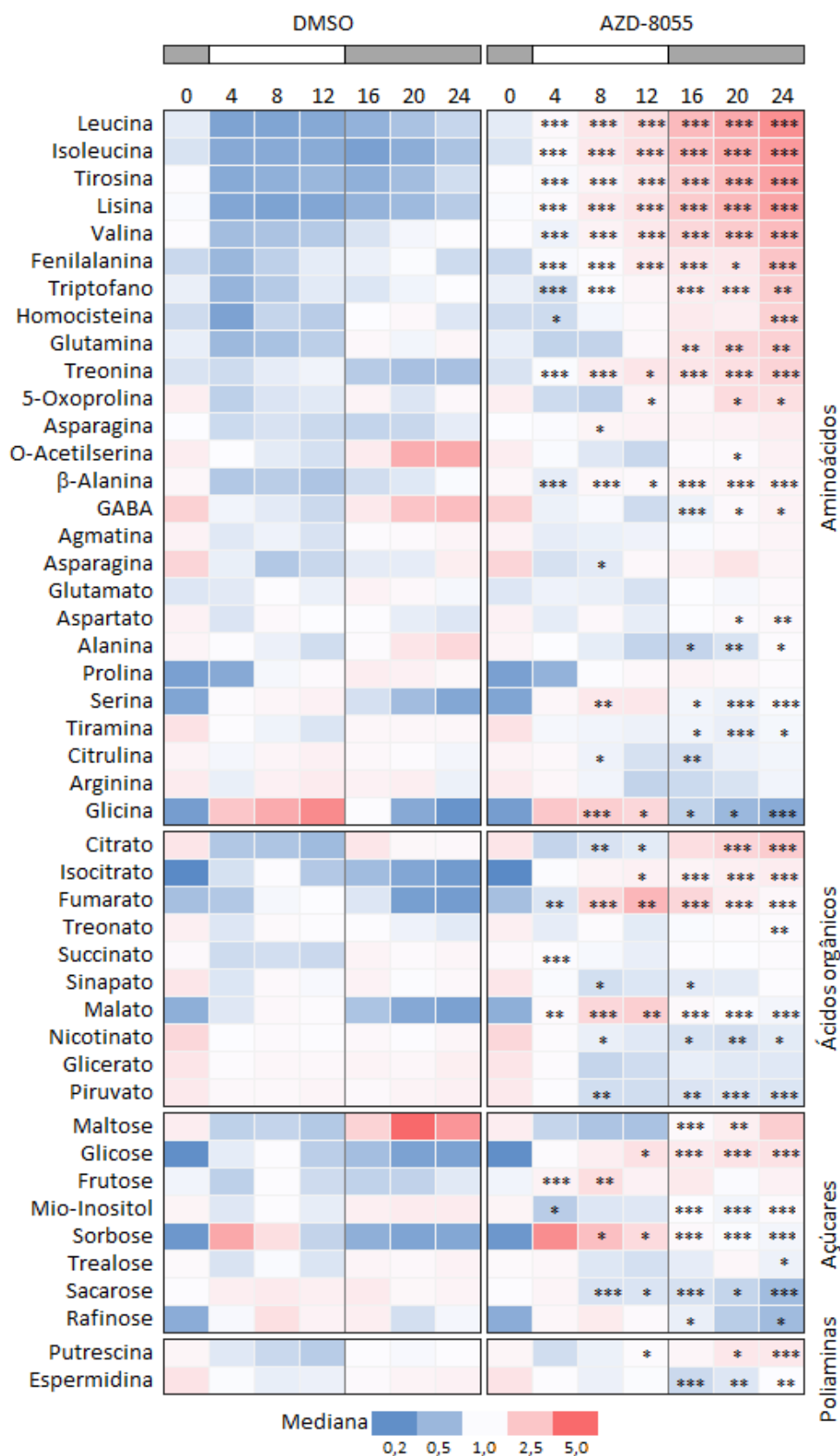


Figura 4.2. Heatmap representando mudanças nos níveis de metabólitos frente à inibição da TOR em plântulas de *Arabidopsis* ao longo de um ciclo diurno.

Perfis de metabólitos de plântulas Col-0 cultivadas em fotoperíodo de 12 h e tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou com 2 μM de AZD-8055 obtidos por GC-TOF-MS. O tratamento foi iniciado ao fim

da noite. A escala é representada pelo valor da mediana das amostras coletadas em cada ponto (n=4). As intensidades das cores azuis e vermelhas representam menor e maior quantidade de metabólitos, respectivamente. As diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asteriscos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

Aminoácidos e poliaminas

Assim como os aminoácidos de cadeia ramificada observados como responsáveis pela distinção das amostras tratadas com AZD-8055 na PC1, os níveis dos aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) e lisina também aumentaram logo nas primeiras 4 h após a aplicação do inibidor da TOR, e mantiveram-se elevados durante todo o ciclo diuturno (**Figura 4.2**). Um dos fenótipos da inibição da via TOR bem caracterizado em leveduras e mamíferos, e apresentado na introdução, é a redução da síntese de proteínas devido ao bloqueio da tradução de RNAm pela fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF2 (SCHMELZLE, T., AND HALL, 2000; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). Em plantas pouco se sabe sobre este processo, porém uma hipótese para explicar este acúmulo de aminoácidos seria a redução da incorporação dos mesmos para a síntese de proteínas. Desta forma, estes aminoácidos poderiam ser utilizados como esqueletos de C para a síntese de ácidos orgânicos no ciclo do TCA ou servir como moléculas doadoras de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial gerando energia para célula quando há limitação de recursos e energia (ARAÚJO et al., 2011).

Os aminoácidos também desempenham papéis fundamentais durante processos de sinalização (HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014). Embora tenha sido demonstrado que a leucina é capaz de regular a expressão de diversos genes em *Arabidopsis* (HANNAH et al., 2010), sua função sinalizadora ainda não foi esclarecida em plantas. Em leveduras e mamíferos, vários estudos mostraram que o TORC1 é ativado por aminoácidos como leucina (COHEN; HALL, 2009; HARA et al., 1998), glutamina (CRESCO et al., 2002) e arginina (SHIMOBAYASHI; HALL, 2016). Em células animais, as proteínas do complexo *Ragulator* *GTPases*, MAPKSP1, ROBLD3 e c11orf59, ligam-se à membrana lisossômica após a regulação por aminoácidos específicos como leucina e arginina (EFEYAN; COMB; SABATINI, 2015; HARA et al., 1998) servindo como local de ancoragem para a associação do TORC às endomembranas e para que seja ativada através da interação com a proteína de ligação ao GTP *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) (BAR-PELED; SABATINI, 2014; EFEYAN; COMB; SABATINI, 2015; SANCAK et al., 2008; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011). Desta forma, alguns aminoácidos

possuem um papel fundamental na sinalização do *status* de N através da via TOR (TATE et al., 2006, 2009). Em plantas, candidatos a essa função são glutamina, leucina e arginina (KINGSBURY; SEN; CARDENAS, 2015; SHIMOBAYASHI; HALL, 2016), contudo ainda não se sabe se o modo de regulação é conservado e envolve TOR.

Os dados no *heatmap* mostram que os níveis de compostos diretamente ligados ao metabolismo de N, como os aminoácidos transportadores de N asparagina, aspartato e glutamina (LAM et al., 1996), foram aumentados em plântulas tratadas com AZD-8055 principalmente durante a noite, período em que a assimilação de N é reduzida (MATT et al., 2001). A glutamina, produto do primeiro passo da via de assimilação de N (LEA; FORD, 1994) apresentou tendência a aumentar durante o dia em plântulas tratadas com AZD-8055 sendo o acúmulo significativo durante todo período de escuro. Este resultado corrobora com experimentos anteriores que demonstraram aumento na expressão de genes envolvidos na assimilação de N e no acúmulo de glutamina em plantas com repressão de TOR (MOREAU et al., 2012). Entretanto, a análise da razão glutamina: glutamato envolvida na regulação da quantidade de N nas células (FRITZ et al., 2006; HACHIYA et al., 2012) aumentou após 12 h de tratamento com AZD-8055 (dados não mostrados). Como consequência, foi observada uma redução das aminas arginina, ornitina e citrulina com papel importante na reciclagem de N 8 h após a aplicação do inibidor do TORC. As aminas também são precursoras da síntese de poliaminas (espermidina e putrescina) importantes para diversos processos relacionados ao desenvolvimento e crescimento das plantas como alongamento celular, formação de raízes, iniciação e desenvolvimento florais, senescência e respostas à estresse (LEHMANN et al., 2012; MATTOO; MINOCHA, 2010; TAKAHASHI; KAKEHI, 2010). Enquanto a putrescina encontra-se significativamente aumentada a partir de 8 h após a aplicação do AZD-8055 mantendo-se elevada durante todo o ciclo diurno, a espermidina tem resposta contrária apresentando-se reduzida durante o período da noite se comparado ao controle. Interessantemente, o GABA, metabólito responsável pela separação das amostras ao longo do ciclo diurno no PC2, e que se encontra reduzido em plantas com a via TOR inibida, pode ser sintetizado pela degradação de poliaminas principalmente a putrescina, ou pelo GABA *shunt* a partir do glutamato (YANG; YIN; GU, 2015), o qual também se encontra reduzido durante todo o ciclo diurno em plântulas tratadas com AZD-8055. Após ser catabolizado por enzimas do GABA *shunt* na mitocôndria, GABA é convertido em succinato para ser utilizado no ciclo do TCA e como um doador de elétrons da cadeia de transporte de elétrons

mitocondriais (BOUCHE; FROMM, 2004). Em conjunto, plântulas com a via TOR inibida apresentaram uma alteração rápida nos níveis dos aminoácidos ao longo do ciclo diurno, em especial aqueles com potencial para atuarem como esqueletos de C para síntese de ácidos orgânicos (aminoácidos de cadeia ramificada, aromáticos e lisina) ou os diretamente envolvidos na assimilação de N (glutamato e glutamina), sugerindo que estes metabólitos podem auxiliar no balanço de C e N e na respiração.

Açúcares solúveis e insolúveis

A sacarose, principal açúcar de transporte em plantas (LUNN, 2016), foi um dos principais metabólitos responsáveis pela separação das amostras tratadas com AZD-8055 e controle na PC1 (**Figura 4.1**). Em condições normais de crescimento, os níveis de sacarose não sofrem grandes alterações ao longo do ciclo diurno devido a diferentes mecanismos que visam manter a homeostase desse açúcar, como o balanço entre síntese, transporte e uso integrado às vias de sinalização como a da trealose-6-fosfato (Tre6P) (FIGUEROA et al., 2016; YADAV et al., 2014). Vale ressaltar que nessa análise de perfil metabólico o *pool* total dos compostos foi mensurado nas plântulas, impossibilitando distinguir o conteúdo de sacarose entre órgãos e compartimentos celulares. Plântulas com a via TOR inibida apresentaram níveis significativamente reduzidos de sacarose após 8 h da aplicação do tratamento, que se mantiveram menores até o final da noite (**Figura 4.2**). Interessantemente, enquanto a sacarose foi reduzida, os níveis dos produtos de sua hidrólise, as hexoses glicose e frutose, aumentaram expressivamente ao longo do ciclo diurno em plântulas tratadas com AZD-8055 se comparado com o controle. Estes resultados apontam algumas hipóteses que necessitam ser exploradas para explicar as diferenças nos níveis de sacarose e suas hexoses correspondentes. Seria interessante acessar as atividades das enzimas invertases, responsáveis pela hidrólise da sacarose em diferentes compartimentos celulares (ROITSCH; GONZÁLEZ, 2004). Pelo fato do metabolismo da sacarose ser fortemente associado com a sinalização de açúcares, tanto pela molécula sinalizadora Tre6P considerada um sinal específico de sacarose (LUNN et al., 2006; YADAV et al., 2014), quanto pela geração de moléculas como glicose e frutose (ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006), seria importante verificar como as vias de sinalização associadas à sacarose respondem à inibição da TOR.

A partição de fotoassimilados entre sacarose e amido varia bastante entre espécies sendo que o excedente de C é particionado na forma de amido (STITT; ZEEMAN, 2012). O amido é a forma mais comum de armazenamento de C em plantas e sua abundância está correlacionada negativamente com o crescimento (RAMON; ROLLAND; SHEEN, 2008; SULPICE et al., 2009). O fenótipo de acúmulo de amido é reportado em diferentes estudos com linhas transgênicas de TOR (CALDANA et al., 2013; DOBRENEL et al., 2011; MOREAU et al., 2012). Desta forma, o conteúdo de amido foi analisado ao longo do ciclo diurno em plântulas controle e tratadas com AZD-8055 para verificar se a redução dos níveis de sacarose ocorre como resultado de uma alteração na partição em amido.

Em condições normais de crescimento, o amido é sintetizado durante o dia e degradado durante a noite de forma linear, fornecendo energia para diversas atividades metabólicas como crescimento, respiração e exportação de C (GEIGER; SERVAITES, 1994; GRAF et al., 2010; SMITH; STITT, 2007). Em plântulas tratadas com AZD-8055, os níveis de amido apresentaram-se significativamente aumentados durante o dia a partir de 4 h após a aplicação do tratamento e mantiveram-se elevados durante toda a noite em relação às plântulas controle (**Figura 4.3**). A degradação de amido no período noturno gera maltose (WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004), um dos principais metabólitos responsáveis pela separação, na PCA, entre amostras coletadas no período da noite (**Figura 4.1**). Os níveis de maltose apresentaram-se significativamente reduzidos durante toda noite em plântulas tratadas com AZD-8055, sugerindo que o acúmulo de amido nessas plântulas pode ser, pelo menos em parte, devido à menor degradação deste polímero de reserva (**Figura 4.3**). O perfil de aumento no conteúdo de amido ao longo de todo ciclo diurno em plântulas tratadas com AZD-8055, é similar ao fenótipo observado em plantas transgênicas com a via TOR condicionalmente reprimida (CALDANA et al., 2013; REN et al., 2012). Estes resultados sugerem que as alterações nos níveis dos açúcares podem ser resultado de uma alteração na partição de C.

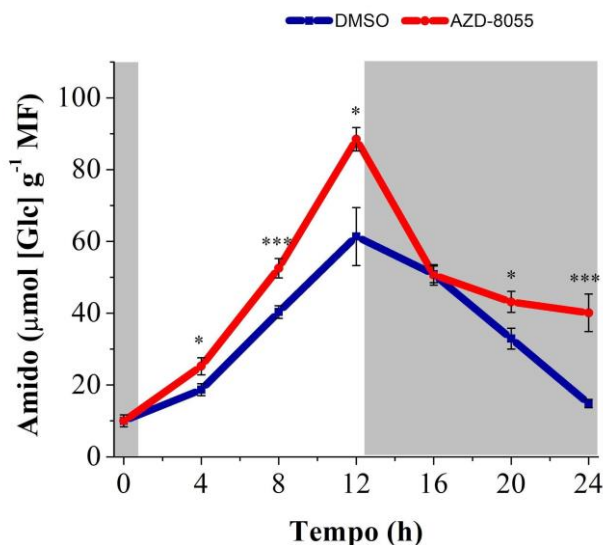


Figura 4.3. Efeito da inibição da TOR no metabolismo de amido em plântulas de *A. thaliana* ao longo de um ciclo diurno.

Conteúdo de amido foi mensurado enzimaticamente. Plântulas tratadas com AZD-8055 estão representadas pela cor vermelha enquanto plântulas controle (DMSO) estão em azul. As cores cinza e branca ao fundo do gráfico correspondem ao período de escuro e de luz, respectivamente. Diferenças significativas entre plantas tratadas com AZD-8055 e plantas controle, calculadas pelo teste T, são indicadas por asterisco (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$); ($n = 4$).

Ácidos orgânicos intermediários do ciclo do TCA

O ciclo do TCA é um componente crucial do metabolismo respiratório. Nesta via, ao mesmo tempo que as conversões dos ácidos orgânicos intermediários do TCA suportam a síntese de ATP e poder redutor na forma de NADH para a cadeia respiratória, os mesmos também estão claramente inseridos em uma ampla rede metabólica permitindo que a atividade deste ciclo contribua para outros aspectos do metabolismo, incluindo a síntese de lipídeos, aminoácidos e metabólitos secundários (ARAÚJO et al., 2012; POPOV et al., 2010). Assim, a organização do metabolismo do ciclo do TCA em plantas é altamente dependente das demandas metabólicas e fisiológicas da célula, sendo que modos de fluxo alternativo, não cíclico, ocorrem nas folhas durante a luz e em circunstâncias fisiológicas específicas, como a anoxia (SWEETLOVE et al., 2010).

Em plântulas tratadas com AZD-8055, os intermediários do ciclo do TCA citrato, isocitrato, succinato, fumarato e malato apresentaram níveis significativamente alterados ao longo de todo o ciclo diurno em comparação com o controle (**Figura 4.2**). Estes resultados são similares aos de trabalhos anteriores que analisaram a resposta de inibição da TOR a longo prazo (CALDANA et al., 2013; REN et al., 2012), sendo o aumento dos ácidos orgânicos atribuído a uma maior atividade do ciclo do TCA. Tal fato pode ocorrer para reorganização do

metabolismo para a respiração e manutenção das necessidades da célula apesar do crescimento restrito da planta, o que também pode levar às mudanças complexas no metabolismo e uso de N (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; XIONG; SHEEN, 2014). Além de gerar energia, o ciclo do TCA produz esqueletos de C na forma de 2-oxoglutarato para síntese de glutamato através da enzima GOGAT, uma das etapas iniciais de assimilação de N (NUNES-NESI; FERNIE; STITT, 2010; STITT et al., 2002). Para controlar o balanço entre C e N, as plantas também necessitam sensoriar o *status* de N e regular a absorção e a redução do nitrato adequadamente (FORDE, 2002; STITT et al., 2002). Em leveduras, consistente com o fato de que a rapamicina mimetiza baixas fontes de C, os fatores de transcrição de resposta retrógrada mitocondrial Rtg1p e Rtg3p são translocados para o núcleo após o tratamento com rapamicina para promover a transcrição precoce de genes responsáveis pela síntese de ácidos orgânicos no ciclo do TCA levando ao aumento da respiração (CHEN et al., 2017; KOMEILI et al., 2000; SHAMJI; KURUVILLA; SCHREIBER, 2000). Em *Caenorhabditis elegans*, também já foi mostrado que o 2-oxoglutarato retarda o envelhecimento e prolonga a vida útil desse organismo em 50% através da inibição da ATP sintase e TOR (CHIN et al., 2014). Apesar das respostas parecerem similares, ao contrário dos outros organismos, em plantas pouco se sabe sobre os mecanismos de controle da via TOR sobre o ciclo do TCA.

Os primeiros metabólitos que atuam como intermediários do ciclo do TCA, citrato e isocitrato, apresentaram níveis aumentados principalmente durante o período da noite em plântulas tratadas com AZD-8055 se comparado ao controle, sendo condizente com o período de ativação da enzima piruvato desidrogenase que pela conversão de piruvato em acetil-CoA e concomitante liberação de CO₂ e redução de NAD⁺ em NADH permite a síntese de citrato (BUDDE; RANDALL, 1990). Quanto ao succinato, o mesmo apresentou níveis significativamente aumentados somente durante o período de luz em plântulas tratadas com AZD-8055. Este metabólito juntamente com a enzima succinato desidrogenase, estão envolvidos no transporte de elétrons e de NADH do ciclo do TCA para o complexo II da cadeia respiratória (ARAÚJO et al., 2011b; HUANG; MILLAR, 2013). Vale lembrar que o succinato também pode ser sintetizado via GABA para atuar como substrato na cadeia respiratória mitocondrial (BOUCHE; FROMM, 2004). Por fim, o fumarato e o malato mantiveram o padrão de acúmulo durante o dia e decréscimo durante a noite já conhecido nesta espécie, sendo mais pronunciado em plântulas tratadas com AZD-8055, nas quais a partir de 4 h de luz já eram significativos em relação ao controle seguindo em maiores níveis durante todo o período

de estudo. O perfil observado nesses metabólitos é similar ao encontrado para o conteúdo de amido em plântulas com a via TOR inibida (**Figura 4.3**). Esses ácidos orgânicos podem ser utilizados como uma fonte alternativa de dreno de C para os fotoassimilados (FAHNENSTICH et al., 2007; PRACHAROENWATTANA et al., 2010; ZELL et al., 2010). Eles também participam de múltiplas vias no metabolismo vegetal e como compartilham similaridades químicas torna-se difícil distinguir entre suas funções biológicas (ARAÚJO; NUNES-NESI; FERNIE, 2011). O acúmulo de malato durante o dia atua como um controlador de ânions para a regulação do pH durante a assimilação de nitrato (SCHEIBLE et al., 1997). Já o fumarato é altamente concentrado em caules (STUMPF; BURRIS, 1981) e exsudatos do floema (CHIA et al., 2000) e parece estar envolvido na partição de C.

Em resumo, os níveis de vários ácidos orgânicos intermediários do ciclo do TCA, exceto succinato, aumentaram significativamente após as primeiras 4 horas de repressão da TOR em comparação com plantas controle tratadas com DMSO, sugerindo um fluxo maior para esses compostos ou uma redução na atividade das enzimas do ciclo. Estes metabólitos são um dos pontos importantes que interconectam os metabolismos de C e N, e entender de maneira compreensiva as diferentes esferas da regulação deste balanço é de extrema relevância para dissecar o controle do crescimento e partição de nutrientes.

4.3. Considerações finais

Diversas linhas de evidência surgiram nos últimos anos indicando que TOR é uma quinase essencial em plantas. A abordagem utilizada neste trabalho confirmou que TOR exerce grande influência no metabolismo primário de plântulas. Entretanto, pela primeira vez, foi mostrada uma análise cinética de tempos curtos apontando que já nas primeiras horas após o tratamento com AZD-8055 é possível observar uma acentuada alteração nos níveis de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares, consistente com resultados já descritos na literatura (CALDANA et al., 2013; DOBRENEL et al., 2013; REN et al., 2012). Os resultados claramente indicam que a inibição da TOR altera a partição de C ao longo do ciclo diurno, principalmente, entre sacarose e amido. Amido e proteína são considerados *pools* estruturais de C importantes para o controle do crescimento vegetal (SULPICE et al., 2009). Apesar do papel da TOR na regulação da tradução ser claro, não se sabe se há um envolvimento desta via também no controle de outros *pools* de C estruturais e não-estruturais. No capítulo 5, será

explorada a interação entre a via TOR com outras vias de sinalização de açúcar no controle do conteúdo de amido.

5. A inibição do TORC desacopla a sinalização de açúcar e a partição de carbono em plântulas de *Arabidopsis thaliana*

5.1. Introdução

As plantas controlam seu crescimento ajustando seu metabolismo de acordo com a alocação e suprimentos de C. O C fixado através da fotossíntese em órgãos fonte é utilizado para a síntese de açúcares, entre os quais a sacarose é considerado um dos produtos finais (SMEEKENS et al., 2010). A sacarose sintetizada é usada como fonte de energia para manter o metabolismo vegetal, e quando em excesso durante o dia pode ser carregada nas células companheiras do floema, transportada nos elementos de seiva e descarregada em órgãos dreno em crescimento ou não fotossintetizantes (BARRATT et al., 2009; SAUER, 2007). Paralelamente, de 30 à 50% do excedente de C assimilado é direcionado para síntese e armazenamento na forma de amido no cloroplastos durante o período de luz (KÖLLING et al., 2013; LI et al., 2012; LUNN, 2016; STITT; LUNN; USADEL, 2010), garantindo um suprimento constante de C e energia para manter o metabolismo basal e o crescimento quando a fotossíntese não está ativa ou em situações de déficit energético (SMITH; STITT, 2007; STITT; ZEEMAN, 2012; WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004). O controle da partição de C entre sacarose e amido pode ser influenciado, principalmente, por mudanças nos fotoperíodos, e em alguns casos intensidade luminosa e estresse (CHATTERTON; SILVIUS, 1981; PILKINGTON et al., 2015; SMITH; STITT, 2007). Em fotoperíodos curtos ou baixa irradiância, a partição de C é direcionada para a síntese de amido, enquanto a síntese e o consumo de sacarose são reduzidos e o crescimento é limitado por deficiência de C (POKHILKO et al., 2014; YAZDANBAKHSI et al., 2011). Em condições de alta irradiância ou durante longos períodos de luz, há menor acúmulo de amido e aumento na síntese de sacarose, dessa forma o C é disponibilizado em quantidade maior do que a necessária para o crescimento e os carboidratos se acumulam nas folhas e em outras partes da planta (PAUL; FOYER, 2001; POKHILKO et al., 2014; SULPICE et al., 2014). Curiosamente, recentemente, foi mostrado que a partição de C assimilado para amido é dependente do fotoperíodo e não da irradiância, ou seja, plantas cultivadas em fotoperíodos curtos mas expostas a mesma quantidade de fótons de um fotoperíodo longo, não apresentam alteração no conteúdo de amido e, consequentemente, têm seu crescimento restringido quando comparadas às plantas crescidas em fotoperíodos longos (MENGIN et al., 2017). Desta forma, a regulação da partição

de fotoassimilados entre sacarose e amido, bem como a remobilização correta do amido em açúcares parecem ser cruciais para ajustar o crescimento vegetal de acordo com a disponibilidade de C, otimizando seu crescimento. Um claro exemplo deste controle pode ser encontrado em mutantes com expressão alterada de genes codificando enzimas envolvidas no metabolismo de amido, que apresentam fenótipo de redução de crescimento, principalmente pela incapacidade de liberar açúcar do amido para manter o crescimento (MACNEILL et al., 2017).

Acredita-se que a capacidade das plantas sintetizarem amido é uma evolução da competência ancestral de produção de glicogênio, um polímero de glicose mais simples, ramificado e solúvel encontrado em animais e leveduras (BALL; MORELL, 2003). Em plantas, o início da formação de grânulos de amido está sob controle diferente de mamíferos e leveduras. Enquanto em plantas a enzima responsável pela síntese de amido é a AGPase (PREISS, 1988), em leveduras e mamíferos as moléculas de glicogênio são iniciadas pela glicoginina uma proteína de auto-glicosilação (CHENG et al., 1995; LOMAKO; LOMAKO; WHELAN, 1988). Dessa forma, a síntese de glicogênio se dá através de uma cadeia de alguns resíduos de glicose ligados a um resíduo de tirosina da glicoginina que é estendida e elaborada pelas enzimas de ramificação e glicogênio sintase (SINGH et al., 1995). A inibição da atividade da TOR leva ao acúmulo de glicogênio em células musculares de mamíferos e leveduras (CORNU; ALBERT; HALL, 2013; SCHMELZLE et al., 2004). Em leveduras, em condições normais de crescimento, o TORC1 fosforila a TAP42 que desfosforila o fator de transcrição Msn2p o qual regula a expressão de enzimas envolvidas na síntese de glicogênio. Em contraste, sob déficit energético, TOR é inativada e impede a fosforilação da TAP42, permitindo a fosforilação do Msn2p que, no núcleo, se liga a região promotora de genes codificadores da síntese de glicogênio resultando em um fenótipo de excesso de glicogênio (FRANÇOIS; PARROU, 2001; SCHMELZLE et al., 2004). Similarmente, em células musculares de mamíferos deficientes em RAPTOR, e portanto com a via TOR inibida, o aumento do conteúdo de glicogênio é desencadeado por uma hiperfosforilação da proteína quinase B (PKB/Akt) que aumenta a fosforilação e ativa a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) concomitantemente com a regulação negativa da glicogênio fosforilase responsável pela quebra do glicogênio em glicose (BENTZINGER et al., 2008). Apesar de bem estabelecida a participação da via TOR no metabolismo de glicogênio em leveduras e animais, em plantas a atuação dessa via no metabolismo de amido ainda precisa ser elucidada. Como o metabolismo de amido é muito

complexo, compartimentalizado e interage com outras vias, este polímero está sujeito a vários níveis de regulação.

Linhas transgênicas com redução na expressão de *TOR*, *RAPTOR* e *LST8* apresentam um fenótipo de excesso de amido em comparação com plantas do tipo selvagem (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; SALEM et al., 2018). Devido a estes mutantes apresentarem fenótipo de redução de crescimento, não se sabe se o acúmulo de amido é uma consequência da redução do crescimento, alteração da partição de C ou se o metabolismo de amido é afetado diretamente por esta quinase. Desta forma, o uso de inibidores do TORC, como o AZD-8055, pode ser uma ferramenta poderosa no estudo do papel deste complexo proteico no metabolismo de amido, uma vez que permitem reduzir sua atividade em períodos específicos do dia, possibilitando distinguir efeitos primários e secundários desta inibição. Como no capítulo anterior foi mostrado que a inibição do TORC em plântulas selvagens de *Arabidopsis* resulta em alterações no conteúdo de amido e açúcares ao longo do ciclo diurno, neste capítulo, foi explorado se o acúmulo de amido se deve a um aumento de sua síntese e/ou inibição de sua degradação, bem como se a partição entre amido e sacarose é afetada pela interação com outras vias de sinalização de açúcar, como é o caso da Tre6P.

5.2. Resultados e discussão

5.2.1. Inibição do TORC por AZD-8055 em plântulas de *Arabidopsis* resulta no aumento do conteúdo de amido dependente de luz

Plântulas de *Arabidopsis* Col-0 crescidas em fotoperíodo de 12 h e tratadas ao final da noite (FN) com AZD-8055 apresentaram um conteúdo de amido maior tanto durante o período de luz quanto de escuro (**Figura 4.3**), similar aos resultados encontrados com mutantes do TORC (DOBRENEL et al., 2013). Para mensurar o efeito da aplicação dos tratamentos ao longo do tempo e as taxas de acúmulo e degradação de amido, realizou-se uma análise de regressão linear conforme metodologia apresentada no item 2.6.2 em Material e Métodos. Plântulas tratadas com o inibidor do TORC apresentam maior taxa de acúmulo durante o período de luz e menor taxa de degradação durante o período da noite quando comparadas ao controle (**Figura 5.1**).

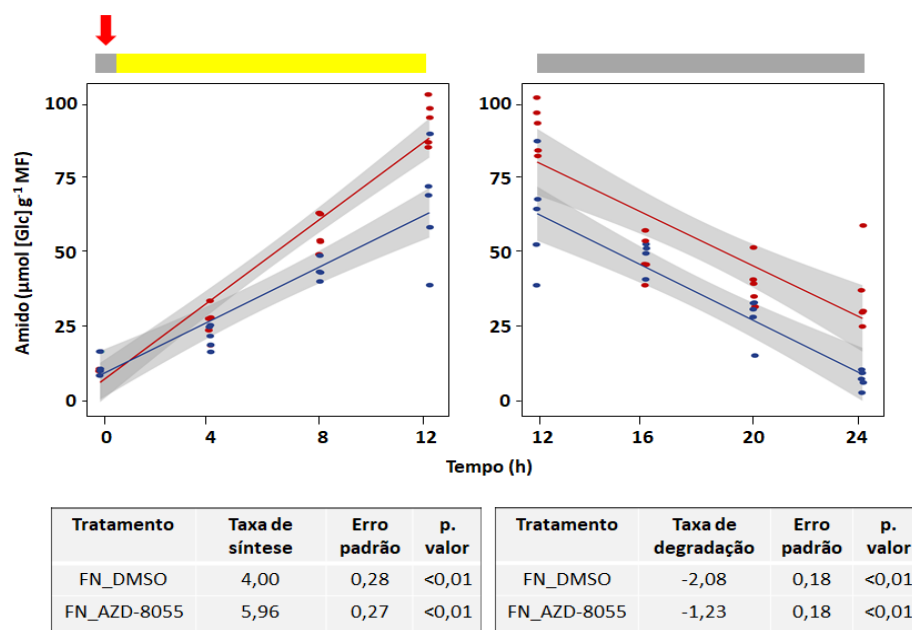


Figura 5.1. Taxas de síntese e degradação de amido em plântulas de *Arabidopsis* durante um período diurno, com aplicações de tratamentos ao final da noite.

Regressões lineares para estimar as taxas de síntese e degradação de amido foram calculadas por teste de covariância combinando tratamentos x tempo de aplicação da droga x interação destes dois fatores. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) e AZD-8055 estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. As áreas de sombreamento em cinza representam o intervalo de confiança obtido pela análise de covariância, ou seja, quanto maior a distância entre os intervalos (sombreamento) de dois tratamentos, mais significativa é a diferença entre eles. Barras amarela e cinza (acima dos gráficos) representam os períodos de luz e escuro, respectivamente, enquanto que a seta vermelha indica o momento da aplicação dos tratamentos ao final da noite. Cada ponto representa uma amostra biológica (*pool* de 40 plântulas) num total de 5 replicatas.

Em *Arabidopsis*, os processos de síntese e degradação de amido seguem um padrão quase linear, onde durante o dia as plantas armazenam parte de seus fotoassimilados em folhas na forma deste polímero e remobilizam-no durante a noite para sustentar o metabolismo e crescimento (SMITH; ZEEMAN; SMITH, 2005; ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2007). Devido a dependência diurna no metabolismo de amido e no crescimento de biomassa, também foi investigado se a aplicação de AZD-8055 em outro período, como ao final do dia (FD), resultaria no mesmo fenótipo de acúmulo de amido de plântulas tratadas com este inibidor ao final da noite (FN). Conforme mostrado na **Figura 5.2**, plântulas que receberam tratamento com AZD-8055 ao FN não apenas tiveram um aumento rápido no conteúdo de amido detectado após 6 h de tratamento (**Figura 5.2 A**), como também tiveram taxa de acúmulo de amido 60% maior que o controle durante o período de luz (**Figura 5.2 B**). Este acúmulo foi mantido também durante o período noturno, onde a taxa de decréscimo de amido foi aproximadamente 20% menor em plântulas com a via TOR inibida se comparado

com o controle (**Figura 5.2 D**). Já as plântulas tratadas ao FD não apresentaram alterações significativas nas taxas de decréscimo de amido nas primeiras 12 h após os tratamentos (**Figura 5.2 C e D**), enquanto similarmente às plântulas submetidas à aplicação de droga ao FN, apresentaram uma taxa de acúmulo de amido 70% maior ao longo do período de luz quando comparadas ao controle (**Figura 5.2 B e C**). Coletivamente, esses resultados sugerem que a inibição do TORC desencadeia um acúmulo de amido principalmente associado ao período de luz, enquanto que as alterações nas taxas de decréscimo deste polímero ao longo do período de escuro são efeitos secundários dessa inibição, observadas apenas após 12 h de tratamento. Desta forma, como o principal foco deste trabalho é identificar respostas primárias da inibição do TORC no metabolismo, os experimentos subsequentes foram concentrados na resposta da TOR ao acúmulo de amido quando a droga foi aplicada no período que corresponde ao amanhecer (FN).

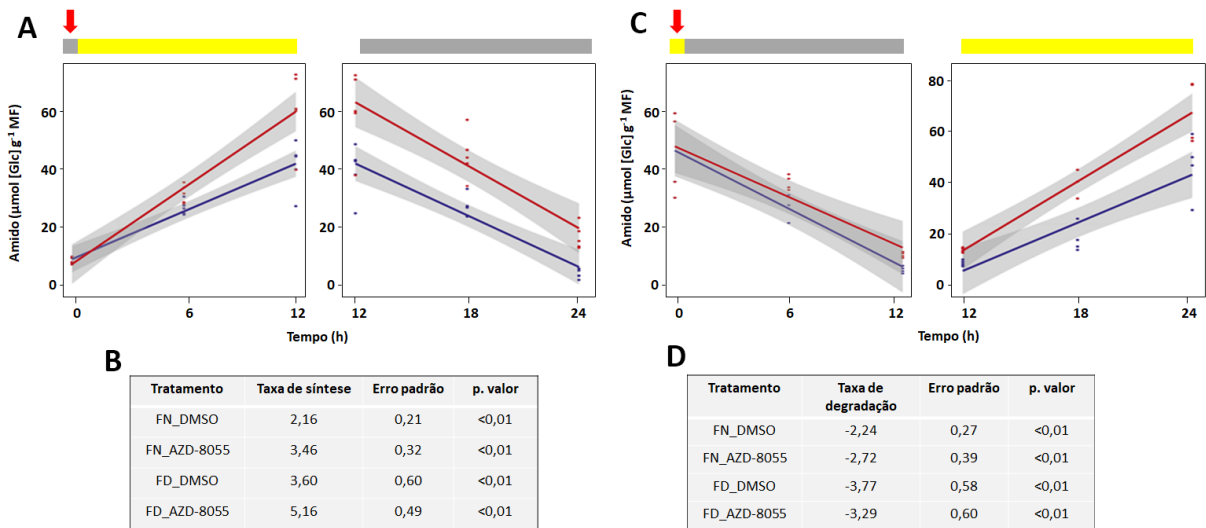


Figura 5.2. Taxas de síntese e degradação de amido ao longo do período diurno em plântulas de *Arabidopsis* tratadas com AZD-8055 ao final da noite (FN) ou final do dia (FD). Regressões lineares para estimar as taxas de síntese e degradação de amido foram calculadas por teste de covariância combinando tratamentos x tempo de aplicação da droga x interação destes dois fatores. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) e AZD-8055 estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. As áreas de sombreamento em cinza representam o intervalo de confiança obtido pela análise de covariância, ou seja, quanto maior a distância entre os intervalos (sombreamento) de dois tratamentos, mais significativa é a diferença entre eles. Barras amarelas e cinzas (acima dos gráficos) representam os períodos de luz e escuro, respectivamente, enquanto que a seta vermelha indica o momento da aplicação dos tratamentos ao final da noite. Cada ponto representa uma amostra biológica (*pool* de 40 plântulas) num total de 5 replicatas.

5.2.2. A inibição do TORC não afeta a síntese de amido mediada pela AGPase

Apesar da síntese e degradação de amido ocorrem concomitantemente durante o período de luz para ajustar a demanda por sacarose (FERNANDEZ et al., 2017; SEKI et al., 2017), a fotossíntese e partição de fotoassimilados em amido faz com que a síntese desse polímero seja o processo predominante neste período. Conforme discutido na introdução dessa tese, há uma série de enzimas envolvidas na biossíntese de amido, contudo a adenosina difosfato glicose pirofosforilase (AGPase) é a enzima chave que catalisa, a partir da Glc1P e ATP, o primeiro passo irreversível, sintetizando adenosina-5-difosfoglicose (ADPGlc) e pirofosfato (PREISS, 1988). Esta enzima é um heterotetrâmero, contendo duas subunidades catalíticas grandes (51 kDa) e duas subunidades regulatórias ligeiramente menores (50 kDa), submetida à uma série de regulações pós-traducionais (NAKAGAMI et al., 2010; REILAND et al., 2009; UMEZAWA et al., 2013) (**Figura 5.3**). Recentemente, foi mostrado por nosso grupo que a inibição da TOR por AZD-8055 tende a alterar o *status* redox da enzima AGPase (ARAÚJO, 2016), provavelmente, aumentando a sensibilidade às regulações alostéricas (HENDRIKS et al., 2003; PREISS, 1988; THORMÄHLEN et al., 2013; TIESSEN et al., 2002) cruciais para o controle do fluxo de síntese de amido em resposta à síntese citosólica de sacarose (MUGFORD et al., 2014). Neste caso, níveis elevados de triose-P no cloroplasto resultam no aumento de 3-fosfoglicerato (3-PGA), os quais ativam a enzima, enquanto altos níveis de Pi, inibem sua atividade (HELDT et al., 1977; STITT; HUBER; KERR, 1987). Desta forma, utilizando os dados obtidos pela análise de perfis metabólicos por GC-TOF-MS, foi calculada a razão entre 3-PGA:Pi em plântulas tratadas com o inibidor ou DMSO (**Figura Suplementar 5.1**). Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos ao longo da cinética de inibição. Vale ressaltar que esta análise não pode ser considerada totalmente conclusiva pois levou em consideração o *pool* total destes metabólitos e não seus níveis nos distintos compartimentos subcelulares (cloroplasto e citosol) os quais são importantes para esta regulação.

Ainda como forma de verificar o possível envolvimento da AGPase no fenótipo de acúmulo de amido em plântulas tratadas com AZD-8055, a atividade catalítica máxima desta enzima foi monitorada ao longo do período de luz, no qual a mesma se encontra ativa (GIBON et al., 2004b). Porém, não houve diferenças significativas na atividade da AGPase entre os tratamentos (**Figura 5.3 A**). Como forma de validar estes resultados, também foram

monitorados por LC-MS/MS os níveis dos precursores e produtos da AGPase. Apesar dos níveis do precursor Glc1P estarem elevados em plântulas tratadas com AZD-8055 no período de luz quando comparadas ao controle (**Figura 5.3 B**), não foram identificadas mudanças significativas nos níveis do produto ADPGlc entre os tratamentos (**Figura 5.3 C**). Coletivamente, estes resultados sugerem que o aumento do conteúdo de amido em plântulas tratadas com AZD-8055 não ocorre devido a um aumento na síntese de amido mediada pela AGPase, sugerindo que este acúmulo é resultado de um outro processo, como por exemplo, alteração entre a sinalização de açúcares e ou na partição de fotoassimilados entre sacarose e amido.

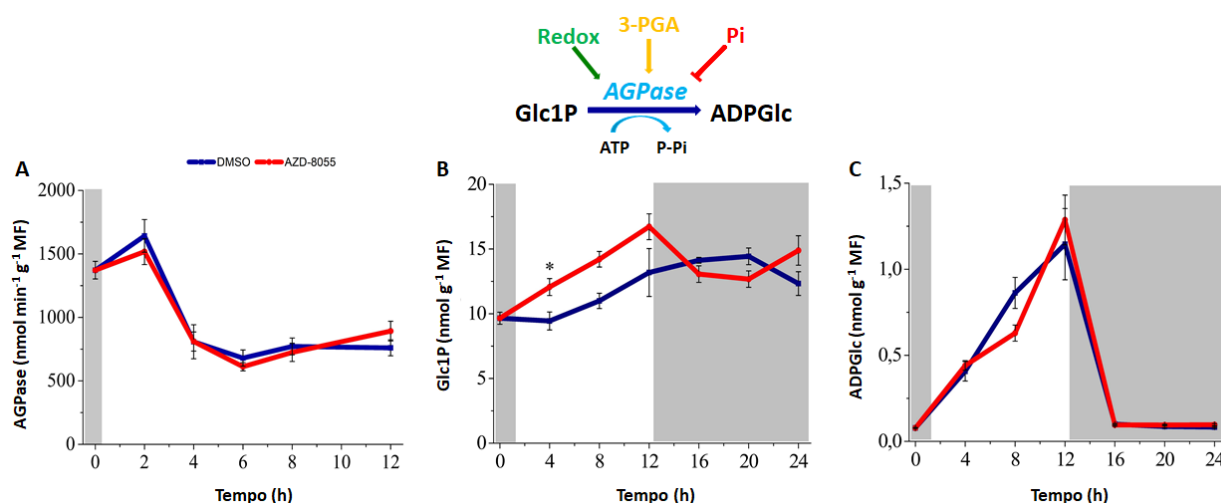


Figura 5.3. Influência da inibição da TOR na via da AGPase em plântulas de Arabidopsis.

A enzima AGPase catalisa o primeiro passo irreversível da síntese de amido, utilizando como substrato Glc1P e produzido ADPGlc e Pi. Esta enzima é alvo de regulações redox e alostérica, tendo 3-PGA como ativador e Pi como inibidor, conforme ilustrado no esquema superior da figura. O conteúdo dos metabólitos Glc1P (**A**) e ADP-glicose (**C**) ao longo do ciclo diurno foram obtidos por LC-MS/MS, enquanto que atividade catalítica máxima da AGPase foi ensaiada apenas durante o período de luz na presença de excesso de 3-PGA e DTT para converter completamente a enzima em sua forma ativa reduzida (**B**). Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μ M estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. Cada ponto representa a média de 4 replicatas biológicas com erro padrão e as diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asterisco (* $P < 0,05$). Sombreamentos brancos e cinzas nos gráficos representam os períodos de luz e escuro, respectivamente.

5.2.3. A redução do crescimento pela inibição do TORC parece ocorrer por uma partição inapropriada de C

As plantas alternam o dia e noite entre um excedente de C na luz e um saldo negativo de C à noite, que é equilibrado pela síntese e degradação de amido, respectivamente, para manter o crescimento (STITT et al., 2007). Desta forma, o controle da partição de C entre

sacarose e amido é altamente influenciado por mudanças nos fotoperíodos ou em resposta a um súbito início ou final do anoitecer (PAUL; FOYER, 2001). Em fotoperíodos curtos ou baixa irradiância por exemplo, a partição de C é direcionada para um acúmulo mais rápido de amido no período correspondente ao dia, enquanto a síntese e consumo de sacarose são reduzidos, limitando o crescimento pela deficiência de C (POKHILKO et al., 2014; YAZDANBAKHSI et al., 2011). Desta forma, seria plausível especular que o rápido acúmulo de amido e a redução dos níveis de sacarose em plântulas tratadas com AZD-8055 mimetizam uma condição de deficiência de C pela diminuição da demanda de crescimento. Para verificar as alterações em termos de mobilização de C, considerando as demandas de crescimento entre fonte e dreno, foram analisadas as respostas da inibição do TORC separadamente em folhas e raízes ao longo de 12 h de luz (1, 2, 4, 8 e 12 h após os tratamentos com AZD-8055 ou DMSO). A comparação dos perfis metabólicos entre os dois órgãos indica, conforme esperado, diferenças no tempo de resposta ao AZD-8055, sendo que as raízes por estarem em contato direto com o inibidor, apresentam respostas mais imediatas à inibição do TORC quando comparado com a parte aérea. O padrão de resposta dos açúcares sacarose, frutose e glicose em parte aérea e raiz são bastante distintos (**Figura 5.4**). Enquanto em raízes, os níveis desses açúcares diminuem significativamente 2 h após a inibição do TORC em relação ao controle (**Figura 5.4 A-C**), na parte aérea o padrão dos mesmos é semelhante ao encontrado em plântulas inteiras (**Figura 4.2**), com redução significativa dos níveis de sacarose e aumento dos níveis das hexoses a partir de 4 h após a aplicação do AZD-8055 (**Figura 5.4 D-F**).

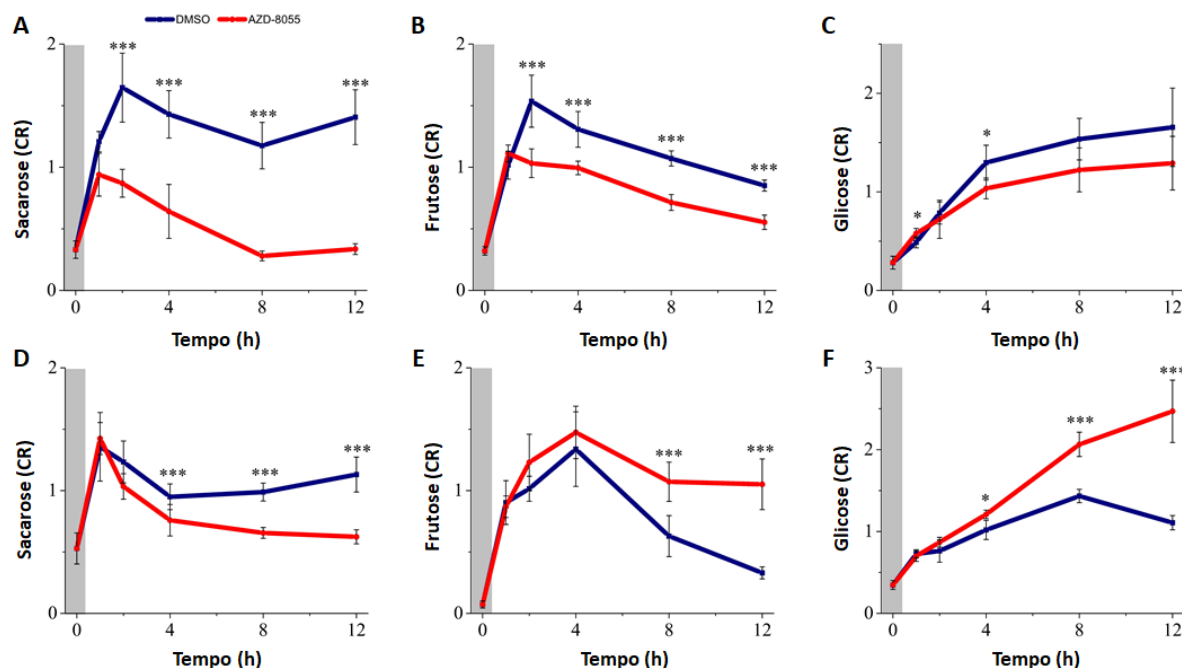


Figura 5.4. Efeito da inibição do TORC em açúcares nas raízes e folhas de Arabidopsis.

Níveis de açúcares nas raízes (A) sacarose, (B) frutose e (C) glicose. Níveis de açúcares na parte aérea (D) sacarose, (E) frutose e (F) glicose. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μ M estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5 replicatas biológicas com erro padrão e as diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asteriscos (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). Sombreamentos branco e cinzas nos gráficos representam os períodos de luz e escuro, respectivamente.

Com base nestes resultados, é possível presumir que os baixos níveis de sacarose e hexoses nas raízes sejam resultado de um rápido consumo de C através da respiração e processos metabólicos relacionados ao crescimento. Tendo em consideração que a inibição do TORC reduz o crescimento, o consumo destes açúcares pode ser atribuído a uma maior respiração com a finalidade de manter o metabolismo basal das células deste órgão. Curiosamente, os intermediários do ciclo do TCA neste órgão apresentaram seus níveis reduzidos (Figura 5.5), o que de fato pode indicar tanto um consumo mais rápido dos intermediários por uma taxa de respiração acelerada ou uma redução da taxa de respiração.

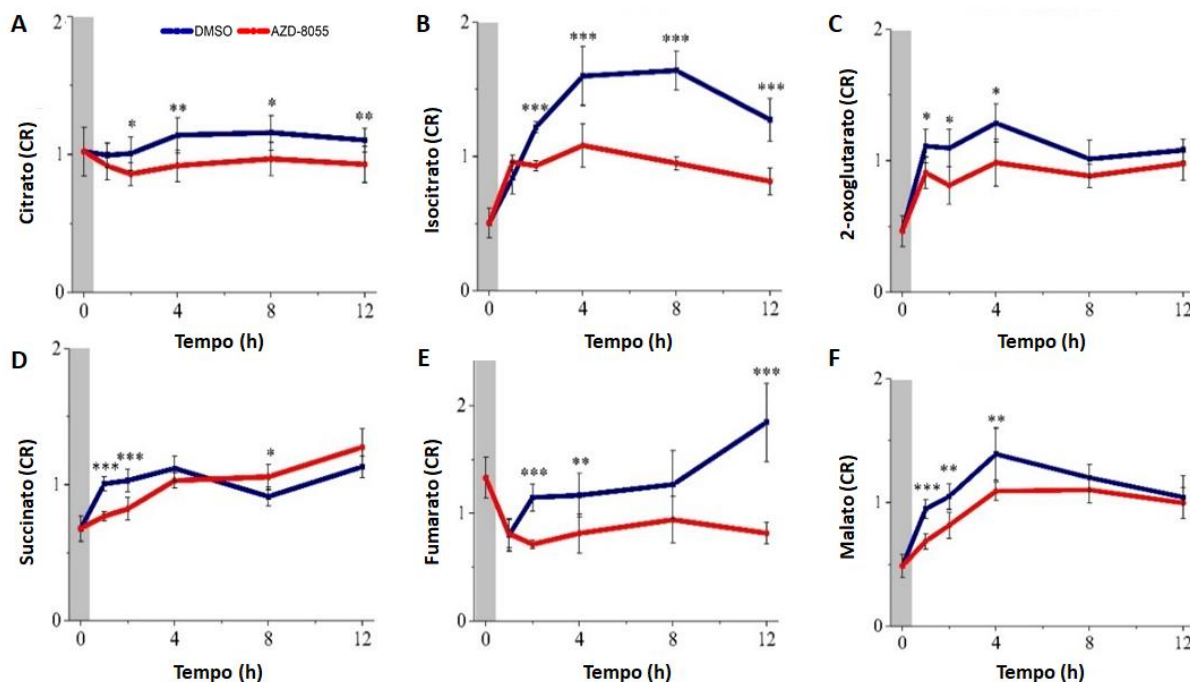


Figura 5.5. Efeito da inibição do TORC em ácidos orgânicos intermediários do ciclo do TCA em raízes de plântulas de Arabidopsis.

(A) Citrato, (B) Isocitrato, (C) 2-oxoglutarato, (D) Succinato, (E) Fumarato e (F) Malato. Dados obtidos através da análise por GC-TOF-MS. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μ M estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5 replicatas biológicas com erro padrão e as diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asteriscos (* P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0,001). Sombreamentos brancos e cinzas nos gráficos representam os períodos de luz e escuro, respectivamente.

Para validar esta hipótese, um experimento foi realizado utilizando glicose marcada radioativamente com ^{14}C para verificar a taxa de $^{14}\text{CO}_2$ dissipado pelos tecidos. As **Figura 5.6 A e B** mostram as taxas de liberação de $^{14}\text{CO}_2$ após 1 e 3 h de tratamento com AZD-8055 ou DMSO em folhas e raízes, respectivamente. Em ambos órgãos, houve uma diminuição da taxa de liberação de $^{14}\text{CO}_2$, sugerindo que a inibição da TOR reduz a respiração.

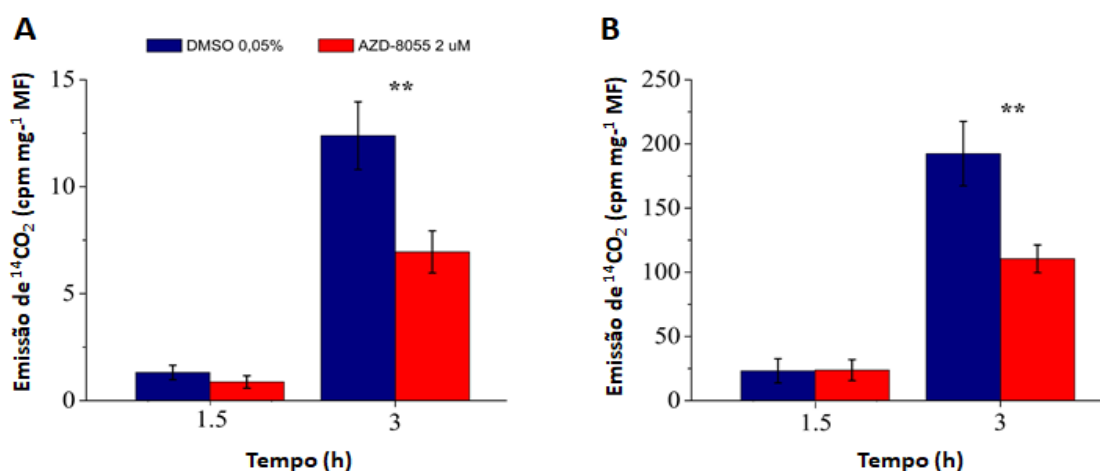


Figura 5.6. Efeito da inibição do TORC na emissão de $^{14}\text{CO}_2$ em parte aérea e raiz de *Arabidopsis*.

Níveis de emissão de $^{14}\text{CO}_2$ em plântulas de *Arabidopsis* após 1,5 e 3 h de tratamento com glicose marcada além do DMSO 0,05% ou do 2 μM de AZD-8055 representados pelas cores azul e vermelha respectivamente. **(A)** emissão de $^{14}\text{CO}_2$ na parte aérea e **(B)** emissão de $^{14}\text{CO}_2$ em raiz. Cada barra representa a média de 5 replicatas biológicas (*pools* de 40 plântulas) com erro padrão. As diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asteriscos (** $P < 0,01$).

Coletivamente, estes dados indicam que os níveis reduzidos de sacarose em folhas e raízes não podem ser atribuídos a um aumento da demanda para manter o metabolismo basal através da respiração. Ao contrário, os resultados indicam uma diminuição do metabolismo basal da raiz pela ausência de sacarose ou hexoses. Interessantemente, em folhas, os níveis de hexoses estão aumentados, sugerindo que, ao invés de haver translocação da sacarose para atender as demandas do dreno, a sacarose é catabolizada em hexoses.

Uma outra possibilidade é que plântulas tratadas com AZD-8055 apresentem uma menor taxa de assimilação de C. Devido à dificuldade técnica em medir a taxa de assimilação em plântulas neste estágio, uma estimativa foi obtida através da quantificação dos principais *pools* de C dos metabólitos primários, como os intermediários do ciclo do TCA, aminoácidos, açúcares solúveis e amido, conforme sugerido por Figueroa et al., (2016). A **Figura 5.7** indica que em todos os casos, os *pools* totais de C em TCA e aminoácidos (**Figura 5.7 A**), açúcares solúveis (**Figura 5.7 B**) e amido (**Figura 5.7 C**) são significativamente maiores em plântulas tratadas com AZD-8055 em relação ao controle, indicando inclusive um aumento da quantidade de C assimilado. Em conjunto, esses dados apontam que a inibição do TORC resulta numa partição de C inapropriada, que consequentemente, compromete o crescimento.

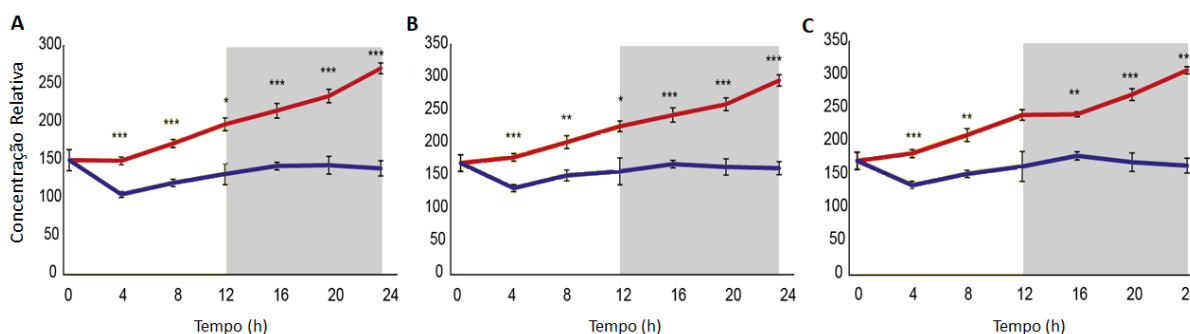


Figura 5.7. Efeito da inibição da TOR nas principais reservas de C acumulados em plântulas de *Arabidopsis*.

(A) C do TCA e AA, (B) C do TCA, AA, açúcares, (C) c do TCA, AA e amido. Plantas tratadas com AZD-8055 estão representadas pela cor vermelha enquanto controle (DMSO) em azul. Cada ponto representa a média de 5 replicatas biológicas com erro padrão e as diferenças significativas entre os tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asteriscos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). Sombreamentos brancos e cinzas nos gráficos representam os períodos de luz e escuro, respectivamente.

5.2.4. A inibição do TORC prejudica o sensoramento do *status* de C

Normalmente, em condições de deficiência de C, plantas podem apresentar alterações na partição do mesmo, comprometendo o crescimento. Em plantas submetidas a um prolongamento do período de escuro por algumas horas, por exemplo, as folhas entram em deficiência de C à medida que suas reservas de sacarose e amido se esgotam e o crescimento, conseqüentemente, é interrompido. Imediatamente após a reiluminação das folhas, a fotossíntese recomeça, mas há uma defasagem antes do crescimento ser reiniciado e, como resultado, os açúcares e o amido se acumulam nas folhas (GIBON et al., 2004a). Exceto pelos níveis de sacarose, plântulas de *Arabidopsis* tratadas com AZD-8055 apresentam fenótipo similar às plântulas expostas à períodos de noite estendida. Vale ressaltar que acredita-se que a inibição da via TOR ative a via antagônica da quinase SnRK1, mimetizando condições de deficiência de C e estresse energético (DOBRENEL et al., 2016b). Desse modo, como forma de verificar se a inibição da TOR resulta em um fenótipo de deficiência de C, conseqüentemente acarretando alterações metabólicas que comprometem o crescimento, foi avaliada a expressão de quatro genes marcadores de estresse energético e ou deficiência de C (**Figura 5.8**), como asparagina sintase 1 (*ASN1*) e trealose fosfato sintase 5 (*TPS5*) que respondem a reduzidos e elevados níveis de açúcar, respectivamente (BLASING et al., 2005; KOCH, 1996; OSUNA et al., 2007; PRICE et al., 2004; SCHEIBLE et al., 2004; YADAV et al., 2014); a prolina desidrogenase (*PRODH*) a qual é regulada negativamente por baixo potencial hídrico

e positivamente está associada à recuperação desse estresse (HAYANO-KANASHIRO et al., 2009; SHARMA; VERSLUES, 2010); e *kiss me deadly 4* (*KMD4*) que modula a regulação de citocininas as quais controlam respostas aos fatores abióticos, como estresse por frio e sal, e fatores bióticos (CHOI et al., 2011; HA et al., 2012; KIM; KIEBER; SCHALLER, 2013).

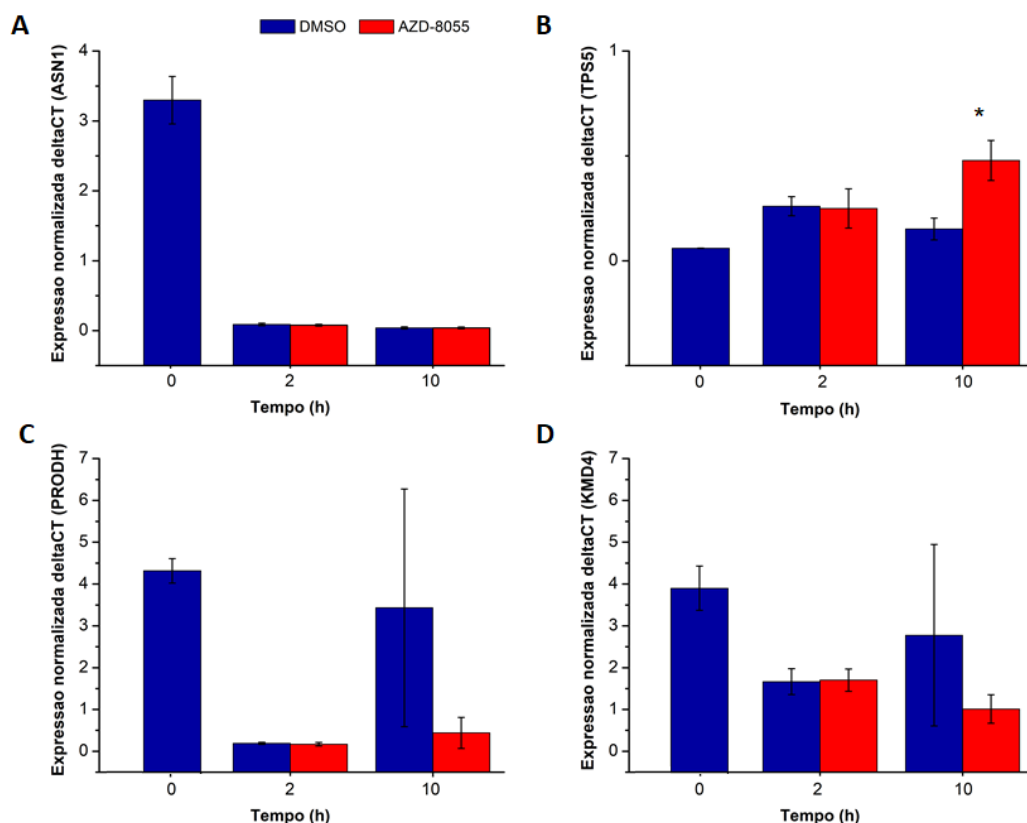


Figura 5.8. Efeito da inibição da TOR na expressão de genes marcadores de estresse em plântulas de Arabidopsis.

(A) *ASN1*, (B) *TPS5*, (C) *PRODH* e (D) *KMD4*. Dados obtidos através da análise por PCR em tempo real, normalizados pelo gene de referência *PDF2* e *UBQ10*. Plântulas não tratadas (0 h) ou tratadas com DMSO 0,05% (controle) estão representadas em azul, e as tratadas com AZD-8055 2 μ M em vermelho. Cada barra representa a média de 3 replicatas biológicas compostas por *pools* de 50 plântulas com erro padrão e as diferenças significativas entre os tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asteriscos (* $P < 0,05$).

Os resultados indicam, que ao menos em períodos iniciais de inibição da TOR por AZD-8055, onde as principais alterações metabólicas e de partição de C ocorrem, não há indução nesses genes marcadores de deficiência de C ou estresse energético. Como forma de validar estes resultados de ausência de resposta de deficiência de C, foi realizado um experimento onde plântulas crescidas em fotoperíodo de 12 h foram tratadas com AZD-8055 ou DMSO 30 min antes do período subjetivo ao amanhecer, e foram submetidas a 4 h a mais

de escuro (noite estendida). Conforme esperado, apesar das reservas de amido durante o período de escuro estarem praticamente exauridas, há um acúmulo rápido deste polímero durante o período de luz, sendo que o controle, que normalmente apresenta menor conteúdo de amido que as plântulas tratadas com AZD-8055, tem seus níveis igualados aos das plântulas com a via TOR inibida ao final do período de luz (**Figura 5.9 A**). Curiosamente, apesar da extensão da noite acelerar o consumo de quaisquer reservas de C como forma de minimizar o déficit energético, os níveis da maltose, o principal produto da degradação de amido, têm tendência a estarem reduzidos após o tratamento com AZD-8055 em comparação com os encontrados em plântulas controle (**Figura 5.9 B**), contrastando com os níveis de sacarose que foram reduzidos no mesmo período nestas plântulas (**Figura 5.9 C**). Assim, os resultados sugerem que a inibição da TOR prejudica de alguma forma a percepção da privação de C, acarretando na remobilização incorreta do amido.

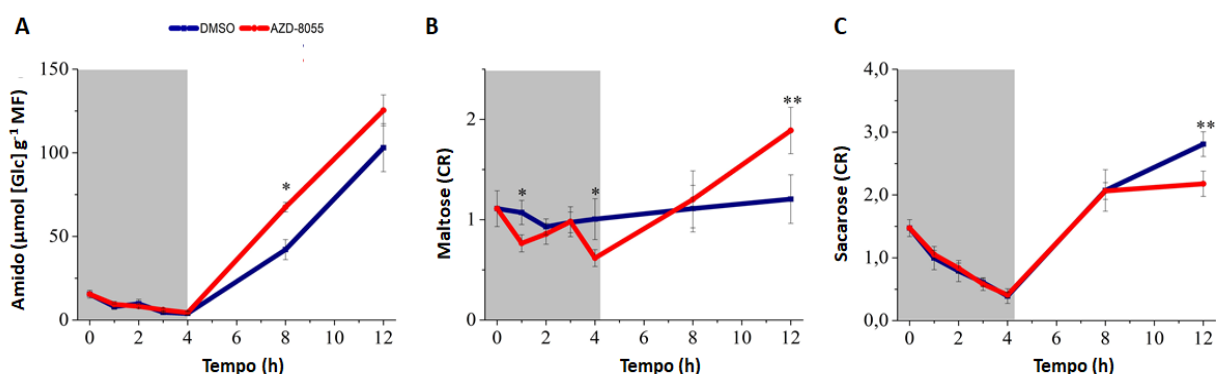


Figura 5.9. Conteúdo de amido, maltose e sacarose em plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO em condições de noite estendida por 4 h seguida por período de luz.

Plântulas de Arabidopsis crescidas em fotoperíodo de 12h e submetidas a 4 h de escuro prolongado. (A) conteúdo de amido durante 4 h noite estendida e 10 h de luz, (B) perfil metabólico da maltose (C) e da sacarose obtidos por GC-TOF-MS. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μM estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5 replicatas biológicas (*pool* de 50 plântulas) com erro padrão e as diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asteriscos (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$). Sombreamentos brancos e cinzas nos gráficos representam os períodos de luz e escuro, respectivamente.

5.2.4. Inibição do TORC resulta em menor degradação de amido durante o período de luz

Tem sido reportado que o controle do metabolismo de amido frente à alterações ambientais ou do *status* energético das plantas é fundamental para o ajuste do crescimento (SMITH; STITT, 2007). Até o momento, os resultados apresentados indicaram que a inibição

do TORC não permite o ajuste correto da degradação de amido mesmo em condições extremas como a de déficit de C. Recentemente, estudos de incorporação de CO₂ marcado mostraram a ocorrência de degradação de amido durante o dia (FERNANDEZ et al., 2017), principalmente em períodos em que há uma diminuição da atividade fotossintética como forma de manter o fluxo de C para o crescimento. Curiosamente, este controle da degradação ocorre em períodos específicos do dia próximo ao final do período de luz, sugerindo que a diminuição da intensidade luminosa ao anoitecer desencadearia o início da degradação de amido como forma de manter e antecipar o fluxo de C para o crescimento, o que poderia sugerir uma participação do relógio circadiano neste processo. Paralelamente, foi comprovado através de modelos matemáticos e dados experimentais que ocorre uma regulação da degradação de amido durante o amanhecer, entre 1 e 2 h após o início do dia, como um resultado do ajuste do oscilador por açúcares visando manter a homeostase de C (SEKI et al., 2017).

Com base nestas informações e nos resultados de inibição de degradação de amido após a inibição da TOR em plântulas submetidas à noite estendida, foi realizado um experimento com uma cinética mais definida, especialmente no início e final do período de luz, para avaliar o perfil de amido e metabólitos relacionados. Interessantemente, se comparado com o controle, o conteúdo de amido em plântulas com a atividade do TORC inibida foi significativamente maior 2 h após a aplicação do tratamento (início do dia) e no final do dia (2 h antes do período de escuro) (**Figura 5.10 A**). Nessas plântulas, os níveis de maltose apresentam tendência de redução durante todo o período de luz, mas sendo significativamente menor somente no final do dia, ou seja, após 10 h de tratamento com AZD-8055 (**Figura 5.10 B**), enquanto que os níveis de sacarose estiveram significativamente reduzidos nas folhas a partir de 4 h da aplicação do inibidor da TOR (**Figura 5.10 C**). Vale ressaltar que os níveis de maltose no início do dia estão no limite de detecção. Contudo, estes dados sugerem que plântulas tratadas com AZD-8055 apresentam inibição da degradação de amido, o que pode limitar o fluxo de C adequado para o crescimento.

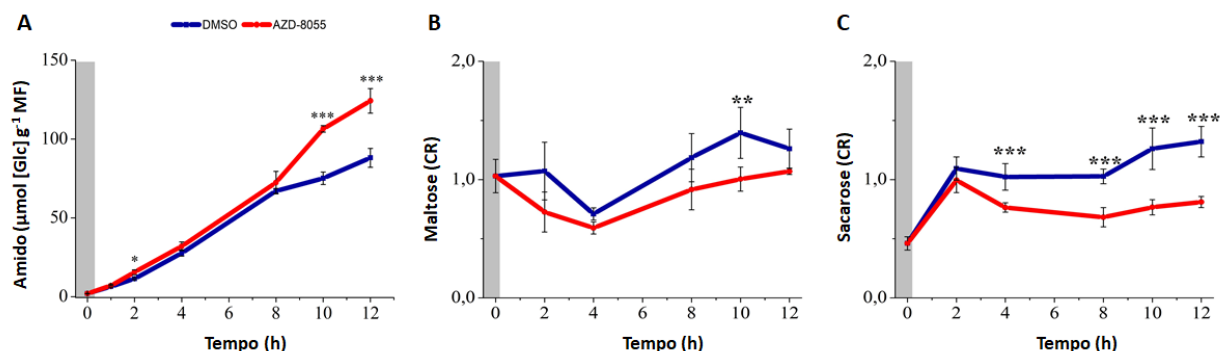


Figura 5.10. Conteúdo de amido, maltose e sacarose em plântulas de Arabidopsis durante o período de luz.

Conteúdo de amido (A), maltose (B) e sacarose (C) em plântulas crescidas em fotoperíodo de 12 h. Amido foi quantificado enzimaticamente enquanto os dados para maltose e sacarose foram obtidos por GC-TOF-MS. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μM estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5 replicatas biológicas (*pools* de 50 plântulas) com erro padrão e as diferenças significativas entre tratamentos calculadas pelo teste T, *P-value* estão indicadas por asterisco (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). Sombreamentos brancos e cinzas nos gráficos representam os períodos de luz e escuro, respectivamente.

Como forma de validar os resultados obtidos e melhor quantificar os níveis de maltose, foi realizado um experimento onde plântulas cultivadas em fotoperíodo de 12 h por 10 dias foram transferidas para condição de luz contínua. Após um período de adaptação de 24 h, as plântulas foram tratadas com AZD-8055 ou DMSO no período correspondente ao final da noite, e coletadas a cada 4 h por um período de 48 h. Como esperado, o conteúdo de amido aumentou quase linearmente durante as primeiras 32 h e 40 h em plântulas tratadas com DMSO ou AZD-8055, respectivamente, quando tornou-se mais estável (Figura 5.11 A). Contudo, apesar dos níveis de maltose manterem a oscilação esperada nas plântulas controle, as amostras tratadas com AZD-8055 apresentaram uma redução drástica em seus níveis ao longo de todo período analisado, além da perda da oscilação (Figura 5.11 B). Estes resultados corroboram com os dados anteriores, que apontam para uma inibição da degradação de amido durante o período de luz frente à redução da atividade do TORC. De maneira similar, os níveis de sacarose mantiveram-se reduzidos em plântulas tratadas com AZD-8055 ao longo de todo período analisado, enquanto que as controle tiveram seus níveis oscilando com maiores picos durante o período da noite subjetiva conforme o padrão descrito em literatura (LU, 2005) (Figura 5.11 C).

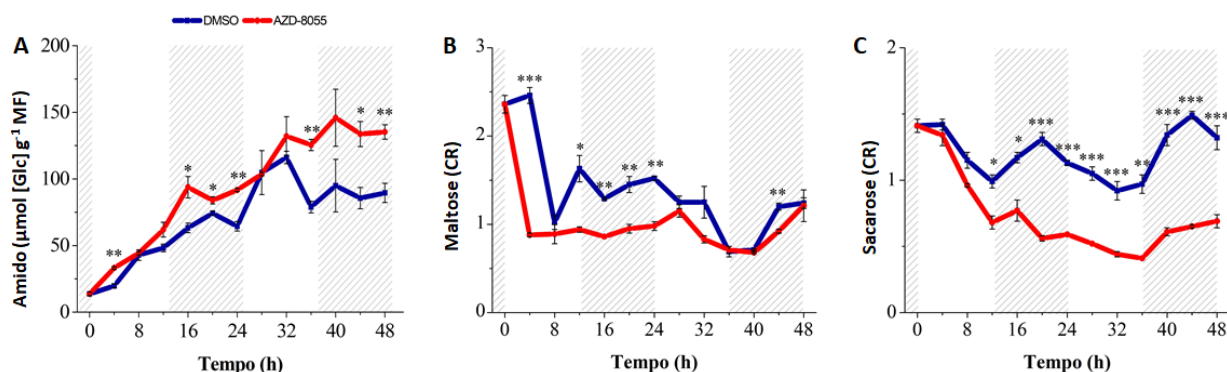


Figura 5.11. Conteúdos de amido, maltose e sacarose em plântulas de Arabidopsis ao longo de dois ciclos de luz contínua.

Plântulas crescidas em fotoperíodo de 12 h foram transferidas para LC e após um ciclo de luz contínua a aplicação dos tratamentos ocorreu no final do período de noite subjetiva. Conteúdo de amido (A), maltose (B) e sacarose (C). Amido foi quantificado enzimaticamente enquanto os dados para maltose e sacarose foram obtidos por GC-TOF-MS. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μM estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. As barras estreadas cinzas ao fundo representam os períodos subjetivos de escuro e as barras brancas os períodos de luz. Cada ponto representa a média de 5 replicatas biológicas com erro padrão e as diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asterisco (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

De acordo com Seki et al., (2017), o padrão quase linear de acúmulo e decréscimo de amido é uma consequência de um ajuste dinâmico controlado pelo relógio circadiano para manter os níveis do fluxo de sacarose constantes, ajustando a homeostase de C para o crescimento. Este ajuste dinâmico é controlado através de um *feedback* por meio de moléculas sinalizadoras do conteúdo de açúcar controlando a degradação de amido. Um candidato capaz de realizar tal função seria o açúcar fosforilado Tre6P, que responde de maneira específica às mudanças nos níveis de sacarose (LUNN et al., 2006; YADAV et al., 2014). Curiosamente, foi mostrado que plantas transgênicas com níveis elevados de Tre6P apresentam inibição da degradação de amido durante a noite (MARTINS et al., 2013).

5.2.3. A inibição da TOR desacopla o sensoriamento de açúcares através da quebra do nexus Tre6P: sacarose

A comparação de alterações nos perfis metabólicos de plântulas tratadas com AZD-8055 e plantas transgênicas com elevados níveis de Tre6P (FIGUEROA et al., 2016) mostra uma similaridade de mais de 70% em suas respostas. Interessantemente, a análise de açúcares fosfatados realizada por LC-MS/MS revelou que plântulas tratadas com AZD-8055 apresentam

aumento significativo de Tre6P logo após 4 h de tratamento, sendo que os níveis deste sinalizador se mantiveram elevados até o final do período de luz. O conteúdo de Tre6P decaiu rapidamente nas primeiras horas de escuro, porém tendeu a ficar mais elevado nas amostras com repressão da TOR (**Figura 5.12**). Este resultado sugere que alterações na atividade da TOR podem também impactar a atividade de sua quinase antagônica SnRK1, ativa geralmente em condição de restrição energética e nutricional (BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007; BAENA-GONZÁLEZ; SHEEN, 2008). Foi demonstrado que a atividade da SnRK1 é reprimida por concentrações elevadas de Tre6P em plântulas de *Arabidopsis*, inibindo a resposta de restrição nutricional e ativando genes envolvidos em processos biossintéticos (GAUTHIER et al., 2010; ZHANG et al., 2009).

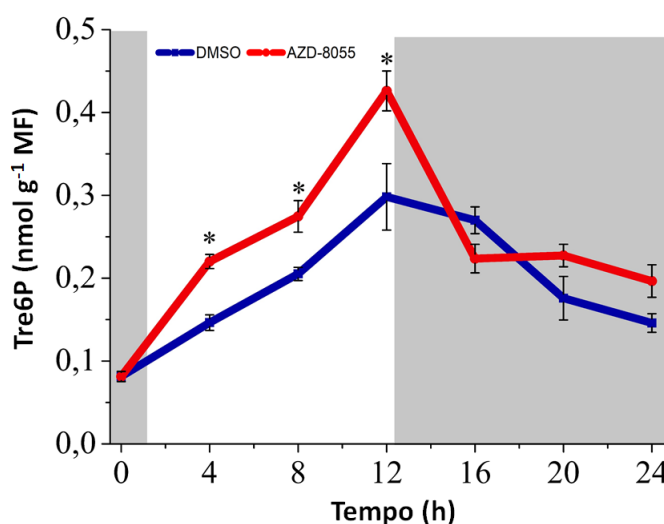


Figura 5.12. Perfil de trealose-6-fosfato durante um ciclo diurno em plântulas de *Arabidopsis*.

Conteúdo de trealose-6-fosfato (Tre6P) obtido por LC-MS/MS. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μ M estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. As barras cinzas representam os períodos de escuro e as brancas os de luz. Cada ponto representa a média de 5 replicatas biológicas com erro padrão. Diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asterisco (* $P < 0,05$).

Flutuações diurnas entre Tre6P e sacarose são altamente correlacionadas em folhas de *Arabidopsis* (FIGUEROA et al., 2016; LUNN et al., 2006; MARTINS et al., 2013; SULPICE et al., 2014; WINGLER et al., 2012; YADAV et al., 2014) mesmo em condições onde o conteúdo de Tre6P é desacoplado do conteúdo de sacarose, como em plântulas contendo superexpressão constitutiva ou induzível de *TPS* ou *TPP*, que sintetizam e degradam Tre6P, respectivamente (FIGUEROA et al., 2016; MARTINS et al., 2013; WINGLER et al., 2012; YADAV

et al., 2014). Ao utilizar um sistema de cultura de plântulas em meio líquido, foi demonstrado que os níveis de Tre6P sofrem alterações de acordo com os níveis de sacarose após *feeding* deste açúcar às plântulas com restrição de C, e que a correlação entre os dois metabólitos é muito maior do que em relação à glicose e frutose. Apesar da Tre6P também aumentar após *feeding* de hexoses, o aumento foi muito menor do que em relação à sacarose e é aparentemente uma resposta indireta devido à síntese de sacarose a partir da fonte externa de hexoses (YADAV et al., 2014). Essa razão entre Tre6P e sacarose é um parâmetro crítico para a planta, e faz parte do mecanismo homeostático para manter os níveis de sacarose em equilíbrio. Dessa forma, a Tre6P não é apenas um sinalizador de disponibilidade de sacarose, mas também um regulador de *feedback* negativo dos níveis desse açúcar (YADAV et al., 2014). Assim, a relação entre sacarose e Tre6P é desacoplada em condições de supressão da TOR por AZD-8055 sendo a razão entre estes açúcares sempre maior em relação às plântulas controle devido ao aumento de Tre6P e redução de sacarose (**Figura 5.13**), sugerindo que TOR “rompe” a sólida correlação entre estes açúcares.

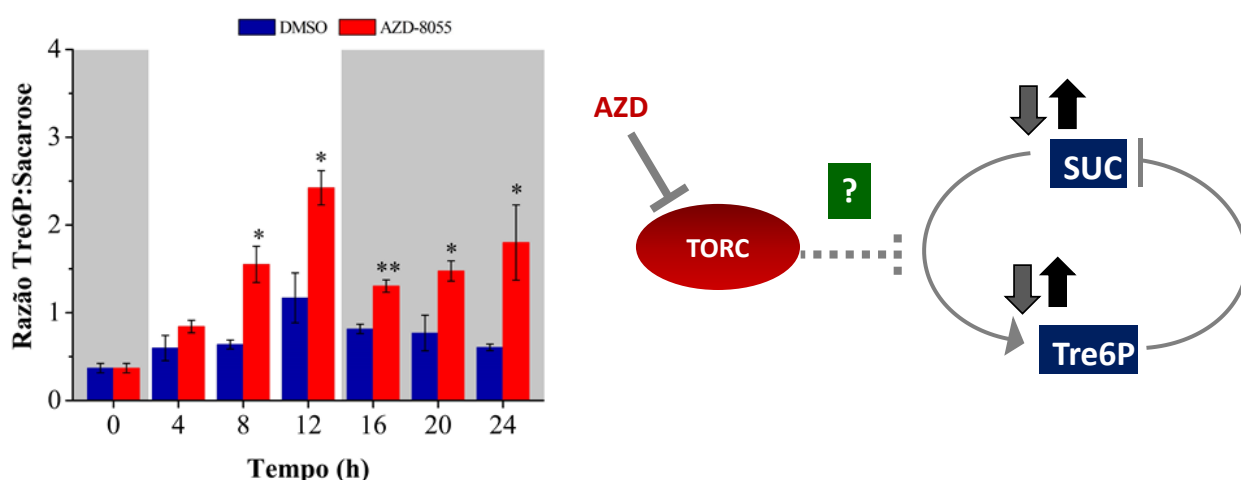


Figura 5.13. Razão entre Tre6P e sacarose durante um ciclo diurno e esquema de relação entre esses açúcares.

Conteúdo de trealose-6-fosfato (Tre6P) obtido por LC-MS/MS e de sacarose obtido por GC-TOF-MS. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μ M estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. As barras cinzas representam os períodos de escuro e as brancas os de luz. Diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asterisco (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Cada barra representa a média de 5 *pools* de amostra biológica. Os níveis de Tre6P mudam de acordo com os níveis de sacarose. Interessantemente, o bloqueio da TOR por AZD-8055 parece ocasionar mudanças nestas relações, aumentando o conteúdo de Tre6P de maneira independente aos níveis de sacarose.

Analisando as vias metabólicas de síntese de Tre6P e de sacarose, pode-se verificar um aumento durante o dia nos níveis de UDPGlc, precursor para síntese de Tre6P e Sac6P (**Figura 5.14**). O conteúdo de Sac6P sugere que a síntese de sacarose pela enzima SPS não está comprometida e apesar de uma tendência à maiores níveis em plântulas tratadas com AZD-8055, caso houvesse realmente algum bloqueio na síntese de sacarose pela SPP esta diferença seria muito mais evidente. Entretanto, a SPS é submetida à diferentes tipos de regulação pós-traducional, ativada por luz através de alterações nos níveis de seus substratos e efetores alostéricos, e também passível de fosforilação (LUNN, 2008, 2016). Com os resultados obtidos até o momento não se pode excluir a possibilidade da SPS ser afetada direta ou indiretamente pela modulação da atividade da quinase TOR.

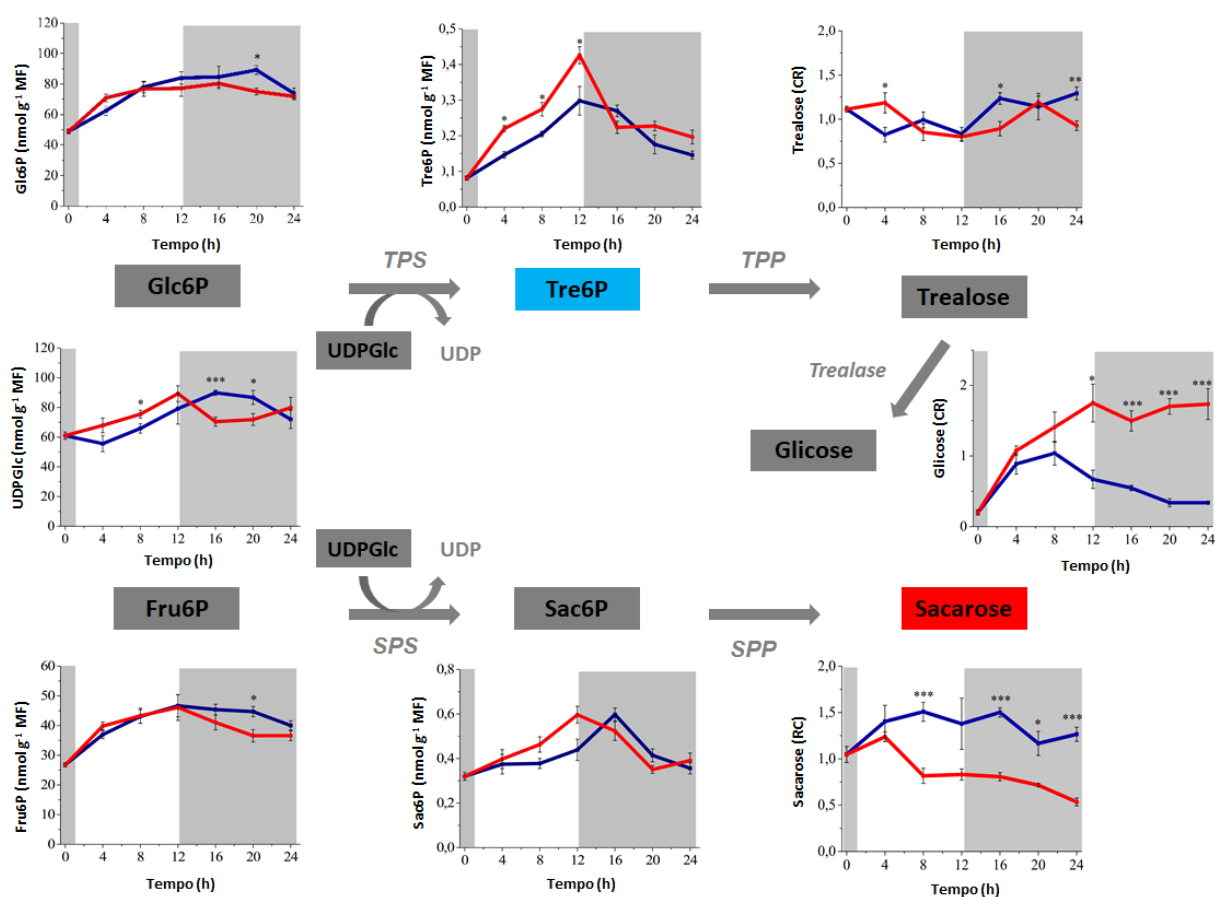


Figura 5.14. Mapa metabólico de precursores de Tre6P e sacarose em plântulas de *Arabidopsis*.

Resumo das vias de síntese de trealose e sacarose interconectados pela UDP-glicose. Dados obtidos por LC-MS/MS e GC-TOF-MS. Enzimas estão representadas em itálico e cinza claro. Já os açúcares pertencentes as vias estão representadas em caixas cinza escura. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μ M estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. As barras cinzas representam os períodos de escuro e as brancas os de luz. Cada ponto representa a média de 5

replicatas biológicas com erro padrão. Diferenças significativas entre tratamentos, calculadas pelo teste T, estão indicadas por asterisco (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

5.3. Considerações finais

Em conjunto, os resultados apresentados neste capítulo sugerem o envolvimento da via TOR, não apenas como um sensor energético, mas um ponto de controle na partição de C, especialmente, entre amido e sacarose. Conforme atestado anteriormente, o fenótipo de excesso de amido após a repressão de componentes da via TOR deve-se principalmente, a um rápido incremento durante o período de luz que parece ser independente de um aumento em sua síntese ao menos no que diz respeito a AGPase. Apesar de haver uma alteração na partição entre amido e sacarose, este não se deve a alteração da síntese de sacarose e nem a maior consumo deste dissacarídeo pela respiração. Curiosamente, a estimativa da taxa de assimilação com base na partição em diferentes *pools* de C indica que a inibição da TOR resulta em maior assimilação de C. E o excesso de amido deve-se principalmente a menor taxa de degradação atestada pelos menores níveis de maltose em plântulas tratadas com AZD-8055. Ao contrário do que sempre foi especulado, plântulas apresentando redução da atividade catalítica do TORC percebem altos níveis de açúcar e não mimetizam uma situação de privação de nutrientes. Uma outra evidência para esta alteração no sensoriamento do *status* de açúcar são os altos níveis de Tre6P, açúcar sinalizador dos níveis de sacarose, indicando que o TORC é responsável por manter a homeostase entre Tre6P e sacarose. Apesar do papel antagônico entre TOR e SnRK1 ser bastante evidenciado na literatura, os resultados revelam a possibilidade da inibição da TOR também afetar negativamente a atividade da SnRK1 através do aumento de Tre6P. Além disso, o balanço de sacarose controlado pela Tre6P parece ser mediado pela TOR, que quando inibida rompe a relação entre esses açúcares. Esta é a primeira descrição real de uma ligação entre TOR e Tre6P e experimentos futuros serão necessários para dissecar como estas duas vias de sinalização interagem para modular o crescimento vegetal.

6. Discussão geral

Desde de sua descoberta há 25 anos atrás, a via TOR vem sendo apontada como crucial na regulação do crescimento celular em eucariotos (CRESPO; HALL; CRESPO, 2002; DOBRENEL et al., 2016b; FINGAR; BLENIS, 2004; HALL, 2016; HENRIQUES et al., 2014; LAPLANTE; SABATINI, 2012; MA; BLENIS, 2009; SCHMELZLE, T., AND HALL, 2000; TEE, 2018; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; XIONG; SHEEN, 2014). Neste contexto, uma de suas principais funções é a biossíntese de macromoléculas como proteínas e lipídeos, que permitem o controle da massa celular e consequentemente, sua proliferação (AHN et al., 2011; DENNIS; FUMAGALLI; THOMAS, 1999; DEPROST et al., 2007; FONSECA et al., 2014; HAY; SONENBERG, 2004; MARTIN; BLENIS, 2002). Em plantas, apesar de uma série de estudos indicarem a participação desta via no controle da síntese proteica (DOBRENEL et al., 2016a; SCHEPETILNIKOV et al., 2013, 2017; SCHEPETILNIKOV; RYABOVA, 2018; SESMA; CASTRESANA; CASTELLANO, 2017) e do metabolismo (CALDANA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; REN et al., 2012), pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais essa via ajusta o crescimento de acordo com a disponibilidade de energia. Uma das principais dificuldades encontradas na última década nos estudos desta via em plantas foi a ausência de um sistema específico e eficiente de inibição deste complexo, como é o caso da rapamicina, amplamente usada para outros eucariotos na elucidação dos mecanismos de controle desta via (XIONG; SHEEN, 2012). Contudo, recentemente, uma nova geração de inibidores, conhecidos como asTORis, foram comprovados por serem eficientes na inibição do complexo TOR em plantas (MONTANÉ; MENAND, 2013), abrindo novas perspectivas para o estudo de alvos primários desta via em organismos fotossintéticos. Neste trabalho, um destes inibidores, AZD-8055, foi utilizado para investigar o papel do TORC no controle diuturno do metabolismo.

6.1. A versatilidade do sistema hidropônico para estudar respostas fisiológicas frente aplicação de tratamentos químicos

Apesar do potencial uso de asTORi para elucidar funções da via TOR em plantas, devido ao custo destes inibidores, a maioria dos experimentos usam estes inibidores em meio de cultivo sólido (DOBRENEL et al., 2016a; DONG et al., 2015; KRAVCHENKO et al., 2015; MONTANÉ; MENAND, 2013) ou em plântulas cultivadas por submersão em meio de cultivo líquido, podendo ocasionar uma série de respostas de estresse causadas tanto pela

manipulação ou por hipóxia, resultando coletivamente, numa redução da atividade deste complexo quinase (DONG et al., 2015). Além disto, muitos destes sistemas limitam a distribuição homogênea de luz entre as plântulas. Assim, como o principal objetivo deste trabalho foi identificar como o TORC controla o metabolismo ao longo do ciclo diuturno, foi adaptado um sistema hidropônico que permitiu avaliar as respostas fisiológicas do TORC frente à inibição química. Além deste sistema ser extremamente versátil e acessível a qualquer laboratório, é altamente escalonável e permite a aplicação de qualquer tratamento em pequenos volumes, incluindo o uso de agentes químicos que podem ser bastante custosos. Este sistema usa caixas de ponteiras de 200 μ L contendo cerca de 300 mL de meio de cultura líquido, ao contrário de sistemas hidropônicos tradicionais que utilizam em média 1 L de meio (BINDSCHEDLER; PALMBLAD; CRAMER, 2008; CONN et al., 2013; GIBEAUT et al., 1997). Uma outra grande vantagem deste sistema em relação ao crescimento em solo ou meio de cultivo líquido é a possibilidade de avaliar separadamente as respostas fisiológicas tanto em parte aérea como em raiz de forma prática e rápida sem causar estresse à planta. Geralmente, plântulas crescidas em meio líquido, além de estarem em condições de anoxia, crescem aglomeradas, e há dificuldade em separar raiz de parte aérea (SCHEIBLE et al., 2004).

Primeiramente, o *status* fisiológico das plântulas crescidas nestes sistemas foi avaliado com sucesso através de genes marcadores de estresse, bem como pela quantificação de amido durante o final do dia e da noite. Após a validação do *status* fisiológico das plântulas, foi determinada a eficiência na inibição do TORC por AZD-8055 através da quantificação da fosforilação do resíduo de serina 240, proteína ribossomal RPS6, um dos alvos cascata abaixo do TORC através de ensaio de imunodeteção da proteína. Dobrenel et al., (2016a) mostraram que os níveis de P-RPS6 são proporcionais aos níveis de expressão da TOR, sendo que há uma drástica redução de P-RPS6 em linhagens de RNAi ou plantas tratadas com AZD-8055, enquanto que em plantas superexpressando *TOR* ou tratadas com sacarose há um aumento da fosforilação desta proteína. Desta forma, este ensaio foi usado para verificar a eficácia da inibição do TORC em plântulas cultivadas no sistema hidropônico e, conforme esperado, foi possível verificar redução dos níveis de P-RPS6 após 30 min de tratamento tanto em raízes como em partes aéreas de plântulas tratadas com AZD-8055. Estes resultados indicam que este sistema hidropônico permite o cultivo de plântulas com condições fisiológicas adequadas para o estudo do metabolismo, possibilitando a análise de raízes e partes aéreas separadamente. Além disto, a otimização deste sistema hidropônico abre perspectivas para

outros estudos fisiológicos não apenas com aplicação de drogas, mas também para análises de fluxos metabólicos que muitas vezes usam metabólitos marcados com isótopos específicos que são extremamente custosos.

6.2. AsTORi uma ferramenta para investigar respostas metabólicas primárias do TORC

Apesar de haver um consenso sobre o papel crucial da via TOR na regulação da síntese de macromoléculas e metabolismo (CALDANA et al., 2013; DEPROST et al., 2007; DONG et al., 2017; MOREAU et al., 2012; REN et al., 2012; XIONG; SHEEN, 2012), ainda são poucos os alvos diretos conhecidos desta quinase, entre eles a proteína quinase S6K envolvida no início da tradução (REN et al., 2011; SCHEPETILNIKOV et al., 2011, 2013, 2017; SCHEPETILNIKOV; RYABOVA, 2018), as proteínas ATG13/1 envolvidas no processo de autofagia (AHN; AHN; PAI, 2015; LIU; BASSHAM, 2010) e a fosfatase TAP46 envolvida na assimilação de N (AHN et al., 2011; AHN; AHN; PAI, 2015). Em levedura, a maioria dos alvos da TOR envolvidos na regulação da biossíntese de macromoléculas e controle do metabolismo foram encontrados graças a utilização da rapamicina, que permite de forma bastante rápida, alterar a estrutura do complexo TOR, impedindo a interação com alvos imediatos. Apesar da ineficiência do uso da rapamicina em plantas, recentemente, o uso de uma nova geração de inibidores do TORC abriu perspectivas para elucidação de novos alvos diretos. Neste trabalho, foi investigado as respostas no metabolismo primário da TOR através de duas novas abordagens: efeitos primários da inibição do TORC por AZD-8055 e como o metabolismo pode ser afetado por esta via ao longo do ciclo diurno. Conforme reportado no capítulo 4, a inibição do TORC por AZD-8055 resulta em alterações massivas no metabolismo primário. Além de respostas já bem descritas, como o aumento de aminoácidos de cadeia ramificada ou alguns intermediários do ciclo do TCA já nas primeiras horas frente à inibição da TOR, a investigação de uma cinética de inibição da TOR em tempos mais curtos permitiu a identificação mais precisa de outros processos. Um exemplo disto, é o intermediário do TCA succinato, cujos níveis haviam sido, descritos previamente, como elevados em plântulas transgênicas de *amiR-tor* (CALDANA et al., 2013), e no presente trabalho foram detectados como inferiores em plântulas tratadas com AZD-8055 em comparação ao controle apenas durante o período de luz. Este metabólito é substrato da enzima succinato desidrogenase responsável pelo transporte de elétrons e de NADH do ciclo do TCA para o complexo II da

cadeia respiratória usado para conduzir a síntese de ATP (ARAÚJO et al., 2011b; HUANG; MILLAR, 2013; VAN DONGEN et al., 2011). Curiosamente, succinato também pode ser produzido através da via alternativa GABA *shunt* servindo como um atalho entre a ação das enzimas 2-oxoglutarato desidrogenase e succinil Co-A ligase, quando há necessidade de compensação para uma redução da atividade do ciclo do TCA (MICHAELI et al., 2011; STUART-GUIMARAES et al., 2007) e para manter a respiração (ARAÚJO et al., 2010). Geralmente, durante a noite anterior, os níveis de citrato aumentam drasticamente através da atividade do TCA, e assim que inicia o dia, este metabólito é redirecionado para a assimilação de N. Neste momento, GABA *shunt* serve como uma rota alternativa para gerar succinato, atuando como um ponto importante do controle do metabolismo de C e N. Curiosamente, plântulas tratadas com AZD-8055 apenas apresentaram menores e maiores níveis de GABA e citrato, respectivamente, durante a noite, diferentemente do que foi observado em relação ao succinato. Estes resultados sugerem que, ao menos durante o dia, as alterações nos níveis de succinato, não se devem a mudanças no GABA *shunt*. O acúmulo de GABA também tem sido atribuído como uma resposta a uma série de estresses (BOUCHE; FROMM, 2004; BOWN; MACGREGOR; SHELPS, 2006; SHELPS; BOWN; MCLEAN, 1999), o que não é encontrado em plântulas tratadas com AZD-8055, sugerindo, ao contrário do que é amplamente reportado, que a inibição do TORC mimetiza condições de estresse.

O succinato também pode ser produzido através do 2-oxoglutarato no TCA. Devido a limitações técnicas, nem sempre foi possível detectar 2-oxoglutarato nos experimentos realizados neste trabalho, exceto quando seus níveis foram mensurados em raízes e partes aéreas separadamente. Em ambos casos, os níveis de 2-oxoglutarato foram menores em plântulas tratadas com AZD-8055 do que no controle. 2-Oxoglutarato é um metabólito chave no controle das relações de C e N, uma vez que é crucial para a assimilação de amônia. Este ácido orgânico pode ser sintetizado através de açúcares mediados pela respiração, ou através da transaminação de aminoácidos seguida da ação da isocitrato desidrogenase, aminotransferases e glutamato desidrogenase (LANCIEN; GADAL; HODGES, 2000). Curiosamente, dados preliminares de nosso grupo utilizando glicose marcada indicaram que as alterações nas taxas de respiração não podem ser atribuídas às mudanças na glicólise. Assim, as alterações nos níveis de 2-oxoglutarato não podem ser atribuídas por diferenças na respiração de açúcar. Embora a função do ciclo do TCA varie dependendo do tipo de tecido ou fatores ambientais (NOCTOR; DE PAEPE; FOYER, 2007), essa via integra a

exportação de ácidos orgânicos e redutores (STITT et al., 2002), e a assimilação de N via GS/GOGAT, produzindo aminoácidos doadores primários (glutamato e glutamina) para a biossíntese de compostos nitrogenados necessários ao crescimento das plantas (BOUCHE; FROMM, 2004; FAIT et al., 2008; PLAXTON; PODESTÁ, 2006). Aminoácidos envolvidos no metabolismo e transporte de N, como asparagina, aspartato e glutamina também estão aumentados em plântulas tratadas com AZD-8055. Interessantemente, *screenings* para busca de novos alvos do TORC utilizando ensaios competitivos de AZD-8055 sugeriram a interação deste complexo com isocitrato desidrogenase e glutamato sintase, duas enzimas envolvidas na assimilação de N. Apesar de ainda preliminares, estes dados apontam para um papel crucial de alguns intermediários do ciclo do TCA no balanço de C e N, onde o TORC parece controlar diretamente a atividade de algumas enzimas do metabolismo primário, abrindo perspectivas para elucidação de alvos diretos desta via.

O controle da biossíntese de macromoléculas é extremamente dependente não apenas de períodos específicos do dia, mas também possuem uma grande influência do relógio circadiano de forma a constantemente ajustar a demanda por crescimento frente à disponibilidade de nutrientes, principalmente, C e N. Devido a esta regulação ser dependente de tempo, uma outra vantagem da aplicação do AZD8055 nos estudos do TORC é poder monitorar alterações metabólicas em períodos específicos do ciclo diuturno, permitindo investigar o metabolismo de C durante períodos de incorporação, partição entre amido e sacarose e utilização durante a noite.

6.3. TORC regula a degradação de amido durante o período de luz para sustentar o crescimento, a partição e a translocação de C

Assim como linhagens transgênicas apresentando alterações dos níveis de componentes da via TOR (CALDANA et al., 2013; DOBRENEL et al., 2013; MOREAU et al., 2012), plântulas tratadas com AZD-8055 apresentaram fenótipo de acúmulo de amido. Contudo, a possibilidade de inibir o TORC em tempos específicos do dia, permitiu verificar que o acúmulo de amido ocorre, principalmente, no período de luz, independentemente de mudanças na atividade da primeira enzima envolvida na síntese do amido, a AGPase. Análises de cinética mais detalhada durante o período de luz após a inibição do TORC (1 a 2 h após início do

período de luz) apontaram para menores níveis de maltose, sugerindo uma menor degradação de amido durante o dia.

Tradicionalmente, a maioria das pesquisas assumia que a degradação do amido ocorria, preferencialmente, durante o período de escuro e cessando-se ao amanhecer (KÖTTING et al., 2010; WEISE; VAN WIJK; SHARKEY, 2011). Contudo, mais recentemente, foi demonstrado que síntese e degradação de amido ocorrem concomitantemente em folhas iluminadas, sendo que seu conteúdo seria resultado do equilíbrio entre sua síntese e a degradação, e da eficiência com que seus produtos de degradação são reciclados (BASLAM et al., 2017). A regulação da degradação durante o dia parece ser mais acentuada em períodos do dia em que a fotossíntese é reduzida como próximo ao final do dia (superiores a 10 h após o amanhecer) ou em dias longos 14 h após o amanhecer (FERNANDEZ et al., 2017). Desta forma, a degradação de amido também no período de luz seria crucial para a liberação de açúcares frente às alterações em fotoperíodos propiciando a otimização do crescimento. Interessantemente, Seki et al., (2017) verificaram que a regulação da degradação de amido durante o amanhecer é uma propriedade emergente da manutenção da homeostase de açúcares para o crescimento. Desta forma, a liberação de açúcar frente à degradação de amido permite o ajuste do oscilador do relógio sincronizando as demandas internas com o ambiente externo. Curiosamente, a inibição da TOR afeta a degradação ao amanhecer (primeiras 2 h após o tratamento) e ao final do dia, estando em acordo com o que foi reportado por Seki et al., (2017) e Fernandez et al., (2017). Uma outra observação interessante foi que quando o AZD-8055 foi aplicado em plântulas crescidas em luz contínua, além da inibição da degradação de amido, os níveis de maltose perderam sua oscilação característica (ESPINOZA et al., 2010; LU, 2005). Neste contexto, TOR parece controlar de alguma forma a liberação de açúcares através da degradação de amido para ajustar o crescimento por um mecanismo ainda desconhecido. Muitas enzimas envolvidas na degradação de amido estão sujeitas a regulação pós-traducional por fosforilação. Assim é plausível especular que o TORC possa estar envolvido diretamente na fosforilação de alguma enzima crucial na degradação do amido, ou ainda que regula alguma outra via metabólica que afeta essa degradação.

6.4. A inibição do TORC desacopla a sinalização de açúcares

O ajuste de C direcionado para o crescimento depende de uma flexibilidade na partição de C entre compostos de reserva, ou biossíntese de componentes estruturais especialmente durante o período de luz (MENGIN et al., 2017). Se o fenótipo da repressão da TOR ocasionasse unicamente menor demanda de sacarose para o crescimento, seria esperado que este açúcar estivesse elevado nestas condições, o que poderia promover maior partição de C para amido. Contudo, plântulas tratadas com AZD-8055 apresentaram baixos níveis de sacarose, que não puderam ser atribuídos a uma diminuição de sua síntese, menor assimilação de C ou maior taxa de respiração. Curiosamente, este fenótipo também foi observado quando as raízes e partes aéreas de plântulas tratadas com AZD-8055 foram analisadas separadamente. Em raízes, não apenas a sacarose, mas também as hexoses, glicose e frutose, foram totalmente consumidas, indicando menor disponibilidade destes açúcares para manter a respiração e o metabolismo basal das células. Por outro lado, em folhas, apesar dos baixos níveis de sacarose, há maiores níveis de hexoses em plântulas tratadas com AZD-8055, sugerindo, provavelmente, sua hidrólise em frutose e glicose por ação de invertases. De maneira geral, há um consenso sobre o envolvimento de invertases em resposta à diferentes estresses (STURM, 1999; XIANG et al., 2011). Ademais, é especulado que a inibição da TOR mimetize uma condição de resposta a estresse, principalmente, energético, devido ao estímulo de sua via antagônica SnRK1 (DOBRENEL et al., 2016b). Contudo, análises da expressão de genes marcadores de resposta a estresse energético, como *KDM4*, indicaram que a inibição do TORC por AZD-8055 não resulta numa resposta característica de privação de nutrientes imediata. Ao contrário, a repressão do TORC leva a um aumento da expressão de genes responsivos a açúcares, como é o caso de *TP55*, mesmo em condições de baixos níveis de sacarose.

Interessantemente, há uma grande sobreposição de respostas metabólicas, cerca de 70%, entre plântulas tratadas com AZD-8055 e linhas transgênicas induzíveis de *otsA*, que apresentam elevados teores do açúcar sinalizador Tre6P (LUNN, 2016; YADAV et al., 2014). Um exemplo é a diminuição da degradação de amido no período noturno (MARTINS et al., 2013), bem como o aumento de intermediários do ciclo do TCA como consequência do estímulo de reações anapleróticas para alimentar o ciclo do TCA na produção de esqueleto de C para a síntese de macromoléculas (FIGUEROA et al., 2016).

6.5. A Tre6P inibe a degradação de amido durante o período de luz

De maneira surpreendente, a repressão do TORC ocasionou elevados teores de Tre6P, independentemente dos níveis de sacarose quando comparado ao controle. Yadav et al., (2014) propuseram um modelo, onde a Tre6P atua tanto como um sinal do *status* de sacarose como regulando negativamente seus níveis, resultando numa correlação robusta sempre positiva entre estes dois metabolitos. Deste modo, a inibição do TORC indicaria um desacoplamento da sinalização de açúcares, rompendo inesperadamente a sólida correlação positiva entre sacarose e Tre6P. Neste trabalho, é demonstrado pela primeira vez que o TORC não é apenas afetado pelos níveis de açúcares (glicose), mas também regula a sinalização de açúcares com uma possível conexão com a via de Tre6P. Um mecanismo simplificado para tal interação seria que a inibição do TORC afeta globalmente a tradução de proteínas e consequentemente, a síntese de alguma proteína envolvida na manutenção da homeostase entre sacarose e Tre6P. Yadav et al., (2014) mostraram que a resposta de Tre6P aos níveis de sacarose é dependente da síntese de proteínas. Uma outra possibilidade é que o TORC tenha como alvo primário enzimas ou proteínas regulatórias envolvidas na síntese de sacarose e Tre6P (**Figura 6.1**). A elucidação do modo de ação do TORC neste processo seria crucial para entender como a disponibilidade de açúcar é integrada ao crescimento.

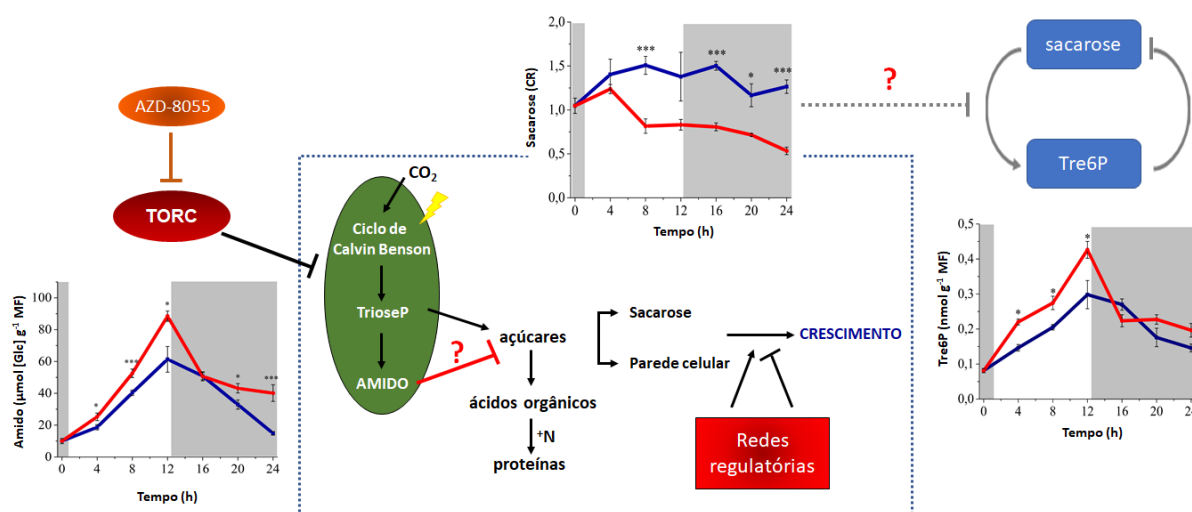


Figura 6.1. Possíveis cenários da interação do TORC com o metabolismo de açúcares.

7. Referências

- AHN, C. S. et al. The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. **The Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 185–209, 2011.
- AHN, C. S.; AHN, H.-K.; PAI, H.-S. Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 827–840, fev. 2015.
- ALBERT, S. et al. New inhibitors of the mammalian target of rapamycin signaling pathway for cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 19, n. 8, p. 919–930, 23 ago. 2010.
- ALLAN, W. L.; SHELPS, B. J. Fluctuations of γ -aminobutyrate, γ -hydroxybutyrate, and related amino acids in Arabidopsis leaves as a function of the light – dark cycle, leaf age, and N stress. **Canada Journal Botanic**, v. 84, p. 1339–1346, 2006.
- ANDERSON, C. T. We be jammin': an update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 2, p. 495–502, jan. 2016.
- ANDERSON, G. H.; VEIT, B.; HANSON, M. R. The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. v. 11, p. 1–11, 2005.
- APELT, F. et al. Phytotyping 4D: a light-field imaging system for non-invasive and accurate monitoring of spatio-temporal plant growth. **The Plant Journal**, v. 82, p. 693–706, 2015.
- APELT, F. et al. Circadian, carbon, and light control of expansion growth and leaf movement. **Plant Physiology**, v. 174, n. June, p. 1949–1968, 2017.
- ARAÚJO, E. F. **The influence of the Target of Rapamycin (TOR) on starch metabolism in Arabidopsis thaliana**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- 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. **The Plant Cell**, 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, jun. 2011a.
- ARAÚJO, W. L. et al. Antisense Inhibition of the 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex in Tomato Demonstrates Its Importance for Plant Respiration and during Leaf Senescence and Fruit Maturation. **The Plant Cell**, v. 24, n. 6, p. 2328–2351, 2012.
- ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R. Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. **Phytochemistry**, v. 72, n. 9, p. 838–843, 2011.
- ARAÚJO, W. L. W. L. et al. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 1, p. 1–21, 2011b.
- AZOULAY-SHEMER, T. et al. Starch biosynthesis in guard cells but not in mesophyll cells is involved in CO₂-induced stomatal closing. **Plant physiology**, v. 171, n. 2, p. 788–98, 2016.
- BADER, M. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 57, n. 10, p. 703, out. 1980.
- BAENA-GONZÁLEZ, E. et al. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. **Nature**, v. 448, n. 23, 2007.
- BAENA-GONZÁLEZ, E. Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. **Molecular Plant**, v. 3, n. 2, p. 300–313, 2010.

- BAENA-GONZÁLEZ, E.; SHEEN, J. Convergent energy and stress signaling. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 13, p. 1360–1385, 2008.
- BALL, S. G.; MORELL, M. K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 207–233, jun. 2003.
- BAR-PELED, L.; SABATINI, D. M. Regulation of mTORC1 by amino acids. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 7, p. 400–406, jul. 2014.
- BARBET, N. C. et al. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 7, n. 1, p. 25–42, jan. 1996.
- BARRATT, D. H. P. et al. Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 13124–13129, 2009.
- BASLAM, M. et al. Genetic and isotope ratio mass spectrometric evidence for the occurrence of starch degradation and cycling in illuminated Arabidopsis leaves. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.
- BECK, T.; HALL, M. N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 689–692, 9 dez. 1999.
- BENJAMIN, D. et al. Rapamycin passes the torch : a new generation of mTOR inhibitors. **Nature**, v. 10, n. 11, p. 868–880, 2011.
- BENTZINGER, C. F. et al. Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, Causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 5, p. 411–424, nov. 2008.
- BERETTA, L. et al. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. **The EMBO journal**, v. 15, n. 3, p. 658–664, 1996.
- BINDSCHEDLER, L. V.; PALMBLAD, M.; CRAMER, R. Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 1962–1972, 1 jul. 2008.
- BLASING, O. E. et al. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 17, n. 12, p. 3257–3281, 1 dez. 2005.
- BOSOTTI, R.; ISACCHI, A.; SONNHAMMER, E. L. L. FAT: A novel domain in PIK-related kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 5, p. 225–227, 2000.
- BOUCHE, N.; FROMM, H. GABA in plants: just a metabolite? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 3, p. 1360–1385, 2004.
- BOWN, A. W.; MACGREGOR, K. B.; SHELP, B. J. Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 9, p. 424–427, set. 2006.
- BOYES, D. C. et al. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. **The Plant cell**, v. 13, n. 7, p. 1499–1510, 1 jul. 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BROACH, J. R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, v. 192, n. 1, p. 73–105, 1 set. 2012.
- BROECKX, T.; HULSMANS, S.; ROLLAND, F. The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 22,

p. 6215–6252, 17 dez. 2016.

BUDDE, R. J.; RANDALL, D. D. Pea leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex is inactivated in vivo in a light-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 2, p. 673–676, 1 jan. 1990.

CALDANA, C. et al. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 73, n. 6, p. 897–909, 2013.

CARDENAS, M. E. et al. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. **Genes & development**, v. 13, n. 3, p. 3271–3279, 1999.

CHATTERTON, N. J.; SILVIUS, J. E. Photosynthate Partitioning into Starch in Soybean Leaves: II. Irradiance level and daily photosynthetic period duration effects. **Plant Physiology**, v. 67, n. 2, p. 257–260, 1 fev. 1981.

CHEN, E. J.; KAISER, C. A. LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 2, p. 333–347, 28 abr. 2003.

CHEN, J. et al. GATOR1 regulates nitrogenic cataplerotic reactions of the mitochondrial TCA cycle. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 11, p. 1179–1187, 2017.

CHENG, C. et al. Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 12, p. 6632–6640, dez. 1995.

CHIA, D. W. et al. Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. **Planta**, v. 211, p. 743–751, 2000.

CHIN, R. M. et al. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 397–401, 2014.

CHO, J. et al. Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. **Plant Physiology**, v. 149, n. 2, p. 745–759, 2009.

CHO, M. H. et al. Manipulation of triose phosphate/phosphate translocator and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase, the key components in photosynthetic sucrose synthesis, enhances the source capacity of transgenic *Arabidopsis* plants. **Photosynthesis Research**, v. 111, n. 3, p. 261–268, 2 mar. 2012.

CHOI, J. et al. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 7, p. 388–394, jul. 2011.

CHRESTA, C. M. et al. AZD-8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 288–298, 1 jan. 2010.

COHEN, A.; HALL, M. N. An amino acid shuffle activates mTORC1. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 399–400, fev. 2009.

CONN, S. J. et al. Protocol: Optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 4, 5 fev. 2013.

COOKSON, S. J. et al. Temporal kinetics of the transcriptional response to carbon depletion and sucrose readdition in *Arabidopsis* seedlings. **Plant, Cell and Environment**, v. 39, n. 4, p. 768–786, 2016.

CORNU, M.; ALBERT, V.; HALL, M. N. mTOR in aging, metabolism, and cancer. **Current Opinion in**

Genetics & Development, v. 23, n. 1, p. 53–62, fev. 2013.

COSENTINO, G. P. et al. Eap1p, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 13, p. 4604–4613, 1 jul. 2000.

COSGROVE, D. J. Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 2, p. 463–476, 2015.

COSGROVE, D. J. Catalysts of plant cell wall loosening. **F1000Research**, 29 jan. 2016.

CRESPO, J. L.; HALL, M. N.; CRESPO, L. Elucidating TOR Signaling and Rapamycin Action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 4, p. 579–591, 2002.

CRESPO, L. et al. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 6784–6789, 2002.

CUADROS-INOSTROZA, Á. et al. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 10, 2009.

CYBULSKI, N.; HALL, M. N. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 12, p. 620–627, 2009.

DAIE, J. Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. **Photosynthesis Research**, v. 38, n. 1, p. 5–14, out. 1993.

DE VLEESSCHAUWER, D. et al. Target of rapamycin signaling orchestrates growth–defense trade-offs in plants. **New Phytologist**, v. 217, n. 1, p. 305–319, 2018.

DENG, K. et al. Target of Rapamycin Is a Key Player for Auxin Signaling Transduction in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2016.

DENNIS, P. B.; FUMAGALLI, S.; THOMAS, G. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 9, n. 1, p. 49–54, fev. 1999.

DEPROST, D. et al. An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 4, p. 844–850, jan. 2005.

DEPROST, D. et al. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. **EMBO Reports**, v. 8, n. 9, p. 864–870, 2007.

DIETRICH, K. et al. Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. **The Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 381–395, jan. 2011.

DOBRENEL, T. et al. Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 2, p. 477–481, 2011.

DOBRENEL, T. et al. Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? **Frontiers in Plant Science**, v. 412, n. 12, p. 1–6, 2013.

DOBRENEL, T. et al. The Arabidopsis TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. November, p. 1611, 2016a.

DOBRENEL, T. et al. TOR signaling and nutrient sensing. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p.

261–285, 2016b.

DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5734, p. 630–633, jul. 2005.

DODD, A. N. et al. The circadian regulation of photosynthesis. **Photosynthesis Research**, v. 119, n. 1–2, p. 181–190, 2014.

DONG, P. et al. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. September, p. 1–15, 2015.

DONG, Y. et al. Sulfur availability regulates plant growth via glucose-TOR signaling. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1174, 27 dez. 2017.

DORNBUSCH, T. et al. Differentially Phased Leaf Growth and Movements in Arabidopsis Depend on Coordinated Circadian and Light Regulation. **The Plant Cell**, v. 26, n. 10, p. 3911–3921, 1 out. 2014.

DOWLING, R. J. O. et al. Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 3, p. 433–439, mar. 2010.

DRÖGE-LASER, W.; WEISTE, C. The C/S 1 bZIP Network: A Regulatory Hub Orchestrating Plant Energy Homeostasis. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 5, p. 422–433, maio 2018.

DURAND, M. et al. Carbon source–sink relationship in Arabidopsis thaliana: the role of sucrose transporters. **Planta**, v. 247, n. 3, p. 587–611, 14 mar. 2018.

DÜVEL, K. et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 171–183, 2010.

DÜVEL, K.; BROACH, J. R. The role of phosphatases in TOR signaling in yeast. In: KAWAOKA, Y. (Ed.). . **TOR**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. v. 283p. 19–38.

EFEYAN, A.; COMB, W. C.; SABATINI, D. M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 302–310, 15 jan. 2015.

ESPINOZA, C. et al. Interaction with diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in arabidopsis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

FAHNENSTICH, H. et al. Alteration of organic acid metabolism in Arabidopsis overexpressing the maize C4 NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 640–652, nov. 2007.

FAIT, A. et al. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 1, p. 14–19, jan. 2008.

FELDMAN, M. E. et al. Active-Site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. **PLoS Biology**, v. 7, n. 2, p. e1000038, 10 fev. 2009.

FERNANDEZ, O. et al. Leaf starch turnover occurs in long days and in falling light at the end of the day. **Plant Physiology**, v. 174, n. 4, p. 2199–2212, ago. 2017.

FIGUEROA, C. M. et al. Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. **The Plant Journal**, v. 85, n. 3, p. 410–423, fev. 2016.

FINGAR, D. C.; BLENIS, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 23, n. 18, p. 3151–3171, 19 abr. 2004.

- FONSECA, B. D. et al. The ever-evolving role of mTOR in translation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 36, p. 102–112, dez. 2014.
- FORDE, B. G. Local and long range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 203–224, jun. 2002.
- FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 125–145, jan. 2001.
- FRITZ, C. et al. Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. **The Plant Journal**, v. 46, n. 4, p. 533–548, maio 2006.
- FRUMAN, D. A.; ROMMEL, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 140–156, 1 fev. 2014.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, J. M. et al. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). **Biochemical Journal**, v. 421, n. 1, p. 29–42, 1 jul. 2009.
- GAUBITZ, C. et al. Molecular basis of the rapamycin insensitivity of Target Of Rapamycin complex 2. **Molecular Cell**, v. 58, n. 6, p. 977–988, jun. 2015.
- GAUTHIER, P. P. G. et al. In folio isotopic tracing demonstrates that nitrogen assimilation into glutamate is mostly independent from current CO₂ assimilation in illuminated leaves of *Brassica napus*. **New Phytologist**, v. 185, n. 4, p. 988–999, mar. 2010.
- GEIGER, D. R.; SERVATES, J. C. Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C₃ plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 235–256, 1994.
- GENT, L.; FORDE, B. G. How do plants sense their nitrogen status? **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 10, p. 2531–2539, maio 2017.
- GIAVALISCO, P. et al. Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using ¹³C, ¹⁵N and ³⁴S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. **Plant Journal**, v. 68, n. 2, p. 364–376, 2011.
- GIBEAUT, D. M. et al. Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. **Plant Physiology**, v. 115, n. 2, p. 317–319, out. 1997.
- GIBON, Y. et al. Adjustment of diurnal starch turnover to short days: Depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the followin. **The Plant Journal**, v. 39, n. 6, p. 847–862, 2004a.
- 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. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3304–3325, 8 dez. 2004b.
- GIBON, Y. et al. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. **Genome Biology**, v. 7, n. 8, p. R76, 2006.
- GISSOT, L. et al. AKIN beta contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through Its KIS/GBD Sequence. **Plant physiology**, v. 142, n. 3, p. 931–944, 15 set. 2006.
- GONZÁLEZ, A. et al. TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120250, 13 mar. 2015.

GONZALEZ, N.; VANHAEREN, H.; INZÉ, D. Leaf size control: Complex coordination of cell division and expansion. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 332–340, 2012.

GORTON, H. L. et al. Circadian Stomatal Rhythms in Epidermal Peels from *Vicia faba*. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 90, n. 4, p. 1329–1334, 1 ago. 1989.

GRAF, A. et al. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. **PNAS**, p. 1–6, 2010.

GRAF, A.; SMITH, A. M. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 3, p. 169–175, 8 jun. 2011.

GRAHAM, I. A. Seed Storage Oil Mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 115–142, jun. 2008.

GRANOT, D. et al. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 809–819, mar. 2014.

GRANOT, D.; DAVID-SCHWARTZ, R.; KELLY, G. Hexose Kinases and Their Role in Sugar-Sensing and Plant Development. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. March, p. 44, 2013.

GREENHAM, K.; MCCLUNG, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. **Nature reviews. Genetics**, v. 16, n. 10, p. 598–610, 2015.

HA, S. et al. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 3, p. 172–179, mar. 2012.

HACHIYA, T. et al. Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 3, p. 577–591, 2012.

HAGHIGHAT, A. et al. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. **The EMBO journal**, v. 14, n. 22, p. 5701–9, 15 nov. 1995.

HALL, M. N. TOR and paradigm change: cell growth is controlled. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 18, p. 2804–2806, 15 set. 2016.

HANNAH, M. A. et al. Combined transcript and metabolite profiling of *Arabidopsis* grown under widely variant growth conditions facilitates the identification of novel metabolite-mediated regulation of gene expression. **Plant physiology**, v. 152, n. 4, p. 2120–2129, 1 abr. 2010.

HARA, K. et al. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF4E BP1 through a common effector mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14484–14494, 5 jun. 1998.

HARMER, S. L. et al. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2110–2113, 2000.

HARRIS, D. M.; MYRICK, T. L.; RUNDLE, S. J. The *Arabidopsis* homolog of yeast TAP42 and mammalian alpha4 binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling. **Plant physiology**, v. 121, n. 2, p. 609–617, 1999.

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

HAVKO, N. et al. Control of Carbon Assimilation and Partitioning by Jasmonate: An Accounting of Growth–Defense Tradeoffs. **Plants**, v. 5, n. 1, p. 7, 2016.

- HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & Development**, v. 18, n. 16, p. 1926–1945, 15 ago. 2004.
- HAYANO-KANASHIRO, C. et al. Analysis of gene expression and physiological responses in three mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7531, 30 out. 2009.
- HAYDON, M. J. et al. Photosynthetic entrainment of the Arabidopsis thaliana circadian clock. **Nature**, v. 502, n. 7473, p. 689–692, 2013.
- HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p. 67–93, dez. 2009.
- HEITMAN, J.; RAO MOVVA, N.; HALL, M. N. Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast. **Science, New Series**, v. 253, n. 23, p. 905–909, 1991.
- HEJAZI, M. et al. The two plastidial starch-Related dikinases sequentially phosphorylate glucosyl Residues at the surface of both the A- and B-Type allomorphs of crystallized maltodextrins but the mode of action differs. **Plant physiology**, v. 150, n. 2, p. 962–976, 1 jun. 2009.
- HELDT, H. W. et al. Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. **Plant physiology**, v. 59, n. 6, p. 1146–1155, 1 jun. 1977.
- HENDRIKS, J. H. M. et al. ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. **Plant Physiology**, v. 133, n. 2, p. 838–849, 1 out. 2003.
- HENNESSEY, T. L.; FIELD, C. B. Circadian rhythms in photosynthesis. **Plant physiology**, v. 96, n. 3, p. 831–836, 1991.
- HENRIQUES, R. et al. Balancing act: Matching growth with environment by the TOR signalling pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2691–2701, 2014.
- HILL, C. B.; UTE, R. Metabolic Profiling of Plants by GC–MS. In: WECKWERTH, W.; KAHL, G. (Eds.). **The Handbook of Plant Metabolomics**. Wiley Online Books. [s.l: s.n.]. p. 1–23.
- HO, L. C. Metabolism and Compartmentation of Imported Sugars in Sink Organs in Relation to Sink Strength. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 355–378, jun. 1988.
- HORNITSCHKE, P. et al. Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. **The Plant Journal**, v. 71, n. 5, p. 699–711, set. 2012.
- HORRER, D. et al. Blue light induces a distinct starch degradation pathway in guard cells for stomatal opening. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. 362–370, fev. 2016.
- HUANG, S.; MILLAR, A. H. Succinate dehydrogenase: The complex roles of a simple enzyme. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 344–349, 2013.
- HUBER, A. et al. reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis Characterization of the rapamycin- sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. **Genes & Development**, p. 1929–1943, 2009.
- HUMMEL, I. et al. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: An integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. **Plant Physiology**, v. 154, n. 1, p. 357–372, 2010.

- IMAMURA, S. et al. Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae. **Plant Molecular Biology**, v. 89, n. 3, p. 309–318, 8 out. 2015.
- INOKI, K. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. **Genes & Development**, v. 17, n. 15, p. 1829–1834, 1 ago. 2003.
- ISHIHARA, H. et al. Quantifying protein synthesis and degradation in Arabidopsis by dynamic ¹³CO₂ labeling and analysis of enrichment in individual amino acids in their free pools and in protein. **Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 74–93, maio 2015.
- ISHIHARA, H. et al. Growth rate correlates negatively with protein turnover in Arabidopsis accessions. **Plant Journal**, v. 91, n. 3, p. 416–429, 2017.
- IVAKOV, A. A. et al. Cellulose synthesis and cell expansion are regulated by different mechanisms in growing Arabidopsis hypocotyls. **The Plant Cell**, v. 29, n. June, p. tpc.00782.2016, 26 maio 2017.
- JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 113–127, 1 fev. 2010.
- JARAMILLO, M. et al. RNA unwinding in translation: assembly of helicase complex intermediates comprising eukaryotic initiation factors eIF-4F and eIF-4B. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 12, p. 5992–5997, dez. 1991.
- JEWELL, J. L.; RUSSELL, R. C.; GUAN, K.-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 133–139, 30 mar. 2013.
- JÜPPNER, J. et al. Dynamics of lipids and metabolites during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Journal**, v. 92, n. 2, p. 331–343, 2017.
- JÜPPNER, J. et al. The target of rapamycin kinase affects biomass accumulation and cell cycle progression by altering carbon/nitrogen balance in synchronized *Chlamydomonas reinhardtii* cells. **The Plant Journal**, v. 93, n. 2, p. 355–376, jan. 2018.
- KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 363, p. 1981–1989, 2001.
- KALT-TORRES, A. W. et al. Diurnal changes in maize leaf photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 83, n. 2, p. 283–288, 1987.
- KAUP, M. T. A Role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. **Plant physiology**, v. 129, n. 4, p. 1616–1626, 1 ago. 2002.
- KIM, D.-H. et al. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. **Molecular Cell**, v. 11, n. 4, p. 895–904, abr. 2003.
- KIM, H. J.; KIEBER, J. J.; SCHALLER, G. E. The rice F-box protein KISS ME DEADLY2 functions as a negative regulator of cytokinin signalling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 12, p. e26434, 28 dez. 2013.
- KIM, J.; GUAN, K.-L. Amino acid signaling in TOR activation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 1001–1032, 2011.
- KIM, Y.-M. et al. A dual role of tobacco hexokinase 1 in primary metabolism and sugar sensing. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 7, p. 1311–1327, jul. 2013.
- KINGSBURY, J. M.; SEN, N. D.; CARDENAS, M. E. Branched-Chain aminotransferases control TORC1 signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 12, p. e1005714, 11 dez. 2015.
- KIRCHER, S.; SCHOPFER, P. Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to

control root growth during early seedling development in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11217–11221, 2012.

KLECZKOWSKI, L. A.; KUNZ, S.; WILCZYNSKA, M. Mechanisms of UDP-Glucose Synthesis in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 4, p. 191–203, 14 jul. 2010.

KOCH, K. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 3, p. 235–246, 2004.

KOCH, K. E. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 509–540, 28 jun. 1996.

KÖLLING, K. et al. A device for single leaf labelling with CO₂ isotopes to study carbon allocation and partitioning in Arabidopsis thaliana. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 45, 2013.

KÖLLING, K. et al. Carbon partitioning in Arabidopsis thaliana is a dynamic process controlled by the plants metabolic status and its circadian clock. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 10, p. 1965–1979, out. 2015.

KOMEILI, A. et al. Mechanism of metabolic control: Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 4, p. 863–878, 2000.

KONG, M. The PP2A-associated protein 4 is an essential inhibitor of apoptosis. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 695–698, 22 out. 2004.

KÖTTING, O. et al. Regulation of starch metabolism: The age of enlightenment? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 321–329, 2010.

KRAVCHENKO, A. et al. Mutations in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, p. 992–997, 2015.

KUNZ, J. et al. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 585–596, 1993.

LALONDE, S. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. **the Plant Cell Online**, v. 11, n. 4, p. 707–726, 1 abr. 1999.

LAM, H.-M. et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 569–593, 1996.

LANCIEN, M.; GADAL, P.; HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. **Plant Physiology**, v. 123, n. 3, p. 817–824, 2000.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, 2012.

LASTDRAGER, J.; HANSON, J.; SMEEKENS, S. Sugar signals and the control of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 799–807, 2014.

LEA, P. J.; FORD, B. G. The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, n. 5, p. 541–556, maio 1994.

LEE, D. Y.; FIEHN, O. Metabolomic response of Chlamydomonas reinhardtii to the inhibition of Target of Rapamycin (TOR) by rapamycin. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 923–931, 28 jul. 2013.

LEE, S.-K. et al. Loss of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (Oryza sativa). **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 12, p.

1851–1863, dez. 2008.

LEHMANN, M. et al. Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. **Metabolomics**, v. 8, n. 1, p. 143–153, 2012.

LEIBER, R.-M. et al. The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 22, n. 6, p. 1898–1908, 2010.

LEMOINE, R. et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 7, p. 1–21, 2013.

LI-BEISSON, Y. et al. Acyl-lipid metabolism. **The Arabidopsis Book**, v. 11, p. e0161, jan. 2013.

LI, J. et al. Post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase in response to light is not a major determinant of fine regulation of transitory starch accumulation in *Arabidopsis* leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 433–444, 2012.

LI, J. et al. Target of rapamycin complex 1 and Tap42-associated phosphatases are required for sensing changes in nitrogen conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 938–948, dez. 2017a.

LI, J.; TERZAGHI, W.; DENG, X. W. Genomic basis for light control of plant development. **Protein & Cell**, v. 3, n. 2, p. 106–116, 17 fev. 2012.

LI, L. et al. TOR-inhibitor insensitive-1 (TRIN1) regulates cotyledons greening in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. October, p. 861, 2015.

LI, L.; SHEEN, J. Dynamic and diverse sugar signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 33, p. 116–125, 2016.

LI, S. et al. Cellulose synthesis and its regulation. **The Arabidopsis Book**, v. 12, p. e0169, jan. 2014.

LI, X. et al. Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 10, p. 2765–2770, 2017b.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

LIU, Y.; BASSHAM, D. C. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11883, 2010.

LIU, Y.; BASSHAM, D. C. Autophagy: Pathways for self-eating in plant cells. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 215–237, 2012.

LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, Have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 457–468, set. 2002.

LOEWITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.

LOMAKO, J.; LOMAKO, W. M.; WHELAN, W. J. A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. **The FASEB Journal**, v. 2, n. 15, p. 3097–3103, dez. 1988.

LU, Y. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. **Plant physiology**, v. 138, n. 4, p. 2280–2291, 1 ago. 2005.

LUNN, J. E. et al. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*.

Biochemical Journal, v. 397, n. 1, p. 139–148, 1 jul. 2006.

LUNN, J. E. Sucrose Metabolism. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.

LUNN, J. E. Sucrose Metabolism. In: **eLS**. Major Reference Works. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 1–9.

LUNN, J. E.; AP REES, T. Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. **Biochemical Journal**, v. 267, n. 3, p. 739–743, 1990.

LUNN, J. E.; FURBANK, R. T. Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C4 plants. **Planta**, v. 202, n. 1, p. 106–111, 30 abr. 1997.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 307–318, 2 maio 2009.

MACNEILL, G. J. et al. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 16, p. 4433–4453, 2017.

MAEGAWA, K. et al. Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, n. 5, p. 2019–2030, 2015.

MAHFOUZ, M. M. et al. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. **The Plant Cell**, v. 18, n. 2, p. 477–490, 2006.

MALONEY, V. J. et al. Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact in planta and promote plant growth and biomass accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4383–4394, 2015.

MARTÍN, G. et al. Circadian waves of transcriptional repression shape PIF-regulated photoperiod-responsive growth in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 28, n. 2, p. 311–318.e5, jan. 2018.

MARTIN, K. A.; BLENIS, J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. In: **Advances in Cancer Research**. [s.l.: s.n.]. p. 1–39.

MARTINS, M. C. M. et al. Feedback inhibition of starch degradation in Arabidopsis leaves mediated by trehalose 6-phosphate. **Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 1142–1163, 2013.

MATT, P. et al. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. **Plant Cell and Environment**, v. 24, p. 177–190, 2001.

MATTOO, A. K.; MINOCHA, S. C. Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. **Amino Acids**, v. 38, p. 405–413, 2010.

MCFARLANE, H. E.; DÖRING, A.; PERSSON, S. The cell biology of cellulose synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 69–94, 2014.

MCGEE, SEAN, L. AMPK and transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 13, p. 3022, 2008.

MENAND, B. et al. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6422–7, 30 abr. 2002.

MENGIN, V. et al. Photosynthate partitioning to starch in *Arabidopsis thaliana* is insensitive to light intensity but sensitive to photoperiod due to a restriction on growth in the light in short photoperiods. **Plant, Cell & Environment**, p. 2608–2627, 2017.

MERLO, L. et al. Changes of carbohydrates, metabolites and enzyme activities in potato tubers during development, and within a single tuber along astolon-apex gradient. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, n. 4, p. 392–402, out. 1993.

MERRICK, W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 291–315, 1 nov. 1992.

MICHAELI, S. et al. A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. **The Plant Journal**, v. 67, p. 485–498, 2011.

MILNE, R. J.; GROF, C. P.; PATRICK, J. W. Mechanisms of phloem unloading: shaped by cellular pathways, their conductances and sink function. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 43, p. 8–15, jun. 2018.

MONTANÉ, M. H.; MENAND, B. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4361–4374, 2013.

MOORE, B. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 332–336, 11 abr. 2003.

MOREAU, M. et al. Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. **The Plant cell**, v. 24, n. 2, p. 463–481, 1 fev. 2012.

MUGFORD, S. T. et al. Regulatory properties of ADP glucose pyrophosphorylase are required for adjustment of leaf starch synthesis in different photoperiods. **Plant Physiology**, v. 166, n. 4, p. 1733–1747, 2014.

MÜLLER, L. M.; VON KORFF, M.; DAVIS, S. J. Connections between circadian clocks and carbon metabolism reveal species-specific effects on growth control. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 11, p. 2915–2923, 2014.

NAKAGAMI, H. et al. Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 1161–1174, 1 jul. 2010.

NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C. H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 3, p. 125–134, mar. 2007.

NODA, T.; OHSUMI, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 3963–3966, 13 fev. 1998.

NOZUE, K. et al. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 358–361, 24 jul. 2007.

NOZUE, K.; HARMER, S. L.; MALOOF, J. N. Genomic analysis of circadian clock-, light-, and growth-correlated genes reveals PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR5 as a modulator of auxin signaling in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 156, n. 1, p. 357–372, 1 maio 2011.

NUKARINEN, E. et al. Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 31697, 2016.

NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation

of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 973–996, nov. 2010.

OSUNA, D. et al. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. **The Plant Journal**, v. 49, n. 3, p. 463–491, 2007.

PAL, S. K. et al. Diurnal changes of polysome loading track sucrose content in the rosette of wild-type arabidopsis and the starchless pgm mutant. **Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 1246–1265, 2013.

PAN, W.-J. et al. Nondestructive and intuitive determination of circadian chlorophyll rhythms in soybean leaves using multispectral imaging. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11108, 10 set. 2015.

PANTIN, F. et al. Control of leaf expansion: A developmental switch from metabolics to hydraulics. **Plant Physiology**, v. 156, n. 6, p. 803–815, 2011.

PANTIN, F.; SIMONNEAU, T.; MULLER, B. Coming of leaf age: control of growth by hydraulics and metabolics during leaf ontogeny. **New Phytologist**, v. 196, p. 349–366, 2012.

PATTINGRE, S. et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 313–323, fev. 2008.

PAUL, M. J.; FOYER, C. H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 360, p. 1383–1400, 1 jul. 2001.

PERRY, J.; KLECKNER, N. The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. **Cell**, v. 112, n. 2, p. 151–155, 2003.

PFEIFFER, A. et al. Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. **eLife**, v. 5, p. e17023, 2016.

PILKINGTON, S. M. et al. Relationship between starch degradation and carbon demand for maintenance and growth in Arabidopsis thaliana in different irradiance and temperature regimes. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 1, p. 157–171, jan. 2015.

PIQUES, M. et al. Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in Arabidopsis. **Molecular Systems Biology**, v. 5, p. 314, 13 out. 2009.

PLAXTON, W. C.; PODESTÁ, F. E. The functional organization and control of plant respiration. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 2, p. 159–198, 2006.

POKHILKO, A. et al. Adjustment of carbon fluxes to light conditions regulates the daily turnover of starch in plants: a computational model. **Mol. Biosyst.** **Mol. Biosyst**, v. 10, n. 10, p. 613–627, 2014.

POLGE, C.; THOMAS, M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 20–28, jan. 2007.

POORTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, n. 6, p. 595–607, 2000.

POPOV, V. N. et al. Succinate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana is regulated by light via phytochrome A. **FEBS Letters**, v. 584, n. 1, p. 199–202, 2010.

POWELL, A. E.; LENHARD, M. Control of organ size in plants. **Current Biology**, v. 22, n. 9, p. R360–R367, maio 2012.

PRACHAROENWATTANA, I. et al. Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. **The Plant Journal**, v. 62, n. 5, p. 785–795, jun. 2010.

- PREISS, J. Biosynthesis of starch and its regulation. In: **The biochemistry of plants**. [s.l: s.n.]. p. 181–254.
- PRICE, J. et al. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 16, n. 8, p. 2128–50, 1 ago. 2004.
- PROUD, C. G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 2, p. 217–234, 2007.
- PU, Y.; LUO, X.; BASSHAM, D. C. TOR-dependent and -Independent pathways regulate autophagy in Arabidopsis thaliana. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. July, p. 1–13, 2017.
- RAMON, M. et al. The hybrid Four-CBS-Domain KIN β subunit functions as the canonical γ subunit of the plant energy sensor SnRK1. **The Plant Journal**, v. 75, n. 1, p. 11–25, jul. 2013.
- RAMON, M.; ROLLAND, F.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling. **American Society of Plant Biology**, v. 14, n. 2, p. 185–205, 2008.
- REES, T. A.; BEEVERS, H. Pathways of glucose dissimilation in carrot slices. **Plant physiology**, v. 35, n. 6, p. 830–838, 1960.
- REILAND, S. et al. Large-scale arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. **Plant Physiology**, v. 150, n. 2, p. 889–903, 1 jun. 2009.
- REN, M. et al. Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 155, n. 3, p. 1367–1382, 2011.
- REN, M. et al. Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, n. 12, p. 4850–4874, 1 dez. 2012.
- ROBAGLIA, C.; THOMAS, M.; MEYER, C. Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 301–307, 2012.
- ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: Sweet sensations. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 12, p. 606–613, 2004.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 675–709, 2006.
- RUAN, Y.-L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 33–67, 2014.
- RUFTY, T. W.; HUBER, S. C. Changes in Starch Formation and Activities of Sucrose Phosphate Synthase and Cytoplasmic Fructose-1,6-bisphosphatase in Response to Source-Sink Alterations. **Plant physiology**, v. 72, n. 2, p. 474–480, 1983.
- RUGGERO, D.; SONENBERG, N. The Akt of translational control. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7426–7434, 2005.
- SALEM, M. A. et al. Regulatory-associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of Arabidopsis seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential. **The Plant Journal**, v. 92, n. 4, p. 525–545, nov. 2017.
- SALEM, M. A. et al. RAPTOR controls developmental growth transitions by altering the hormonal and metabolic balance. **Plant Physiology**, p. pp.01711.2017, 23 abr. 2018.
- SANCAK, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496–1501, 2008.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C. et al. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 negatively regulates cellulose synthesis in Arabidopsis by phosphorylating cellulose synthase 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 13, p. 3533–3538, 28 mar. 2017.

SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 596–603, 2005.

SATO, T. et al. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 18, p. 2746–2752, 2010.

SAUER, N. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. **FEBS Letters**, v. 581, n. 12, p. 2309–2317, 25 maio 2007.

SCHEIBLE, W.-R. et al. Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. **The Plant Cell**, v. 9, n. May, p. 783–798, 1997.

SCHEIBLE, W.-R. et al. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2483–2499, 2004.

SCHEIBLE, W.-R.; KRAPP, A.; STITT, M. Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 11, p. 1155–1167, 1 nov. 2000.

SCHEPETILNIKOV, M. et al. Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. **The EMBO journal**, v. 30, n. 7, p. 1343–56, 6 abr. 2011.

SCHEPETILNIKOV, M. et al. TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. **The EMBO journal**, v. 32, n. 8, p. 1087–102, 17 abr. 2013.

SCHEPETILNIKOV, M. et al. GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 7, p. 886–903, 3 abr. 2017.

SCHEPETILNIKOV, M.; RYABOVA, L. A. Recent discoveries on the role of TOR (Target of Rapamycin) signaling in translation in plants. **Plant Physiology**, v. 176, n. February, p. 1095–1105, 2018.

SCHMELZLE, T., AND HALL, M. N. TOR, a central controller of cell Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/ growth. **Cell**, v. 103, p. 253–262, 2000.

SCHMELZLE, T. et al. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 1, p. 338–351, 1 jan. 2004.

SCHMIDT, A. et al. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 23, p. 6924–6931, 1998.

SEATON, D. D. et al. Linked circadian outputs control elongation growth and flowering in response to photoperiod and temperature. **Molecular Systems Biology**, v. 11, n. 1, p. 776–776, 19 jan. 2015.

SEKI, M. et al. Adjustment of the Arabidopsis circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

SERFONTEIN, J. et al. Evolution of the TSC1/TSC2-TOR signaling pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 128, 2010.

SESMA, A.; CASTRESANA, C.; CASTELLANO, M. M. Regulation of Translation by TOR, eIF4E and eIF2 α in Plants: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 2–8, 2017.

- SHAMJI, A. F.; KURUVILLA, F. G.; SCHREIBER, S. L. Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. **Current Biology**, v. 10, n. 12, p. 1574–1581, 2000.
- SHARMA, S.; VERSLUES, P. E. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 11, p. 1838–1851, nov. 2010.
- SHAW, A. S.; FILBERT, E. L. Scaffold proteins and immune-cell signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 47–56, 1 jan. 2009.
- SHEEN, J. Master regulators in plant glucose signaling networks. **Journal of Plant Biology**, v. 57, n. 2, p. 67–79, 2014.
- SHELP, B.; BOWN, A. W.; MCLEAN, M. D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 11, p. 446–452, 1 nov. 1999.
- SHIMOBAYASHI, M.; HALL, M. N. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. **Cell Research**, v. 26, n. 1, p. 7–20, 2016.
- SINGH, D. G. et al. β -Glucosylarginine: a new glucose-protein bond in a self-glucosylating protein from sweet corn. **FEBS Letters**, v. 376, n. 1–2, p. 61–64, 27 nov. 1995.
- SMEEEKENS, S. et al. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 274–279, 2010.
- SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 9, p. 1126–1149, 1 set. 2007.
- SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M. Starch Degradation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 73–98, 2005.
- SOMERVILLE, C. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 24 dez. 2004.
- SONG, Y. et al. The crosstalk between Target of Rapamycin (TOR) and Jasmonic Acid (JA) signaling existing in Arabidopsis and cotton. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 45830, 2017.
- SORMANI, R. et al. Saccharomyces cerevisiae FKBP12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. **BMC plant biology**, v. 7, n. 26, p. 1–8, 2007.
- SOY, J.; LEIVAR, P.; MONTE, E. PIF1 promotes phytochrome-regulated growth under photoperiodic conditions in Arabidopsis together with PIF3, PIF4, and PIF5. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 11, p. 2925–2936, 1 jun. 2014.
- STACKLIES, W. et al. pcaMethods a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. **Bioinformatics**, v. 23, n. 9, p. 1164–1167, 1 maio 2007.
- STERLING, J. D. et al. Functional identification of an Arabidopsis pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 13, p. 5236–5241, 2006.
- STITT, M. et al. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 174p. 518–552.
- STITT, M. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 370, p. 959–70, abr. 2002.
- STITT, M. et al. Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: Coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. **Functional Plant**

Biology, v. 34, n. 6, p. 526–549, 2007.

STITT, M.; HUBER, S. C.; KERR, P. Control of photosynthetic sucrose formation. In: **Photosynthesis**. [s.l.] Elsevier, 1987. p. 327–409.

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.

STITT, M.; SULPICE, R.; KEURENTJES, J. Metabolic networks: how to identify key components in the regulation of metabolism and growth. **Plant Physiology**, v. 152, n. 2, p. 428–444, 3 fev. 2010.

STITT, M.; ZEEMAN, S. C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 282–292, jun. 2012.

STUDART-GUIMARAES, C. et al. Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the -aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 626–639, 7 set. 2007.

STUMPF, D. K.; BURRIS, R. H. Organic acid contents of soybean: age and source of nitrogen. **Plant Physiology**, v. 68, n. 5, p. 989–991, 1 nov. 1981.

STURM, A. Update on Biochemistry Invertases . Primary Structures , Functions , and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning SOME COMMON MOLECULAR FEATURES BUT DIFFER. **Plant Physiology**, v. 121, n. September, p. 1–7, 1999.

SULPICE, R. et al. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 25, p. 10348–10353, 23 jun. 2009.

SULPICE, R. et al. Arabidopsis coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of photoperiods. **Molecular Plant**, v. 7, n. 1, p. 137–155, 2014.

SULPICE, R.; MCKEOWN, P. C. Moving toward a comprehensive map of central plant metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 187–210, 2015.

SUTTANGKAKUL, A. et al. The ATG1 / ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 23, n. October, p. 3761–3779, 2011.

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.

SZECOWKA, M. et al. Metabolic fluxes in an illuminated arabidopsis rosette. **The Plant Cell**, v. 25, n. February, p. 694–714, 2013.

TAKAHARA, T.; MAEDA, T. Evolutionarily conserved regulation of TOR signalling. **Journal of Biochemistry**, v. 154, n. 1, p. 1–10, 2013.

TAKAHASHI, T.; KAKEHI, J.-I. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. **Annals of Botany**, v. 105, n. 1, p. 1–6, jan. 2010.

TATE, J. J. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Sit4 phosphatase is active irrespective of the nitrogen source provided, and Gln3 phosphorylation levels become nitrogen source-responsive in a sit4 -deleted strain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 49, p. 37980–37992, 8 dez. 2006.

TATE, J. J. et al. Rapamycin-induced Gln3 dephosphorylation is insufficient for nuclear localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 4, p. 2522–2534, 2009.

TATE, J. J.; COOPER, T. G. Five conditions commonly used to down-regulate Tor Complex 1 generate different physiological situations exhibiting distinct requirements and outcomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27243–27262, 20 set. 2013.

TEE, A. The target of rapamycin and mechanisms of cell growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 880, 16 mar. 2018.

THORMÄHLEN, I. et al. Inactivation of thioredoxin f 1 leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of Arabidopsis plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 1, p. 16–29, jan. 2013.

TIESSEN, A. et al. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. **The Plant Cell**, v. 14, n. 9, p. 2191–2213, set. 2002.

TOGNETTI, J. A.; PONTIS, H. G.; MARTÍNEZ-NOËL, G. M. A. Sucrose signaling in plants A world yet to be explored. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 3, p. e23316, 2013.

TSAI, A. Y.-L.; GAZZARRINI, S. AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 69, n. 5, p. 809–821, mar. 2012.

TURCK, F. et al. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 134, n. 4, p. 1527–1535, 1 abr. 2004.

TYMOWSKA-LALANNE, Z.; KREIS, M. Expression of the Arabidopsis thaliana invertase gene family. **Planta**, v. 207, n. 2, p. 259–265, 20 nov. 1998.

UMEZAWA, T. et al. Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis thaliana. **Science Signaling**, v. 6, n. 270, p. rs8-rs8, 9 abr. 2013.

URBAN, J. et al. Sch9 is a major target of TORC1 in Saccharomyces cerevisiae. **Molecular Cell**, v. 26, n. 5, p. 663–674, jun. 2007.

USADEL, B. et al. Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes. **Plant physiology**, v. 146, n. 4, p. 1834–1861, 1 abr. 2008.

VAN DAM, T. J. P. et al. Evolution of the TOR pathway. **Journal of Molecular Evolution**, v. 73, n. 3–4, p. 209–220, 2011.

VAN DONGEN, J. T. et al. Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 12, p. 1434–1443, 2011.

VERBANCIC, J. et al. Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. **Molecular Plant**, v. 11, p. 75–94, 2017.

WECKWERTH, W.; WENZEL, K.; FIEHN, O. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 78–83, jan. 2004.

WEISE, S. E.; VAN WIJK, K. J.; SHARKEY, T. D. The role of transitory starch in C₃, CAM, and C₄ metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3109–3118, 2011.

WEISE, S. E.; WEBER, A. P. M.; SHARKEY, T. D. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. **Planta**, v. 218, p. 474–482, 2004.

WINGLER, A. et al. Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. **Plant physiology**, v. 158, n. 3, p. 1241–1251, 2012.

WINGLER, A. Transitioning to the next phase: The role of sugar signaling throughout the plant life cycle.

Plant Physiology, v. 176, n. February, p. 1075–1084, 2018.

WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 1, p. 31–67, 2000.

WULLSCHLEGER, S. et al. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30697–30704, 2005.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.

XIANG, L. et al. Exploring the neutral invertase–oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3849–3862, jul. 2011.

XIAO, W.; SHEEN, J.; JANG, J. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 451–461, 2000.

XIONG, F. et al. Brassinosteroid Insensitive 2 (BIN2) acts as a downstream effector of TOR signaling pathway to regulate photoautotrophic growth in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2017.

XIONG, Y. et al. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 181–186, 2013.

XIONG, Y.; SHEEN, J. Rapamycin and glucose-Target of Rapamycin (TOR) protein signaling in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2836–2842, 20 jan. 2012.

XIONG, Y.; SHEEN, J. Moving beyond translation: Glucose-TOR signaling in the transcriptional control of cell cycle. **Cell Cycle**, v. 12, n. 13, p. 1989–1990, 31 jul. 2013.

XIONG, Y.; SHEEN, J. The role of Target of Rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. **Plant physiology**, v. 164, n. 2, p. 499–512, 1 fev. 2014.

YADAV, U. P. et al. The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 4, p. 1051–1068, 1 mar. 2014.

YAKIR, E. et al. Regulation of output from the plant circadian clock. **FEBS Journal**, v. 274, n. 2, p. 335–345, jan. 2007.

YAN, G.; LAI, Y.; JIANG, Y. The TOR complex 1 is a direct target of Rho1 GTPase. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 743–753, mar. 2012.

YANG, H. et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 217–223, 1 maio 2013.

YANG, R.; YIN, Y.; GU, Z. Polyamine degradation pathway regulating growth and GABA accumulation in germinating fava bean under hypoxia-NaCl stress. **Jornal Agr Sci Tech**, v. 17, p. 311–320, 2015.

YAZDANBAKHSI, N. et al. Circadian control of root elongation and C partitioning in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 6, p. 877–894, 2011.

YU, K. et al. Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian Target of Rapamycin. **Cancer Research**, v. 69, n. 15, p. 6232–6240, 1 ago. 2009.

ZEEMAN, S. C.; AP REES, T. Changes in carbohydrate metabolism and assimilate partitioning in starch excess mutants of *Arabidopsis*. **Plant Cell Environment**, v. 22, p. 1445–1453, 1999.

ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M.; SMITH, A. M. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 13–28, 1 jan. 2007.

ZELL, M. B. et al. Analysis of Arabidopsis with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, p. 1251–1262, mar. 2010.

ZHANG, C.; TURGEON, R. Mechanisms of phloem loading. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 43, p. 71–75, jun. 2018.

ZHANG, Y. et al. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. **Plant physiology**, v. 149, n. 4, p. 1860–1871, 2009.

ZHANG, Z. et al. TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 26, n. 14, p. 1854–1860, jul. 2016.

ZHANG, Z.-W. et al. The plastid hexokinase pHXK: A node of convergence for sugar and plastid signals in Arabidopsis. **FEBS Letters**, v. 584, n. 16, p. 3573–3579, 20 ago. 2010.

ZINZALLA, V. et al. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 757–768, mar. 2011.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.

8. Apêndices

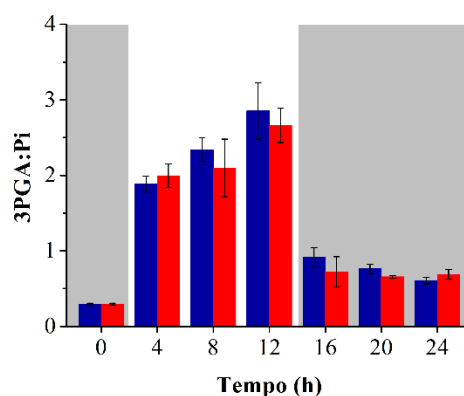


Figura suplementar 5.1. Perfil da razão entre 3-PGA e P_i durante um ciclo diurno em plântulas de *Arabidopsis*.

Conteúdo de 3-fosfoglicerato (3-PGA) obtido por LC-MS/MS e de ortofosfato inorgânico (P_i) obtido por GC-TOF-MS. Plântulas tratadas com DMSO 0,05% (controle) ou AZD-8055 2 μ M estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. As barras cinzas representam os períodos de escuro e as brancas os de luz. Cada barra representa a média de 5 *pools* de amostra biológica. A ausência de diferenças significativas entre tratamentos foi verificada pelo teste T.

Tabela suplementar 1. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO ao longo de um ciclo diurno (fotoperíodo de 12 h). Dados mostrados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 4 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, obtidas pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representadas em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	4h		8h		12h		16h		20h		24h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
2-Hidroxipiridina	1,49 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,07	1,33 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,08
3-Hidroxipiridina	1,56 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,05	1,18 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,07	1,30 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,05
3-Indoleacetônitrila	1,18 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,09	0,69 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,05	1,31 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,09	1,10 $\pm$ 0,11	1,20 $\pm$ 0,16	1,42 $\pm$ 0,13
4-Aminobutanoato	2,20 $\pm$ 0,21	0,95 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,09	2,53 $\pm$ 0,49	1,14 $\pm$ 0,15	2,73 $\pm$ 0,45	1,29 $\pm$ 0,14
5-Oxoprolina	1,40 $\pm$ 0,35	0,68 $\pm$ 0,12	0,76 $\pm$ 0,12	0,83 $\pm$ 0,07	0,70 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,12	1,26 $\pm$ 0,20	1,21 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,10	1,92 $\pm$ 0,47	1,15 $\pm$ 0,10	1,79 $\pm$ 0,25
Adenina	1,28 $\pm$ 0,08	0,85 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,10	1,06 $\pm$ 0,03
Agmatina	1,28 $\pm$ 0,16	0,86 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,05	0,99 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,14	1,23 $\pm$ 0,07
Alanina	1,23 $\pm$ 0,13	1,05 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,12	0,71 $\pm$ 0,06	1,64 $\pm$ 0,23	0,82 $\pm$ 0,09	1,99 $\pm$ 0,26	1,06 $\pm$ 0,17
Arginina	1,49 $\pm$ 0,24	0,91 $\pm$ 0,06	1,17 $\pm$ 0,08	1,33 $\pm$ 0,19	0,95 $\pm$ 0,11	1,48 $\pm$ 0,08	0,70 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,11	1,39 $\pm$ 0,16	0,82 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,06
Asparagina	2,08 $\pm$ 0,53	0,91 $\pm$ 0,18	0,81 $\pm$ 0,13	0,62 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,09	0,74 $\pm$ 0,11	1,14 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,19	1,31 $\pm$ 0,10	0,89 $\pm$ 0,06	1,68 $\pm$ 0,35	1,41 $\pm$ 0,08	1,22 $\pm$ 0,11
Aspartato	1,32 $\pm$ 0,12	0,83 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,08	1,05 $\pm$ 0,11	1,02 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,09	0,84 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,07
b-Alanina	1,19 $\pm$ 0,10	0,62 $\pm$ 0,00	0,89 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,04	1,22 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,06
Benzoato	1,65 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,14	0,72 $\pm$ 0,02	1,16 $\pm$ 0,16	0,77 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,08	1,18 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,03	1,38 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,04
Citrato	1,64 $\pm$ 0,21	0,62 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,16	1,84 $\pm$ 0,10	1,17 $\pm$ 0,08	2,08 $\pm$ 0,12	1,16 $\pm$ 0,14	2,32 $\pm$ 0,10
Citrulina	1,26 $\pm$ 0,22	0,97 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,07	1,33 $\pm$ 0,19	0,81 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,09	0,92 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,06
Dehidroascorbato	1,54 $\pm$ 0,23	0,86 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,09	0,80 $\pm$ 0,21	1,11 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,16	1,05 $\pm$ 0,12	1,09 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,07	1,10 $\pm$ 0,09
Espermidina	1,71 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,03	1,26 $\pm$ 0,10	0,85 $\pm$ 0,08	1,32 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,04
Fenilalanina	0,74 $\pm$ 0,15	0,50 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,13	0,68 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 0,25	1,46 $\pm$ 0,13	0,92 $\pm$ 0,17	1,59 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,15	1,59 $\pm$ 0,23	0,76 $\pm$ 0,09	2,53 $\pm$ 0,08
Frutose	0,95 $\pm$ 0,16	0,68 $\pm$ 0,12	1,30 $\pm$ 0,11	1,05 $\pm$ 0,36	1,84 $\pm$ 1,00	0,76 $\pm$ 0,19	1,32 $\pm$ 0,20	0,69 $\pm$ 0,14	1,52 $\pm$ 0,53	0,70 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,16	0,86 $\pm$ 0,20	1,32 $\pm$ 0,50
Fucose Epifucose	1,32 $\pm$ 0,19	0,70 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,10	0,89 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,12	1,19 $\pm$ 0,06
Fumarato	0,56 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,10	2,04 $\pm$ 0,05	1,01 $\pm$ 0,17	2,92 $\pm$ 0,10	0,84 $\pm$ 0,08	2,04 $\pm$ 0,15	0,32 $\pm$ 0,03	1,43 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,08
Galactinol	1,83 $\pm$ 0,29	0,98 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,11	0,74 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,15	0,79 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,13	0,93 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,09	1,52 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,06
Gliceraldeído-3-fosfato	1,65 $\pm$ 0,12	0,94 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03	1,26 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,07
Glicerato	0,66 $\pm$ 0,15	1,15 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,16	1,51 $\pm$ 0,18	1,53 $\pm$ 0,11	1,36 $\pm$ 0,20	1,69 $\pm$ 0,14	0,57 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,13	0,76 $\pm$ 0,19	0,77 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,25	0,57 $\pm$ 0,08
Glicerol	2,24 $\pm$ 0,34	1,07 $\pm$ 0,11	1,08 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,14	0,73 $\pm$ 0,06	1,27 $\pm$ 0,15	0,85 $\pm$ 0,06	1,41 $\pm$ 0,33	0,84 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,09	0,79 $\pm$ 0,03
Glicina	0,31 $\pm$ 0,06	2,48 $\pm$ 0,16	2,46 $\pm$ 0,17	3,21 $\pm$ 0,17	2,28 $\pm$ 0,10	4,10 $\pm$ 0,74	2,03 $\pm$ 0,13	1,04 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,03
Glicose	0,20 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,15	1,07 $\pm$ 0,07	1,04 $\pm$ 0,17	1,41 $\pm$ 0,21	0,67 $\pm$ 0,13	1,75 $\pm$ 0,27	0,55 $\pm$ 0,04	1,50 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,06	1,70 $\pm$ 0,11	0,34 $\pm$ 0,02	1,73 $\pm$ 0,22
Glutamato	0,84 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,08	0,91 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,18	0,81 $\pm$ 0,05	1,29 $\pm$ 0,16	1,03 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,08	0,97 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,06
Glutamina	0,90 $\pm$ 0,18	0,51 $\pm$ 0,08	0,70 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,11	0,67 $\pm$ 0,18	1,17 $\pm$ 0,15	1,14 $\pm$ 0,07	1,63 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,16	2,03 $\pm$ 0,15	1,21 $\pm$ 0,12	2,19 $\pm$ 0,25
Idose	0,41 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,07	1,10 $\pm$ 0,06	1,25 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,03
Isocitrato	0,16 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,12	1,35 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,10	0,37 $\pm$ 0,04	1,37 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,03	1,46 $\pm$ 0,12
Isoleucina	0,82 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,02	1,55 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,04	1,83 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,01	2,67 $\pm$ 0,25	0,43 $\pm$ 0,03	3,12 $\pm$ 0,15	0,59 $\pm$ 0,07	3,70 $\pm$ 0,16

Continuação tabela suplementar 1. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO ao longo de um ciclo diurno (fotoperíodo de 12 h). Dados mostrados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 4 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, obtidas pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representadas em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	4h		8h		12h		16h		20h		24h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
Leucina	0,88 $\pm$ 0,09	0,35 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,02	1,53 $\pm$ 0,08	0,39 $\pm$ 0,01	1,85 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,02	2,81 $\pm$ 0,26	0,58 $\pm$ 0,05	3,25 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,08	3,97 $\pm$ 0,21
Lisina	0,99 $\pm$ 0,15	0,37 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,03	1,47 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,05	1,70 $\pm$ 0,10	0,47 $\pm$ 0,01	2,36 $\pm$ 0,20	0,52 $\pm$ 0,03	2,85 $\pm$ 0,12	0,65 $\pm$ 0,03	3,43 $\pm$ 0,20
Malato	0,44 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,06	1,16 $\pm$ 0,07	2,03 $\pm$ 0,08	1,07 $\pm$ 0,15	2,25 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,07	0,39 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,06
Maltose	1,42 $\pm$ 0,21	0,69 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,10	0,60 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,07	2,14 $\pm$ 0,13	1,11 $\pm$ 0,06	5,05 $\pm$ 1,25	1,39 $\pm$ 0,20	3,81 $\pm$ 0,55	2,28 $\pm$ 0,59
Metionina	1,01 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,08	1,30 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,10	0,73 $\pm$ 0,03	1,30 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,01	1,42 $\pm$ 0,06
Mio-Inositol	1,25 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,14	0,85 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,05	1,01 $\pm$ 0,05	1,47 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,02	1,48 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,06
Nicotinato	2,03 $\pm$ 0,19	1,01 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,07	1,10 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,06	1,20 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,06
O-Acetilserina	1,43 $\pm$ 0,24	1,01 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,04	1,48 $\pm$ 0,13	1,09 $\pm$ 0,13	3,16 $\pm$ 0,73	1,10 $\pm$ 0,15	3,26 $\pm$ 0,87	1,31 $\pm$ 0,16
Ornitina	1,79 $\pm$ 0,38	1,38 $\pm$ 0,09	1,29 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,06	0,49 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,21	0,46 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,10	1,31 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,02
Ortofosfato	1,62 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,07	1,13 $\pm$ 0,08	1,20 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,11	1,34 $\pm$ 0,08
Piruvato	1,53 $\pm$ 0,11	1,16 $\pm$ 0,10	1,05 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,10	0,78 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,05	1,34 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,04
Prolina	0,33 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,17	1,16 $\pm$ 0,17	1,41 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,28	1,34 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,11	1,17 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,17
Putrescina	1,22 $\pm$ 0,19	0,86 $\pm$ 0,12	0,78 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,03	1,21 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,03	1,58 $\pm$ 0,18	1,03 $\pm$ 0,06	1,57 $\pm$ 0,09
Rafinose	0,42 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,08	1,79 $\pm$ 0,30	1,49 $\pm$ 0,32	1,28 $\pm$ 0,27	1,10 $\pm$ 0,15	1,39 $\pm$ 0,10	0,91 $\pm$ 0,16	0,80 $\pm$ 0,17	0,66 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,12
Ramnose	1,41 $\pm$ 0,12	0,89 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,10	0,97 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,06
Sacarose	1,05 $\pm$ 0,09	1,40 $\pm$ 0,17	1,24 $\pm$ 0,05	1,51 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,08	1,38 $\pm$ 0,28	0,83 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,04	1,17 $\pm$ 0,13	0,72 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,08	0,53 $\pm$ 0,04
Serina	0,36 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,09	1,18 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,08	1,56 $\pm$ 0,06	1,31 $\pm$ 0,21	1,60 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,01	0,98 $\pm$ 0,08
Similar a Homocisteína	0,77 $\pm$ 0,17	0,34 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,09	0,66 $\pm$ 0,15	1,15 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,17	1,50 $\pm$ 0,14	1,16 $\pm$ 0,18	1,41 $\pm$ 0,24	0,84 $\pm$ 0,08	2,20 $\pm$ 0,10
Similar a Pipecolato	1,32 $\pm$ 0,15	0,84 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,11	1,07 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,11	1,08 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,11	1,06 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,10
Sinapato	1,61 $\pm$ 0,23	0,84 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,11	1,14 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,09	0,84 $\pm$ 0,08	1,28 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,13	0,88 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,06
Sorbose Tagatose	0,26 $\pm$ 0,02	3,30 $\pm$ 0,22	4,05 $\pm$ 0,19	1,82 $\pm$ 0,19	2,68 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,06	1,91 $\pm$ 0,10	0,44 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,13	0,36 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,11
Succinato	1,13 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,07	0,74 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,07	1,04 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,08
Tiramina	1,73 $\pm$ 0,16	1,04 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,13	0,93 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,07	0,95 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,03	1,18 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,05
Tirosina	1,04 $\pm$ 0,13	0,40 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,07	0,50 $\pm$ 0,06	1,54 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,02	2,22 $\pm$ 0,24	0,54 $\pm$ 0,05	2,82 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,07	3,48 $\pm$ 0,12
Trans-4-Hidroxiprolina	0,96 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,08	1,18 $\pm$ 0,05
Trealose	1,11 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,08	1,18 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,05	1,24 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,08	1,14 $\pm$ 0,15	1,19 $\pm$ 0,07	1,29 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,05
Treonato	1,36 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,15	0,88 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,06
Treonina	0,82 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,11	1,65 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,02	1,64 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,01	1,80 $\pm$ 0,10	0,57 $\pm$ 0,03	2,14 $\pm$ 0,05
Triptofano	0,91 $\pm$ 0,11	0,47 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,06	1,54 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,18	2,31 $\pm$ 0,22
Valina	1,04 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,03	1,28 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,02	2,01 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,05	2,36 $\pm$ 0,10	1,03 $\pm$ 0,07	2,78 $\pm$ 0,14
Xilose	1,75 $\pm$ 0,40	0,96 $\pm$ 0,10	1,16 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,18	1,21 $\pm$ 0,21	0,88 $\pm$ 0,07	1,64 $\pm$ 0,29	1,25 $\pm$ 0,22	1,28 $\pm$ 0,13
Xilose Arabinose	1,32 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,05	0,99 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,05

Tabela suplementar 2. Concentração de metabólitos obtidos por LC-MS/MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO ao longo de um ciclo diurno (fotoperíodo de 12h). Mediana dos valores absolutos $\pm$ erro padrão na escala de log2 para medições de 4 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, obtidas pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representadas em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	4h		8h		12h		16h		20h		24h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
2-Oxoglutarato	0,66 $\pm$ 0,01	1,43 $\pm$ 0,09	1,88 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,10	1,46 $\pm$ 0,12	1,28 $\pm$ 0,04	1,32 $\pm$ 0,13	0,93 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,11	0,81 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,04
3-Ácido fosfoglicérico	0,48 $\pm$ 0,02	1,51 $\pm$ 0,15	1,75 $\pm$ 0,13	1,87 $\pm$ 0,06	1,76 $\pm$ 0,29	2,10 $\pm$ 0,25	2,31 $\pm$ 0,17	0,90 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,04
Aconitato	1,07 $\pm$ 0,07	0,50 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,13	1,26 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,23	0,99 $\pm$ 0,08	1,39 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,09	1,35 $\pm$ 0,12
ADP-Glicose	0,73 $\pm$ 0,03	3,20 $\pm$ 0,62	3,67 $\pm$ 0,39	7,84 $\pm$ 0,83	6,73 $\pm$ 1,07	10,41 $\pm$ 1,69	10,98 $\pm$ 1,25	0,94 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,06
Citrato	1,16 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,09	1,36 $\pm$ 0,05	1,45 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,05	1,50 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,09	1,77 $\pm$ 0,12
Fosfoenolpiruvato	0,49 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,24	1,22 $\pm$ 0,16	1,26 $\pm$ 0,19	0,77 $\pm$ 0,13	0,82 $\pm$ 0,22	0,94 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,05
Frutose 1,6-BP	0,69 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,05	1,41 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,09	1,48 $\pm$ 0,21	1,56 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,10	0,86 $\pm$ 0,11	1,16 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,05
Frutose-6-P	0,67 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,16	1,17 $\pm$ 0,08	1,15 $\pm$ 0,11	1,13 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,16	1,12 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,04
Fumarato	0,22 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,06	2,05 $\pm$ 0,10	1,22 $\pm$ 0,07	3,44 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,06	2,03 $\pm$ 0,15	0,25 $\pm$ 0,05	1,35 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,02	1,30 $\pm$ 0,10
Galactose-1-P	0,80 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,12	1,37 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,09	1,12 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,10
Glicerato	0,47 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,05	1,26 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,11	1,80 $\pm$ 0,14	1,40 $\pm$ 0,18	2,13 $\pm$ 0,20	0,60 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,15	0,66 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,13
Glicerol-3-P	0,98 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,17	1,08 $\pm$ 0,09	1,32 $\pm$ 0,12	1,19 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,19	1,00 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,08
Glicose 1,6-BP	0,69 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,09	1,15 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,06	1,24 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,14	1,49 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,09
Glicose-1-P	0,75 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,14	1,30 $\pm$ 0,10	1,10 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,05	0,99 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,09
Glicose-6-P	0,66 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,14	1,14 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,16	1,21 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,03
Isocitrato	0,97 $\pm$ 0,09	0,73 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,10	1,28 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,06	1,25 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,14	1,54 $\pm$ 0,27	0,95 $\pm$ 0,14	1,32 $\pm$ 0,11
Malato	0,38 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,06	1,74 $\pm$ 0,08	1,17 $\pm$ 0,10	2,22 $\pm$ 0,17	0,68 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,07
Mannose-6-P	1,21 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,06	1,29 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,12	1,45 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,08	1,17 $\pm$ 0,07
Piruvato	0,63 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,12	1,36 $\pm$ 0,13	1,02 $\pm$ 0,12	1,25 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,04	1,41 $\pm$ 0,15	0,94 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,19	1,02 $\pm$ 0,13
Sacarose-6-P	0,80 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 0,19	1,50 $\pm$ 0,10	1,50 $\pm$ 0,06	1,31 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,08	0,92 $\pm$ 0,08
Shiquimato	0,50 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,11	0,92 $\pm$ 0,08	1,16 $\pm$ 0,11	1,34 $\pm$ 0,09	1,33 $\pm$ 0,12	1,55 $\pm$ 0,08	1,16 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,09	0,79 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,15	0,90 $\pm$ 0,10
Succinato	0,82 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,15	0,61 $\pm$ 0,08	1,42 $\pm$ 0,31	1,25 $\pm$ 0,07	1,19 $\pm$ 0,14	1,04 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,21
Trealose-6-P	0,38 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,07	0,95 $\pm$ 0,04	1,22 $\pm$ 0,10	1,40 $\pm$ 0,16	1,98 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,10
UDP-Glicose	0,80 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,17	1,23 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,05	1,20 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,10

Tabela suplementar 3. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de folhas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 12 h de luz (fotoperíodo de 12 h). Dados mostrados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (60 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	1h		2h		4h		8h		12h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
2-Oxoglutarato	0,65 $\pm$ 0,11	0,92 $\pm$ 0,10	1,12 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,14	0,81 $\pm$ 0,33	0,86 $\pm$ 0,33	0,91 $\pm$ 0,14	1,28 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,18	1,21 $\pm$ 0,13	0,69 $\pm$ 0,26
Alanina	0,86 $\pm$ 0,17	1,09 $\pm$ 0,18	1,15 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,12	0,92 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 0,04	1,30 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,07	1,46 $\pm$ 0,18	0,69 $\pm$ 0,04
Aspartato	2,39 $\pm$ 0,32	1,08 $\pm$ 0,28	1,09 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,14	0,87 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,11	1,32 $\pm$ 0,19	1,04 $\pm$ 0,28	1,23 $\pm$ 0,29	0,81 $\pm$ 0,11
Citrato	2,50 $\pm$ 0,25	1,22 $\pm$ 0,25	1,13 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,12	0,81 $\pm$ 0,13	0,80 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,10	1,11 $\pm$ 0,13	1,02 $\pm$ 0,08
Citrulina	2,02 $\pm$ 0,31	1,11 $\pm$ 0,14	1,30 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,14	0,82 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,09
Fenilalanina	1,15 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,18	1,05 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,13	0,73 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,39	1,46 $\pm$ 0,11	1,88 $\pm$ 0,44
Frutose	0,08 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,18	0,87 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,10	1,18 $\pm$ 0,21	1,30 $\pm$ 0,33	1,56 $\pm$ 0,26	0,64 $\pm$ 0,18	1,18 $\pm$ 0,12	0,33 $\pm$ 0,06	1,19 $\pm$ 0,18
Fumarato	1,45 $\pm$ 0,31	0,72 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,18	0,64 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,13	0,85 $\pm$ 0,13	1,76 $\pm$ 0,47	1,99 $\pm$ 0,66	1,92 $\pm$ 0,37	4,05 $\pm$ 1,07
Gliceraldeído-3-P	3,02 $\pm$ 0,30	0,98 $\pm$ 0,05	1,65 $\pm$ 0,20	1,14 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,30	0,89 $\pm$ 0,16	0,81 $\pm$ 0,17	1,10 $\pm$ 0,22	0,85 $\pm$ 0,12	1,16 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,18
Glicerato	0,41 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,16	0,94 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,10	1,43 $\pm$ 0,23	1,91 $\pm$ 0,35	1,35 $\pm$ 0,24	1,95 $\pm$ 0,33
Glicina	0,24 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,14	0,99 $\pm$ 0,18	0,95 $\pm$ 0,11	0,74 $\pm$ 0,15	1,34 $\pm$ 0,27	0,91 $\pm$ 0,11	2,93 $\pm$ 0,65	1,07 $\pm$ 0,22	3,35 $\pm$ 0,75	0,93 $\pm$ 0,21
Glicose	0,35 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,14	0,87 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,12	1,21 $\pm$ 0,05	1,43 $\pm$ 0,08	2,06 $\pm$ 0,15	1,11 $\pm$ 0,09	2,47 $\pm$ 0,38
Glicose 6-P	1,04 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,12	1,11 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,15
Glutamato	1,06 $\pm$ 0,21	1,06 $\pm$ 0,14	0,94 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 0,03	1,43 $\pm$ 0,16	0,98 $\pm$ 0,23	1,68 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,13
Glutamina	1,70 $\pm$ 0,23	0,75 $\pm$ 0,27	0,82 $\pm$ 0,13	0,74 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,26	0,71 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,19	1,44 $\pm$ 0,32	1,55 $\pm$ 0,19	2,00 $\pm$ 0,41
Histidina	2,49 $\pm$ 0,36	1,16 $\pm$ 0,27	1,01 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,04	1,55 $\pm$ 0,17
Isoleucina	3,29 $\pm$ 0,48	1,01 $\pm$ 0,22	1,30 $\pm$ 0,23	0,75 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,13	0,71 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,19	0,80 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,07	1,90 $\pm$ 0,31
Leucina	3,01 $\pm$ 0,43	0,92 $\pm$ 0,20	1,18 $\pm$ 0,18	0,73 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,17	0,59 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,19	0,70 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,09	1,87 $\pm$ 0,38
Malato	0,63 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 0,09	1,05 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,08	2,37 $\pm$ 0,38	2,51 $\pm$ 0,49	2,23 $\pm$ 0,29	2,47 $\pm$ 0,42
Maltose	1,74 $\pm$ 0,30	1,01 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,15	0,93 $\pm$ 0,16	0,80 $\pm$ 0,24	0,81 $\pm$ 0,14	0,73 $\pm$ 0,11	1,42 $\pm$ 0,20	0,99 $\pm$ 0,12	1,11 $\pm$ 0,13	1,02 $\pm$ 0,15
Manose	0,28 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,20	1,22 $\pm$ 0,17	1,20 $\pm$ 0,22	1,01 $\pm$ 0,18	1,16 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,14	1,12 $\pm$ 0,17	0,61 $\pm$ 0,13
Mio-Inositol	1,82 $\pm$ 0,38	0,98 $\pm$ 0,17	1,02 $\pm$ 0,15	0,91 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,15	0,96 $\pm$ 0,14	1,25 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,12
Ornitina	3,37 $\pm$ 0,14	1,66 $\pm$ 0,36	1,57 $\pm$ 0,12	1,12 $\pm$ 0,17	1,05 $\pm$ 0,20	0,90 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,14	1,02 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,07
Ortofosfato	3,49 $\pm$ 0,49	1,47 $\pm$ 0,31	1,46 $\pm$ 0,12	1,16 $\pm$ 0,11	1,13 $\pm$ 0,20	0,93 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,13	0,84 $\pm$ 0,10	0,62 $\pm$ 0,04
Prolina	1,04 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,15	0,56 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,24	0,57 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,23	1,45 $\pm$ 0,26	1,56 $\pm$ 0,18	1,97 $\pm$ 0,10	2,39 $\pm$ 0,51
Rafinose	0,75 $\pm$ 0,21	0,59 $\pm$ 0,16	0,69 $\pm$ 0,17	0,59 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,14	2,84 $\pm$ 0,23	1,96 $\pm$ 0,57	2,16 $\pm$ 0,23	1,54 $\pm$ 0,27
Sacarose	0,42 $\pm$ 0,09	1,28 $\pm$ 0,24	1,42 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,12	1,04 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,09	1,14 $\pm$ 0,09	0,68 $\pm$ 0,07
Serina	1,10 $\pm$ 0,15	0,92 $\pm$ 0,17	1,01 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,13	0,76 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,14	1,15 $\pm$ 0,07	1,22 $\pm$ 0,16	1,18 $\pm$ 0,15
Succinato	1,57 $\pm$ 0,25	0,84 $\pm$ 0,14	0,98 $\pm$ 0,08	0,87 $\pm$ 0,21	0,87 $\pm$ 0,14	1,12 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,05	1,57 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,11	1,68 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,13
Trealose	2,21 $\pm$ 0,53	0,93 $\pm$ 0,25	1,14 $\pm$ 0,12	0,84 $\pm$ 0,15	0,92 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,09	0,66 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,23	1,06 $\pm$ 0,14
Valina	2,15 $\pm$ 0,27	0,96 $\pm$ 0,22	1,09 $\pm$ 0,12	0,68 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,14	0,94 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,17	1,11 $\pm$ 0,08	1,51 $\pm$ 0,18

Tabela suplementar 4. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de raízes de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 12 h de luz (fotoperíodo de 12 h). Dados mostrados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (60 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	1h		2h		4h		8h		12h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
2-Oxoglutarato	0,46 $\pm$ 0,12	1,11 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,14	0,81 $\pm$ 0,15	1,29 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,18	1,01 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,13
5-Oxoprolina	0,97 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,16	0,81 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,18	0,97 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,11	1,11 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,09	1,48 $\pm$ 0,14	0,98 $\pm$ 0,10	1,69 $\pm$ 0,32
Ácido fosfórico	1,70 $\pm$ 0,35	1,46 $\pm$ 0,10	1,35 $\pm$ 0,08	1,45 $\pm$ 0,25	0,99 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,10	0,61 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,06
Alanina	0,95 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,10	1,05 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,15	0,84 $\pm$ 0,10	1,83 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,24	2,59 $\pm$ 0,57	1,23 $\pm$ 0,25
Arginina	1,30 $\pm$ 0,45	0,75 $\pm$ 0,13	1,03 $\pm$ 0,17	0,60 $\pm$ 0,05	1,35 $\pm$ 0,23	0,63 $\pm$ 0,04	1,88 $\pm$ 0,37	0,49 $\pm$ 0,14	2,64 $\pm$ 0,23	0,44 $\pm$ 0,03	3,82 $\pm$ 0,71
Asparagina	1,17 $\pm$ 0,26	0,90 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,16	1,15 $\pm$ 0,26	0,77 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,21	1,05 $\pm$ 0,18	1,55 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,14	1,75 $\pm$ 0,22
Aspartato	1,75 $\pm$ 0,25	1,13 $\pm$ 0,08	1,24 $\pm$ 0,15	1,02 $\pm$ 0,03	1,05 $\pm$ 0,08	1,20 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,10	0,41 $\pm$ 0,07
Cestose	0,91 $\pm$ 0,37	0,72 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,15	0,77 $\pm$ 0,15	1,04 $\pm$ 0,17	2,45 $\pm$ 0,27	0,84 $\pm$ 0,06	2,96 $\pm$ 0,61	0,94 $\pm$ 0,17	2,41 $\pm$ 0,35	0,48 $\pm$ 0,04
Citrato	1,02 $\pm$ 0,18	0,99 $\pm$ 0,09	0,92 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,08	1,14 $\pm$ 0,13	0,92 $\pm$ 0,12	1,16 $\pm$ 0,13	0,97 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,13
Citrulina	0,90 $\pm$ 0,17	0,80 $\pm$ 0,10	0,97 $\pm$ 0,09	0,66 $\pm$ 0,27	1,25 $\pm$ 0,19	1,00 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,29	0,89 $\pm$ 0,21	2,17 $\pm$ 0,37	0,83 $\pm$ 0,20	3,16 $\pm$ 0,49
Fenilalanina	0,98 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,11	1,40 $\pm$ 0,19	0,85 $\pm$ 0,09	1,93 $\pm$ 0,24	0,80 $\pm$ 0,07	2,34 $\pm$ 0,50	0,62 $\pm$ 0,11	1,86 $\pm$ 0,31	0,58 $\pm$ 0,08	1,91 $\pm$ 0,29
Frutose	0,32 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,11	1,11 $\pm$ 0,07	1,54 $\pm$ 0,21	1,03 $\pm$ 0,12	1,31 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,06
Fumarato	1,33 $\pm$ 0,19	0,80 $\pm$ 0,15	0,81 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,13	0,71 $\pm$ 0,04	1,17 $\pm$ 0,20	0,81 $\pm$ 0,18	1,27 $\pm$ 0,31	0,94 $\pm$ 0,22	1,85 $\pm$ 0,36	0,82 $\pm$ 0,10
Galactinol	0,70 $\pm$ 0,24	1,21 $\pm$ 0,34	1,13 $\pm$ 0,32	1,46 $\pm$ 0,14	1,11 $\pm$ 0,37	1,23 $\pm$ 0,20	0,79 $\pm$ 0,17	1,35 $\pm$ 0,18	0,71 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,10	0,44 $\pm$ 0,20
Gliceraldeído-3-P	1,73 $\pm$ 0,28	1,15 $\pm$ 0,15	1,13 $\pm$ 0,13	1,10 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,12	0,61 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,13
Glicerato	0,45 $\pm$ 0,15	1,78 $\pm$ 0,24	1,25 $\pm$ 0,21	0,45 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,55	0,81 $\pm$ 0,24	0,69 $\pm$ 0,18	1,31 $\pm$ 0,33	0,93 $\pm$ 0,17	0,98 $\pm$ 0,27	1,18 $\pm$ 0,21
Glicina	1,01 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,15	1,10 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,17	0,87 $\pm$ 0,10
Glicose	0,28 $\pm$ 0,06	0,49 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,19	1,30 $\pm$ 0,18	1,03 $\pm$ 0,11	1,54 $\pm$ 0,21	1,22 $\pm$ 0,22	1,66 $\pm$ 0,40	1,29 $\pm$ 0,27
Glicose 6-P	0,96 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,10	0,96 $\pm$ 0,10	1,12 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,10	1,35 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,15	1,18 $\pm$ 0,10	0,55 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,11	0,36 $\pm$ 0,11
Glutamato	0,88 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,13	0,95 $\pm$ 0,07	1,28 $\pm$ 0,12	0,82 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,11	0,73 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,05
Glutamina	0,85 $\pm$ 0,14	0,61 $\pm$ 0,13	0,66 $\pm$ 0,16	0,57 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,16	0,95 $\pm$ 0,10	2,12 $\pm$ 0,25	0,98 $\pm$ 0,18	3,32 $\pm$ 0,89	1,17 $\pm$ 0,21	3,01 $\pm$ 0,50
Isocitrato	0,50 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,04	1,60 $\pm$ 0,22	1,08 $\pm$ 0,16	1,64 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,16	0,82 $\pm$ 0,10
Isoleucina	1,05 $\pm$ 0,14	0,73 $\pm$ 0,19	1,25 $\pm$ 0,27	0,45 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,32	0,32 $\pm$ 0,06	2,23 $\pm$ 0,47	0,24 $\pm$ 0,05	2,81 $\pm$ 0,67	0,16 $\pm$ 0,02	3,57 $\pm$ 0,81
Leucina	1,03 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,20	1,20 $\pm$ 0,25	0,42 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,13	0,30 $\pm$ 0,08	2,23 $\pm$ 0,60	0,25 $\pm$ 0,05	2,56 $\pm$ 0,77	0,16 $\pm$ 0,01	3,33 $\pm$ 0,88
Lisina	1,06 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,23	1,13 $\pm$ 0,25	0,45 $\pm$ 0,13	1,30 $\pm$ 0,17	0,39 $\pm$ 0,13	2,41 $\pm$ 0,75	0,28 $\pm$ 0,09	2,92 $\pm$ 1,01	0,14 $\pm$ 0,01	3,53 $\pm$ 0,95

Continuação tabela suplementar 4. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de raízes de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 12 h de luz (fotoperíodo de 12 h). Dados mostrados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (60 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	1h		2h		4h		8h		12h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
Malato	0,49 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,11	1,39 $\pm$ 0,21	1,09 $\pm$ 0,07	1,20 $\pm$ 0,11	1,10 $\pm$ 0,10	1,04 $\pm$ 0,17	1,00 $\pm$ 0,13
Maltose	1,18 $\pm$ 0,38	1,49 $\pm$ 0,80	1,34 $\pm$ 0,44	1,35 $\pm$ 0,17	1,31 $\pm$ 0,49	2,33 $\pm$ 0,35	0,75 $\pm$ 0,22	1,23 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,08	0,76 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,35
Metionina	1,02 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,10	0,78 $\pm$ 0,04	1,30 $\pm$ 0,17	0,60 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,27	0,56 $\pm$ 0,08	2,08 $\pm$ 0,22	0,53 $\pm$ 0,04	2,60 $\pm$ 0,52
Mio-Inositol	1,11 $\pm$ 0,18	1,20 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,10	1,20 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,10	1,06 $\pm$ 0,10	0,70 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,14	0,60 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,06	0,56 $\pm$ 0,07
Nicotinato	2,08 $\pm$ 0,58	1,55 $\pm$ 0,23	1,50 $\pm$ 0,28	1,15 $\pm$ 0,23	1,04 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,16	0,44 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,13	0,36 $\pm$ 0,06
Ornitina	1,31 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,16	0,88 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,16	0,91 $\pm$ 0,21	0,78 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,12	1,04 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,26	1,40 $\pm$ 0,08
Piruvato	0,88 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,17	1,01 $\pm$ 0,19	0,75 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,10	0,96 $\pm$ 0,13	1,24 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,11	1,36 $\pm$ 0,22	1,27 $\pm$ 0,19
Prolina	0,81 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,08	1,27 $\pm$ 0,28	0,69 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,17	1,24 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,16	1,56 $\pm$ 0,13
Putrescina	0,97 $\pm$ 0,31	1,00 $\pm$ 0,21	1,04 $\pm$ 0,16	0,95 $\pm$ 0,18	0,99 $\pm$ 0,24	0,94 $\pm$ 0,21	0,82 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,20	0,82 $\pm$ 0,13	1,03 $\pm$ 0,09
Ramnose	1,34 $\pm$ 0,22	1,22 $\pm$ 0,11	1,07 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,08	0,60 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,09	0,56 $\pm$ 0,08
Ribulose	1,17 $\pm$ 0,14	1,16 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,10	0,76 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,10	0,59 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,10	0,56 $\pm$ 0,09
Sacarose	0,32 $\pm$ 0,07	1,19 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,18	1,62 $\pm$ 0,25	0,88 $\pm$ 0,11	1,42 $\pm$ 0,20	0,64 $\pm$ 0,21	1,15 $\pm$ 0,18	0,28 $\pm$ 0,04	1,40 $\pm$ 0,20	0,33 $\pm$ 0,04
Serina	1,09 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,12	0,79 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,04	1,17 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,06
Succinato	0,68 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,08	1,28 $\pm$ 0,14
Tirosina	1,06 $\pm$ 0,10	0,70 $\pm$ 0,14	1,18 $\pm$ 0,14	0,44 $\pm$ 0,08	1,58 $\pm$ 0,26	0,43 $\pm$ 0,06	2,37 $\pm$ 0,56	0,35 $\pm$ 0,09	2,33 $\pm$ 0,56	0,34 $\pm$ 0,07	2,83 $\pm$ 0,62
Trealose	1,17 $\pm$ 0,16	1,97 $\pm$ 0,38	1,11 $\pm$ 0,22	1,23 $\pm$ 0,31	0,86 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,15	0,61 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,21	0,61 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,21	0,62 $\pm$ 0,16
Treonina	1,02 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,12	0,80 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,07	1,50 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,05	1,72 $\pm$ 0,17
Triptofano	0,97 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,12	1,08 $\pm$ 0,19	0,59 $\pm$ 0,12	1,63 $\pm$ 0,36	0,59 $\pm$ 0,07	2,01 $\pm$ 0,38	0,29 $\pm$ 0,08	1,89 $\pm$ 0,48	0,35 $\pm$ 0,05	2,57 $\pm$ 0,61
Valina	1,08 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,14	1,22 $\pm$ 0,18	0,59 $\pm$ 0,08	1,34 $\pm$ 0,21	0,53 $\pm$ 0,07	1,85 $\pm$ 0,26	0,46 $\pm$ 0,07	2,27 $\pm$ 0,34	0,37 $\pm$ 0,05	2,78 $\pm$ 0,45

Tabela suplementar 5. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de folhas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 12 h de luz (fotoperíodo de 12 h). Dados mostrados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (60 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	1h		2h		4h		8h		10h		12h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
2-Hidroxipiridina	1,62 $\pm$ 0,08	1,33 $\pm$ 0,20	1,22 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,14	0,78 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,17	0,96 $\pm$ 0,08	0,85 $\pm$ 0,16	1,03 $\pm$ 0,07	0,65 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,11
4-Aminobutanoato	1,46 $\pm$ 0,16	1,28 $\pm$ 0,06	1,31 $\pm$ 0,18	1,01 $\pm$ 0,20	1,16 $\pm$ 0,25	0,90 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,15	0,67 $\pm$ 0,17	0,94 $\pm$ 0,22	0,83 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,12
5-Oxoprolina	1,40 $\pm$ 0,18	1,19 $\pm$ 0,16	1,01 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,14	0,89 $\pm$ 0,15	0,69 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,09	1,18 $\pm$ 0,15	0,91 $\pm$ 0,12	1,08 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,17
Adenina	1,62 $\pm$ 0,05	1,36 $\pm$ 0,15	1,20 $\pm$ 0,10	0,97 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,21	0,69 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,05
Agmatina	1,44 $\pm$ 0,12	1,13 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,04	1,28 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,08
Alanina	0,69 $\pm$ 0,08	1,15 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,10	0,86 $\pm$ 0,10	1,13 $\pm$ 0,12	0,65 $\pm$ 0,11	1,16 $\pm$ 0,13	0,67 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,04
Arginina	1,40 $\pm$ 0,20	1,21 $\pm$ 0,06	1,44 $\pm$ 0,17	0,89 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,10	0,96 $\pm$ 0,22	0,63 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,13	0,46 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,23	0,45 $\pm$ 0,08	1,17 $\pm$ 0,08	0,47 $\pm$ 0,04
Asparagina	2,80 $\pm$ 0,57	1,07 $\pm$ 0,06	1,09 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,47	0,87 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,29	0,78 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,19	0,95 $\pm$ 0,12	1,27 $\pm$ 0,30	0,55 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,13
Aspartato	1,76 $\pm$ 0,20	1,16 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,14	0,85 $\pm$ 0,13	1,42 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,08	1,38 $\pm$ 0,15	0,82 $\pm$ 0,05	1,21 $\pm$ 0,16	0,71 $\pm$ 0,08
b-Alanina	1,49 $\pm$ 0,20	0,97 $\pm$ 0,10	1,06 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,12	0,97 $\pm$ 0,03	1,24 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,07	1,44 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,10	1,54 $\pm$ 0,14
Cis-aconitato	1,24 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,12	0,71 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,09	1,19 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,09	1,31 $\pm$ 0,10	0,97 $\pm$ 0,11	1,28 $\pm$ 0,08
Citrato	2,61 $\pm$ 0,46	1,45 $\pm$ 0,18	1,67 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,09	0,73 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,17	0,81 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,12	0,90 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,14
Citrulina	1,29 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,07	1,20 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,11	0,91 $\pm$ 0,13	0,95 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,10	0,60 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,10	0,56 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,03
Dehidroascorbato	2,27 $\pm$ 1,08	2,15 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 1,23	0,47 $\pm$ 0,13	2,83 $\pm$ 3,24	1,26 $\pm$ 1,23	1,33 $\pm$ 0,93	1,08 $\pm$ 0,40	6,95 $\pm$ 4,18	0,48 $\pm$ 0,23	0,27 $\pm$ 0,18	1,05 $\pm$ 0,43	1,83 $\pm$ 1,30
Eritritol	1,67 $\pm$ 0,24	1,26 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,08	0,87 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,02
Fenilalanina	0,77 $\pm$ 0,09	1,12 $\pm$ 0,17	1,04 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,14	0,81 $\pm$ 0,12	0,74 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,16	1,16 $\pm$ 0,09	1,33 $\pm$ 0,17	1,42 $\pm$ 0,15	1,67 $\pm$ 0,19
Frutose	0,03 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,11	1,35 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,11	1,52 $\pm$ 0,26	0,48 $\pm$ 0,05	1,43 $\pm$ 0,14	0,24 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,12	0,30 $\pm$ 0,09	1,25 $\pm$ 0,15
Fucose Epifucose	1,56 $\pm$ 0,17	1,24 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,10	0,83 $\pm$ 0,09	1,23 $\pm$ 0,14	0,89 $\pm$ 0,09
Fumarato	0,91 $\pm$ 0,08	0,88 $\pm$ 0,18	0,87 $\pm$ 0,13	0,73 $\pm$ 0,15	0,88 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,19	1,51 $\pm$ 0,17	2,53 $\pm$ 0,64	1,63 $\pm$ 0,13	3,12 $\pm$ 0,17	2,05 $\pm$ 0,59	3,22 $\pm$ 0,46
Galactinol	0,26 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,44	0,40 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,64	0,64 $\pm$ 0,16	1,36 $\pm$ 0,32	1,45 $\pm$ 0,35	0,86 $\pm$ 0,50	1,92 $\pm$ 0,24	0,84 $\pm$ 0,32	1,54 $\pm$ 0,35
Glc 6-P Gal 6-P	0,96 $\pm$ 0,06	1,09 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,15	0,80 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,12	1,22 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,07	1,10 $\pm$ 0,14	0,90 $\pm$ 0,13
Glicerato	0,40 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,10	0,69 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,17	1,14 $\pm$ 0,09	1,52 $\pm$ 0,15	1,51 $\pm$ 0,23	1,54 $\pm$ 0,12	1,30 $\pm$ 0,10	1,78 $\pm$ 0,13
Glicerol	2,20 $\pm$ 0,28	1,44 $\pm$ 0,24	1,33 $\pm$ 0,17	1,08 $\pm$ 0,24	0,86 $\pm$ 0,11	1,05 $\pm$ 0,17	0,35 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,26	0,50 $\pm$ 0,20	1,01 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,16	1,38 $\pm$ 0,24	0,76 $\pm$ 0,16
Glicina	0,08 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,10	0,85 $\pm$ 0,19	0,85 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,12	1,19 $\pm$ 0,18	1,01 $\pm$ 0,23	2,49 $\pm$ 0,37	1,20 $\pm$ 0,23	2,89 $\pm$ 0,59	0,98 $\pm$ 0,14	2,67 $\pm$ 0,48	0,81 $\pm$ 0,14
Glicose	0,11 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,14	0,78 $\pm$ 0,10	1,04 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,15	1,49 $\pm$ 0,29	1,16 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,39	0,90 $\pm$ 0,15	2,66 $\pm$ 0,32	0,87 $\pm$ 0,09	2,92 $\pm$ 0,19
Glutamato	0,75 $\pm$ 0,10	1,09 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,10	1,06 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,10	0,64 $\pm$ 0,20	1,20 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,06	1,27 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,05
Glutamina	1,13 $\pm$ 0,12	1,07 $\pm$ 0,20	0,86 $\pm$ 0,17	0,86 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,10	1,10 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,13	1,30 $\pm$ 0,19	1,06 $\pm$ 0,06	1,40 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 0,07
Idose	0,12 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,12	0,76 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,14	1,44 $\pm$ 0,27	1,13 $\pm$ 0,11	2,55 $\pm$ 0,38	0,88 $\pm$ 0,15	2,59 $\pm$ 0,31	0,90 $\pm$ 0,14	2,88 $\pm$ 0,22
Isocitrato	0,98 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,11	0,69 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,14	0,81 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,17	1,24 $\pm$ 0,19	1,23 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,14	1,18 $\pm$ 0,10

Continuação tabela suplementar 5. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de folhas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 12 h de luz (fotoperíodo de 12 h). Dados mostrados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (60 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	1h		2h		4h		8h		10h		12h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
Isoleucina	1,60 $\pm$ 0,21	1,17 $\pm$ 0,15	1,30 $\pm$ 0,15	0,81 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,13	1,16 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,10	1,45 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,06	1,96 $\pm$ 0,35
Leucina	1,62 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,07	1,32 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,07	0,65 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,10	0,69 $\pm$ 0,10	1,19 $\pm$ 0,14	0,92 $\pm$ 0,10	1,56 $\pm$ 0,16	0,87 $\pm$ 0,05	2,31 $\pm$ 0,46
Lisina	2,42 $\pm$ 0,30	1,18 $\pm$ 0,06	1,56 $\pm$ 0,14	0,79 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,10	0,68 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,09	0,63 $\pm$ 0,04	1,58 $\pm$ 0,28
Malato	0,37 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,16	1,58 $\pm$ 0,12	1,99 $\pm$ 0,27	1,67 $\pm$ 0,14	2,01 $\pm$ 0,11	1,48 $\pm$ 0,29	1,95 $\pm$ 0,14
Maltose	1,03 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,24	0,73 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,05	1,18 $\pm$ 0,20	0,92 $\pm$ 0,17	1,39 $\pm$ 0,22	1,00 $\pm$ 0,10	1,26 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,03
Metionina	1,81 $\pm$ 0,22	1,17 $\pm$ 0,13	0,86 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,21	1,05 $\pm$ 0,11	0,91 $\pm$ 0,15	0,72 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,12	1,08 $\pm$ 0,19	1,03 $\pm$ 0,16	0,65 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,18	1,04 $\pm$ 0,17
Mio-Inositol	1,27 $\pm$ 0,16	0,91 $\pm$ 0,15	0,91 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,10	0,70 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,20	0,97 $\pm$ 0,07	1,61 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,11	1,42 $\pm$ 0,25	1,14 $\pm$ 0,11
O-Acetilserina	0,75 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,10	1,34 $\pm$ 0,15	1,22 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,11	0,66 $\pm$ 0,07
Ornitina	2,10 $\pm$ 0,31	1,58 $\pm$ 0,22	1,66 $\pm$ 0,28	1,19 $\pm$ 0,18	0,97 $\pm$ 0,13	0,97 $\pm$ 0,09	0,60 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,15	0,34 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,19	0,27 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,16	0,31 $\pm$ 0,02
Ortofosfato	2,27 $\pm$ 0,17	1,62 $\pm$ 0,19	1,70 $\pm$ 0,21	1,27 $\pm$ 0,14	1,10 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,12
Oxalato	2,86 $\pm$ 0,43	1,77 $\pm$ 0,17	1,40 $\pm$ 0,14	1,37 $\pm$ 0,31	0,94 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,19	0,84 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,13	0,70 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,16	0,61 $\pm$ 0,07
Prolina	0,70 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,17	0,76 $\pm$ 0,20	0,75 $\pm$ 0,15	0,92 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,27	1,25 $\pm$ 0,16	1,93 $\pm$ 0,55	2,60 $\pm$ 0,82	1,87 $\pm$ 0,46	1,96 $\pm$ 0,25	2,42 $\pm$ 0,37
Putrescina	1,44 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,12	0,81 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,12	1,21 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,15	1,04 $\pm$ 0,11
Rafinose	0,33 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,20	0,58 $\pm$ 0,06	1,92 $\pm$ 0,41	1,29 $\pm$ 0,57	2,08 $\pm$ 0,86	1,32 $\pm$ 0,11	1,48 $\pm$ 0,44	1,21 $\pm$ 0,23
Ramnose	1,75 $\pm$ 0,14	1,31 $\pm$ 0,11	1,17 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,09
Sacarose	0,46 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,13	1,70 $\pm$ 0,10	1,09 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,11	1,02 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,18	0,77 $\pm$ 0,06	1,32 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 0,05
Serina	0,46 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,14	1,14 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,11	1,11 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,12	1,07 $\pm$ 0,07
Sorbose Tagatose	0,02 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,16	1,02 $\pm$ 0,12	1,40 $\pm$ 0,05	1,20 $\pm$ 0,12	1,63 $\pm$ 0,27	0,51 $\pm$ 0,05	1,41 $\pm$ 0,18	0,25 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,11
Succinato	1,12 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,17	1,01 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,29	0,97 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,17	0,94 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,09	1,50 $\pm$ 0,36	0,79 $\pm$ 0,08	1,45 $\pm$ 0,31	0,71 $\pm$ 0,11
Tirosina	1,90 $\pm$ 0,16	0,96 $\pm$ 0,04	1,36 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,08	0,75 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,08	1,05 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,15	2,15 $\pm$ 0,25
Trans-4-Hidroxiprolina	1,20 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,07	0,84 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,03	1,28 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,06
Trealose	1,36 $\pm$ 0,33	0,92 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,11	0,91 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,09	0,73 $\pm$ 0,15	1,08 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,09	1,41 $\pm$ 0,23	1,20 $\pm$ 0,13
Treonato	1,66 $\pm$ 0,23	1,11 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,13	0,83 $\pm$ 0,15	1,42 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,09	1,33 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,19	0,71 $\pm$ 0,09
Treonina	0,97 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,05	1,21 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,04	1,35 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,05
Triptofano	1,08 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,07	0,95 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,26	0,83 $\pm$ 0,15	0,67 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,10	1,06 $\pm$ 0,21	1,34 $\pm$ 0,44	1,57 $\pm$ 0,20
Uracil	1,85 $\pm$ 0,46	1,64 $\pm$ 0,09	1,21 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,43	0,80 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,39	0,74 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,24	0,92 $\pm$ 0,25	0,45 $\pm$ 0,20
Urea	5,07 $\pm$ 0,63	2,81 $\pm$ 0,50	3,80 $\pm$ 0,42	1,52 $\pm$ 0,10	1,64 $\pm$ 0,28	1,04 $\pm$ 0,12	0,77 $\pm$ 0,16	0,89 $\pm$ 0,13	0,64 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,12	0,77 $\pm$ 0,16
Valina	1,36 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,04	1,29 $\pm$ 0,16	1,03 $\pm$ 0,07	1,53 $\pm$ 0,18
Xilitol	1,87 $\pm$ 0,26	1,30 $\pm$ 0,10	1,53 $\pm$ 0,11	1,11 $\pm$ 0,08	1,07 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,07	0,82 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,09	0,84 $\pm$ 0,04
Xilose Arabinose	1,42 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,15	1,19 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,12	1,03 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,15	0,83 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,08

Tabela suplementar 6. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 4 h de noite estendida e 8 h de luz (fotoperíodo de 12 h). Dados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	1h		2h		3h		4h		8h		12h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
2-Hidroxipiridina	1,25 $\pm$ 0,19	1,34 $\pm$ 0,26	1,26 $\pm$ 0,13	1,03 $\pm$ 0,18	1,18 $\pm$ 0,17	1,17 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,13	0,95 $\pm$ 0,17	1,12 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,06
2-Oxoglutarato	0,93 $\pm$ 0,31	0,96 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,17	0,96 $\pm$ 0,21	0,87 $\pm$ 0,19	0,67 $\pm$ 0,21	0,48 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,17	2,74 $\pm$ 0,20	1,82 $\pm$ 0,13	2,78 $\pm$ 0,18	2,28 $\pm$ 0,23
4-Aminobutanoato	1,15 $\pm$ 0,17	1,37 $\pm$ 0,20	1,03 $\pm$ 0,23	1,10 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,18	0,88 $\pm$ 0,19	0,93 $\pm$ 0,15	1,36 $\pm$ 0,38	0,66 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,19	0,47 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,11
5-Oxoprolina	1,09 $\pm$ 0,20	1,30 $\pm$ 0,16	1,24 $\pm$ 0,41	1,21 $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,21	1,04 $\pm$ 0,25	0,99 $\pm$ 0,22	0,89 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,20	0,71 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,13	0,90 $\pm$ 0,11
Agmatina	1,02 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,07	1,09 $\pm$ 0,13	1,12 $\pm$ 0,18	1,19 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,10	1,09 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,16	1,05 $\pm$ 0,15	0,85 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,05
Alanina	1,02 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,22	0,91 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,16	0,95 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,15	0,81 $\pm$ 0,14	0,79 $\pm$ 0,06	1,37 $\pm$ 0,19	1,51 $\pm$ 0,10	1,35 $\pm$ 0,14	1,33 $\pm$ 0,14
Arginina	0,62 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,21	0,94 $\pm$ 0,10	0,78 $\pm$ 0,21	1,05 $\pm$ 0,29	0,95 $\pm$ 0,26	1,19 $\pm$ 0,37	1,39 $\pm$ 0,23	1,11 $\pm$ 0,16	1,88 $\pm$ 0,20	0,96 $\pm$ 0,15
Asparagina	0,81 $\pm$ 0,25	0,99 $\pm$ 0,19	0,48 $\pm$ 0,08	1,22 $\pm$ 0,50	0,74 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,24	1,17 $\pm$ 0,43	0,86 $\pm$ 0,23	1,03 $\pm$ 0,48	1,99 $\pm$ 0,49	1,55 $\pm$ 0,65	1,72 $\pm$ 0,43
Aspartato	1,08 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,17	1,08 $\pm$ 0,09	1,16 $\pm$ 0,08	1,15 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,09	0,84 $\pm$ 0,16	0,97 $\pm$ 0,14	0,73 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,15	0,64 $\pm$ 0,10
b-Alanina	0,80 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,12	1,07 $\pm$ 0,09	1,25 $\pm$ 0,14	1,22 $\pm$ 0,14	1,39 $\pm$ 0,20	1,59 $\pm$ 0,21	0,72 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,06
Benzoato	1,14 $\pm$ 0,13	0,96 $\pm$ 0,08	1,29 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,14	1,13 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,13	1,23 $\pm$ 0,17	0,98 $\pm$ 0,17	0,86 $\pm$ 0,19	0,59 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,12	0,55 $\pm$ 0,07
Cis-Aconitato	1,12 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,11	1,07 $\pm$ 0,15	1,04 $\pm$ 0,31	1,08 $\pm$ 0,17	1,13 $\pm$ 0,20	1,40 $\pm$ 0,50	0,86 $\pm$ 0,09	1,21 $\pm$ 0,25	0,78 $\pm$ 0,10	1,11 $\pm$ 0,19	0,72 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,19
Citrato	1,73 $\pm$ 0,23	1,09 $\pm$ 0,14	1,40 $\pm$ 0,15	1,08 $\pm$ 0,14	1,22 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,09	1,27 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,16	0,96 $\pm$ 0,18	0,46 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,10	0,52 $\pm$ 0,11	0,66 $\pm$ 0,06
Citrulina	0,69 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,22	1,01 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,19	0,91 $\pm$ 0,20	0,83 $\pm$ 0,17	1,12 $\pm$ 0,24	1,43 $\pm$ 0,14	1,38 $\pm$ 0,16	1,91 $\pm$ 0,19	1,16 $\pm$ 0,14
Dehidroascorbato	1,25 $\pm$ 0,24	1,34 $\pm$ 0,38	1,09 $\pm$ 0,18	1,05 $\pm$ 0,28	1,15 $\pm$ 0,29	0,99 $\pm$ 0,27	0,97 $\pm$ 0,16	0,73 $\pm$ 0,28	1,15 $\pm$ 0,43	0,82 $\pm$ 0,16	0,73 $\pm$ 0,21	0,84 $\pm$ 0,26	0,58 $\pm$ 0,05
Eritritol	1,07 $\pm$ 0,16	0,98 $\pm$ 0,08	1,14 $\pm$ 0,20	1,06 $\pm$ 0,23	1,39 $\pm$ 0,16	1,32 $\pm$ 0,28	1,28 $\pm$ 0,00	1,25 $\pm$ 0,29	1,12 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,06
Fenilalanina	0,74 $\pm$ 0,12	0,97 $\pm$ 0,18	0,71 $\pm$ 0,13	0,86 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,13	1,08 $\pm$ 0,05	1,14 $\pm$ 0,23	1,78 $\pm$ 0,30	0,91 $\pm$ 0,11	1,84 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,22	2,17 $\pm$ 0,19
Frutose	0,88 $\pm$ 0,20	0,93 $\pm$ 0,13	0,93 $\pm$ 0,13	0,85 $\pm$ 0,23	0,92 $\pm$ 0,08	0,88 $\pm$ 0,13	0,97 $\pm$ 0,36	0,58 $\pm$ 0,18	0,82 $\pm$ 0,10	9,10 $\pm$ 1,26	17,90 $\pm$ 1,58	5,03 $\pm$ 0,78	15,95 $\pm$ 2,63
Fumarato	1,22 $\pm$ 0,23	1,02 $\pm$ 0,14	1,10 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,18	1,06 $\pm$ 0,23	0,92 $\pm$ 0,22	1,00 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,10	0,83 $\pm$ 0,16	1,10 $\pm$ 0,21	1,13 $\pm$ 0,12	1,72 $\pm$ 0,19
Galactinol	0,36 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,21	0,78 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,14	1,53 $\pm$ 0,44	1,63 $\pm$ 0,37	0,95 $\pm$ 0,29	1,61 $\pm$ 0,38	0,92 $\pm$ 0,34	1,08 $\pm$ 0,28	0,60 $\pm$ 0,12	1,25 $\pm$ 0,21
Glc 6-P Gal 6-P	1,41 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,15	1,08 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,12	0,89 $\pm$ 0,10	0,68 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,07	0,51 $\pm$ 0,11	0,66 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,21	1,43 $\pm$ 0,12
Glicerato	0,92 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,13	0,95 $\pm$ 0,16	1,07 $\pm$ 0,19	0,84 $\pm$ 0,16	1,22 $\pm$ 0,34	0,83 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,13	2,91 $\pm$ 0,29	3,99 $\pm$ 0,40	4,57 $\pm$ 0,38	6,38 $\pm$ 0,57
Glicerol	1,29 $\pm$ 0,21	1,06 $\pm$ 0,24	1,08 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,21	1,20 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,27	1,14 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,17	0,56 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,13	0,57 $\pm$ 0,05
Glicerol 3-P	1,00 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,14	1,06 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,12	1,08 $\pm$ 0,09	1,20 $\pm$ 0,17	0,83 $\pm$ 0,08	0,76 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,15	0,77 $\pm$ 0,07
Glicina	1,18 $\pm$ 0,22	0,76 $\pm$ 0,17	0,70 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,23	0,99 $\pm$ 0,25	0,66 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,11	12,05 $\pm$ 1,03	9,05 $\pm$ 0,43	18,99 $\pm$ 2,55	9,99 $\pm$ 1,86
Glicose	0,88 $\pm$ 0,18	0,87 $\pm$ 0,12	0,85 $\pm$ 0,21	1,05 $\pm$ 0,39	0,87 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,31	0,71 $\pm$ 0,22	0,84 $\pm$ 0,20	3,06 $\pm$ 0,28	4,24 $\pm$ 0,27	3,59 $\pm$ 0,42	4,90 $\pm$ 0,70
Glutamato	1,11 $\pm$ 0,21	0,97 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,20	0,91 $\pm$ 0,11	0,75 $\pm$ 0,15	0,89 $\pm$ 0,20	0,82 $\pm$ 0,21	0,85 $\pm$ 0,15	1,16 $\pm$ 0,44	1,42 $\pm$ 0,07	1,49 $\pm$ 0,35	1,14 $\pm$ 0,19
Glutamina	1,05 $\pm$ 0,09	1,18 $\pm$ 0,24	0,95 $\pm$ 0,04	1,31 $\pm$ 0,23	1,12 $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,26	1,22 $\pm$ 0,18	0,88 $\pm$ 0,08	0,87 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,09
Isocitrato	0,96 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,10	0,85 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,21	1,01 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,25	1,12 $\pm$ 0,16	0,93 $\pm$ 0,11	1,14 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,15	1,31 $\pm$ 0,10

Tabela suplementar 6. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 4 h de noite estendida e 8 h de luz (fotoperíodo de 12 h). Dados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo indicam coletas em períodos de escuro e luz, respectivamente.

Metabólitos	0h	1h		2h		3h		4h		8h		12h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
Isoleucina	0,41 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,14	1,02 $\pm$ 0,06	1,24 $\pm$ 0,16	1,59 $\pm$ 0,20	1,82 $\pm$ 0,21	2,70 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,09	0,31 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,11
Leucina	0,49 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,14	0,74 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,12	1,26 $\pm$ 0,07	1,53 $\pm$ 0,20	1,98 $\pm$ 0,24	2,33 $\pm$ 0,35	3,37 $\pm$ 0,27	0,34 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,12	0,25 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,16
Lisina	0,52 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,25	1,07 $\pm$ 0,07	1,28 $\pm$ 0,14	1,48 $\pm$ 0,20	1,72 $\pm$ 0,21	2,29 $\pm$ 0,43	0,60 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,18	0,42 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,07
Malato	1,14 $\pm$ 0,17	0,93 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,18	0,92 $\pm$ 0,11	0,86 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,12	0,83 $\pm$ 0,06	1,85 $\pm$ 0,15	2,49 $\pm$ 0,21	3,00 $\pm$ 0,34	4,38 $\pm$ 0,52
Maltose	1,11 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,12	0,77 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,10	0,97 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,15	1,01 $\pm$ 0,20	0,62 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,23	1,20 $\pm$ 0,28	1,21 $\pm$ 0,24	1,89 $\pm$ 0,23
Metionina	0,74 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,18	0,88 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,14	1,03 $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,11	1,12 $\pm$ 0,13	1,11 $\pm$ 0,17	1,53 $\pm$ 0,18	0,92 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,14	0,80 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,20
Mio-Inositol	1,01 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,16	1,05 $\pm$ 0,20	1,12 $\pm$ 0,09	1,16 $\pm$ 0,11	1,15 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,25	1,18 $\pm$ 0,23	0,80 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,15	0,65 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,08
O-acetilserina	1,11 $\pm$ 0,21	0,88 $\pm$ 0,08	0,88 $\pm$ 0,27	1,02 $\pm$ 0,13	1,18 $\pm$ 0,13	0,86 $\pm$ 0,10	1,17 $\pm$ 0,14	0,58 $\pm$ 0,13	0,92 $\pm$ 0,14	1,03 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,14
Ornitina	0,94 $\pm$ 0,20	0,82 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,10	1,18 $\pm$ 0,22	0,99 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,19	0,96 $\pm$ 0,23	1,14 $\pm$ 0,09	1,10 $\pm$ 0,24	1,55 $\pm$ 0,19	0,92 $\pm$ 0,14	1,57 $\pm$ 0,15	0,50 $\pm$ 0,07
Ortofosfato	0,94 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,17	1,15 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,14	1,12 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,19	1,07 $\pm$ 0,19	0,66 $\pm$ 0,10	0,63 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,10	0,57 $\pm$ 0,08
Piruvato	1,09 $\pm$ 0,20	0,93 $\pm$ 0,12	0,90 $\pm$ 0,24	0,75 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,14	0,57 $\pm$ 0,17	0,69 $\pm$ 0,15	2,27 $\pm$ 0,17	1,24 $\pm$ 0,13	1,79 $\pm$ 0,11	2,05 $\pm$ 0,52
Prolina	0,76 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,10	1,04 $\pm$ 0,28	1,15 $\pm$ 0,46	1,08 $\pm$ 0,25	0,94 $\pm$ 0,18	1,04 $\pm$ 0,15	0,97 $\pm$ 0,21	1,03 $\pm$ 0,10	0,81 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,17	1,51 $\pm$ 0,47	3,68 $\pm$ 0,52
Putrescina	1,03 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,19	1,08 $\pm$ 0,12	1,22 $\pm$ 0,20	1,17 $\pm$ 0,18	0,97 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,22	1,15 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,18	0,79 $\pm$ 0,09
Rafinose	0,53 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,15	0,83 $\pm$ 0,22	0,86 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 0,19	0,85 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,23	1,00 $\pm$ 0,14	1,43 $\pm$ 0,45	1,18 $\pm$ 0,37	1,16 $\pm$ 0,17	1,70 $\pm$ 0,23
Ribonato	0,55 $\pm$ 0,36	1,28 $\pm$ 0,16	1,14 $\pm$ 0,34	1,18 $\pm$ 0,22	0,94 $\pm$ 0,33	0,77 $\pm$ 0,42	0,92 $\pm$ 0,44	0,84 $\pm$ 0,35	1,11 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,17	0,93 $\pm$ 0,17
Sacarose	1,47 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,19	1,05 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,10	0,39 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,05	2,07 $\pm$ 0,33	2,06 $\pm$ 0,13	2,81 $\pm$ 0,20	2,18 $\pm$ 0,20
Serina	0,65 $\pm$ 0,15	0,51 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,31	0,91 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,26	1,01 $\pm$ 0,20	0,71 $\pm$ 0,07	1,19 $\pm$ 0,29	1,96 $\pm$ 0,19	2,65 $\pm$ 0,15	2,11 $\pm$ 0,25	2,15 $\pm$ 0,20
Succinato	1,29 $\pm$ 0,19	1,17 $\pm$ 0,11	1,19 $\pm$ 0,11	1,10 $\pm$ 0,11	1,13 $\pm$ 0,14	0,99 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,14	0,70 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,09
Tirosina	0,55 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,16	0,69 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,09	1,70 $\pm$ 0,30	1,81 $\pm$ 0,37	2,82 $\pm$ 0,33	0,39 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,17
Trealose	1,27 $\pm$ 0,28	1,00 $\pm$ 0,24	1,21 $\pm$ 0,17	1,30 $\pm$ 0,52	1,17 $\pm$ 0,14	1,30 $\pm$ 0,26	1,06 $\pm$ 0,13	0,74 $\pm$ 0,13	1,11 $\pm$ 0,23	0,83 $\pm$ 0,21	0,54 $\pm$ 0,12	0,55 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,06
Treonato	1,08 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,16	1,06 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,15	1,04 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,12	0,61 $\pm$ 0,08
Treonina	0,72 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,16	0,77 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,13	1,31 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,07	1,20 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,08	1,27 $\pm$ 0,08
Triptofano	0,75 $\pm$ 0,20	0,97 $\pm$ 0,39	0,89 $\pm$ 0,15	0,69 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,37	0,81 $\pm$ 0,33	1,38 $\pm$ 0,32	1,28 $\pm$ 0,60	2,16 $\pm$ 0,74	0,77 $\pm$ 0,24	1,73 $\pm$ 0,16	0,83 $\pm$ 0,16	2,02 $\pm$ 0,49
Urea	1,20 $\pm$ 0,46	0,98 $\pm$ 0,13	0,89 $\pm$ 0,23	1,19 $\pm$ 0,30	1,27 $\pm$ 0,22	1,38 $\pm$ 0,12	1,15 $\pm$ 0,11	1,79 $\pm$ 0,28	1,01 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,11	0,71 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,16	0,96 $\pm$ 0,08
Valina	0,68 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,14	0,81 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,06	1,38 $\pm$ 0,12	1,52 $\pm$ 0,24	2,03 $\pm$ 0,15	0,52 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,10
Xilose Arabinose	0,91 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,13	0,98 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,20	1,12 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,09

Tabela suplementar 7. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 48 h de luz contínua. Dados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo da referência do tempo de coleta representam os períodos de noite subjetiva e de luz, respectivamente.

Metabólitos	Primeiro ciclo de 24h de luz contínua													
	0h	4h		8h		12h		16h		20h		24h		
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	
3-hidroxipiridina	2,12 ± 0,11	1,25 ± 0,23	0,96 ± 0,05	0,81 ± 0,14	0,74 ± 0,11	0,96 ± 0,02	0,80 ± 0,04	0,97 ± 0,04	0,84 ± 0,06	0,93 ± 0,07	0,82 ± 0,02	0,76 ± 0,05	0,90 ± 0,05	
4-Aminobutanoato	1,77 ± 0,09	1,24 ± 0,10	0,93 ± 0,08	0,93 ± 0,05	0,75 ± 0,00	1,05 ± 0,09	0,72 ± 0,00	1,01 ± 0,05	0,86 ± 0,01	0,99 ± 0,06	0,81 ± 0,04	1,10 ± 0,11	0,91 ± 0,03	
5-Oxoprolina	1,41 ± 0,06	1,18 ± 0,03	1,01 ± 0,01	1,33 ± 0,09	0,85 ± 0,09	1,15 ± 0,06	0,80 ± 0,02	1,17 ± 0,09	0,86 ± 0,03	1,25 ± 0,02	0,78 ± 0,01	1,16 ± 0,04	0,71 ± 0,04	
Agmatina	2,20 ± 0,15	1,40 ± 0,13	1,07 ± 0,10	1,13 ± 0,03	0,90 ± 0,02	1,19 ± 0,04	1,07 ± 0,06	1,06 ± 0,07	0,97 ± 0,03	1,01 ± 0,05	1,03 ± 0,05	0,89 ± 0,05	1,05 ± 0,05	
Alanina	0,98 ± 0,03	1,21 ± 0,04	0,93 ± 0,04	1,40 ± 0,05	0,92 ± 0,02	1,45 ± 0,04	0,89 ± 0,04	1,29 ± 0,01	0,88 ± 0,01	1,31 ± 0,01	0,73 ± 0,03	1,32 ± 0,02	0,71 ± 0,01	
Arginina	2,21 ± 0,17	1,45 ± 0,16	0,94 ± 0,04	1,10 ± 0,03	0,87 ± 0,05	1,51 ± 0,02	0,82 ± 0,07	1,78 ± 0,28	0,84 ± 0,01	1,27 ± 0,01	0,75 ± 0,05	1,25 ± 0,01	0,65 ± 0,00	
Asparagina	0,61 ± 0,07	0,54 ± 0,07	0,40 ± 0,05	0,79 ± 0,02	0,44 ± 0,09	0,70 ± 0,08	0,90 ± 0,06	0,84 ± 0,13	1,02 ± 0,09	1,00 ± 0,08	1,09 ± 0,11	1,18 ± 0,09	0,98 ± 0,06	
Aspartato	1,23 ± 0,09	1,10 ± 0,06	1,00 ± 0,03	1,19 ± 0,08	0,94 ± 0,03	1,19 ± 0,04	0,89 ± 0,03	1,18 ± 0,03	0,80 ± 0,03	1,13 ± 0,03	0,74 ± 0,02	1,00 ± 0,02	0,64 ± 0,03	
b-Alanina	0,72 ± 0,01	0,65 ± 0,02	1,05 ± 0,03	0,60 ± 0,00	1,15 ± 0,02	0,82 ± 0,02	1,44 ± 0,11	0,81 ± 0,02	1,42 ± 0,01	0,70 ± 0,02	1,42 ± 0,02	0,71 ± 0,02	1,33 ± 0,03	
Cis-Aconitato	1,34 ± 0,06	1,24 ± 0,12	1,16 ± 0,10	0,93 ± 0,09	1,13 ± 0,10	1,09 ± 0,05	1,45 ± 0,09	1,01 ± 0,08	1,20 ± 0,09	0,97 ± 0,00	0,98 ± 0,11	0,80 ± 0,07	0,95 ± 0,01	
Citramalato	1,00 ± 0,05	0,82 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,94 ± 0,01	0,81 ± 0,00	0,97 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,00 ± 0,03	1,18 ± 0,01	0,98 ± 0,04	1,18 ± 0,03	0,91 ± 0,03	1,06 ± 0,02	
Citrato	0,89 ± 0,02	0,79 ± 0,04	0,85 ± 0,01	0,78 ± 0,04	1,10 ± 0,02	0,91 ± 0,03	1,20 ± 0,07	0,87 ± 0,03	1,20 ± 0,10	0,96 ± 0,05	1,09 ± 0,04	1,07 ± 0,06	1,18 ± 0,00	
Citrulina	1,64 ± 0,24	1,23 ± 0,14	0,87 ± 0,03	1,02 ± 0,03	0,83 ± 0,02	1,30 ± 0,06	0,67 ± 0,02	1,31 ± 0,15	0,86 ± 0,07	1,14 ± 0,08	0,82 ± 0,04	0,95 ± 0,01	0,76 ± 0,03	
Dehidroascorbato	1,95 ± 0,15	1,07 ± 0,03	1,09 ± 0,10	0,70 ± 0,08	0,70 ± 0,00	0,91 ± 0,09	0,88 ± 0,08	0,88 ± 0,05	0,87 ± 0,11	1,01 ± 0,08	0,70 ± 0,08	0,88 ± 0,06	0,95 ± 0,05	
Eritritol	1,78 ± 0,07	1,32 ± 0,10	1,20 ± 0,13	0,99 ± 0,05	0,94 ± 0,01	1,03 ± 0,06	1,01 ± 0,04	0,99 ± 0,02	1,00 ± 0,01	0,99 ± 0,05	0,97 ± 0,01	0,84 ± 0,02	1,04 ± 0,08	
Fenilalanina	0,69 ± 0,05	0,52 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,55 ± 0,05	0,80 ± 0,07	0,89 ± 0,08	1,03 ± 0,08	0,99 ± 0,05	1,30 ± 0,06	1,43 ± 0,03	1,24 ± 0,08	1,13 ± 0,05	1,07 ± 0,04	
Frutose	0,68 ± 0,00	3,03 ± 0,10	4,52 ± 0,09	1,60 ± 0,00	3,75 ± 0,14	0,76 ± 0,03	2,10 ± 0,08	0,85 ± 0,03	1,70 ± 0,03	0,90 ± 0,05	1,89 ± 0,02	0,80 ± 0,08	1,81 ± 0,01	
Fumarato	0,84 ± 0,05	0,65 ± 0,01	0,54 ± 0,01	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,01	1,90 ± 0,10	0,80 ± 0,05	2,69 ± 0,04	0,74 ± 0,04	2,95 ± 0,08	0,62 ± 0,05	3,26 ± 0,10	
Galactinol	0,95 ± 0,16	2,26 ± 0,15	2,27 ± 0,09	2,29 ± 0,20	3,69 ± 0,20	2,33 ± 0,01	3,42 ± 0,19	1,49 ± 0,16	1,49 ± 0,15	1,06 ± 0,02	0,91 ± 0,04	0,88 ± 0,03	0,82 ± 0,00	
Glc 6-P Gal 6-P	1,98 ± 0,07	1,18 ± 0,04	1,25 ± 0,04	0,88 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,99 ± 0,02	0,81 ± 0,00	1,12 ± 0,02	0,83 ± 0,04	1,27 ± 0,04	0,89 ± 0,05	1,04 ± 0,02	0,75 ± 0,02	
Glicerato	0,55 ± 0,03	0,68 ± 0,07	0,74 ± 0,04	0,88 ± 0,01	1,20 ± 0,08	0,97 ± 0,03	1,25 ± 0,05	0,82 ± 0,06	1,41 ± 0,05	0,83 ± 0,05	1,25 ± 0,05	0,64 ± 0,02	1,30 ± 0,03	
Glicerol	2,75 ± 0,42	2,02 ± 0,23	1,22 ± 0,04	1,35 ± 0,10	1,06 ± 0,01	1,29 ± 0,02	0,91 ± 0,02	1,14 ± 0,13	0,88 ± 0,09	1,10 ± 0,08	0,84 ± 0,04	1,22 ± 0,03	0,99 ± 0,04	
Glicerol 3-P	2,61 ± 0,06	1,72 ± 0,10	1,09 ± 0,07	1,07 ± 0,07	0,94 ± 0,06	1,11 ± 0,03	0,82 ± 0,06	1,14 ± 0,07	0,91 ± 0,04	1,06 ± 0,06	0,80 ± 0,01	0,89 ± 0,02	0,76 ± 0,01	
Glicina	1,04 ± 0,08	1,16 ± 0,05	0,95 ± 0,02	1,36 ± 0,19	0,91 ± 0,01	1,64 ± 0,11	1,00 ± 0,06	1,62 ± 0,07	0,92 ± 0,04	1,38 ± 0,03	0,85 ± 0,03	1,53 ± 0,04	0,79 ± 0,03	
Glicose	0,25 ± 0,01	0,75 ± 0,04	1,12 ± 0,08	0,98 ± 0,02	1,42 ± 0,05	0,75 ± 0,02	1,56 ± 0,06	0,68 ± 0,03	1,71 ± 0,03	0,63 ± 0,01	2,08 ± 0,07	0,56 ± 0,01	2,17 ± 0,04	
Glutamato	1,29 ± 0,07	1,17 ± 0,08	1,04 ± 0,06	1,18 ± 0,16	0,86 ± 0,17	1,18 ± 0,07	0,87 ± 0,03	1,17 ± 0,11	0,90 ± 0,03	1,28 ± 0,05	0,78 ± 0,06	1,28 ± 0,02	0,74 ± 0,03	
Glutamina	0,50 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,04	0,67 ± 0,06	0,80 ± 0,00	0,74 ± 0,01	1,05 ± 0,11	0,86 ± 0,05	1,31 ± 0,03	0,85 ± 0,01	1,70 ± 0,02	0,90 ± 0,04	1,88 ± 0,08	

Continuação tabela suplementar 7. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 48 h de luz contínua. Dados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo da referência do tempo de coleta representam os períodos de noite subjetiva e de luz, respectivamente.

Metabólitos	Primeiro ciclo de 24h de luz contínua												
	0h	4h		8h		12h		16h		20h		24h	
	não tratadas	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
Histidina	1,01 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,03	1,47 $\pm$ 0,12	0,93 $\pm$ 0,04	2,16 $\pm$ 0,15	0,97 $\pm$ 0,02	2,76 $\pm$ 0,20	0,97 $\pm$ 0,05	2,88 $\pm$ 0,05
Homoserina	0,96 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,02	1,43 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,01	1,95 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,04	2,06 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,01	2,10 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,02
Idose	0,26 $\pm$ 0,00	0,78 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,01	1,40 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,03	1,53 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,03	1,67 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,05	1,99 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,00	2,08 $\pm$ 0,03
Isocitrato	0,49 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,03
Isoleucina	1,20 $\pm$ 0,13	0,68 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,01	2,18 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,05	3,20 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,02	4,65 $\pm$ 0,32	0,70 $\pm$ 0,02	6,16 $\pm$ 0,21	0,64 $\pm$ 0,01	6,50 $\pm$ 0,81
Leucina	1,10 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,06	1,17 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,02	2,19 $\pm$ 0,10	0,70 $\pm$ 0,04	2,97 $\pm$ 0,06	0,63 $\pm$ 0,03	4,54 $\pm$ 0,29	0,65 $\pm$ 0,02	6,14 $\pm$ 0,23	0,64 $\pm$ 0,00	6,40 $\pm$ 0,61
Lisina	1,11 $\pm$ 0,14	0,63 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,01	2,02 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,04	2,69 $\pm$ 0,10	0,54 $\pm$ 0,02	3,93 $\pm$ 0,21	0,49 $\pm$ 0,00	5,62 $\pm$ 0,16	0,48 $\pm$ 0,02	5,32 $\pm$ 0,27
Malato	0,78 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,07	1,09 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,05	1,49 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,01	1,57 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,04	1,55 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,00	1,43 $\pm$ 0,07
Maltose	2,36 $\pm$ 0,10	2,46 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,11	1,63 $\pm$ 0,15	0,94 $\pm$ 0,03	1,29 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,00	1,45 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,05	1,52 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,05
Metionina	0,76 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,01	1,28 $\pm$ 0,00	0,88 $\pm$ 0,03	1,36 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,03	1,32 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,03
Mio-Inositol	1,22 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,04
O-Acetilserina	1,51 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,03
Ornitina	6,88 $\pm$ 0,13	1,80 $\pm$ 0,16	1,51 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,07	0,64 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,09	1,12 $\pm$ 0,15	0,56 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,01
Ortofosfato	2,29 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,00	0,96 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,05
Piruvato	1,35 $\pm$ 0,07	1,41 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,04	1,28 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,02	1,28 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,00	1,08 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,05
Prolina	0,42 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,12	0,76 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,14	1,18 $\pm$ 0,04	1,36 $\pm$ 0,08	0,90 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,09
Putrescina	1,19 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,12	0,90 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,11	0,90 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,00	1,45 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,04	1,41 $\pm$ 0,09
Rafinose	1,06 $\pm$ 0,19	0,90 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,03	1,40 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,02	2,02 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,13	1,45 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,04	1,33 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,02	1,04 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,02
Sacarose	1,41 $\pm$ 0,05	1,42 $\pm$ 0,04	1,34 $\pm$ 0,08	1,15 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,08	1,31 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,03
Serina	1,17 $\pm$ 0,10	0,68 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,05	1,19 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,00
Succinato	1,23 $\pm$ 0,06	1,23 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,00
Tirosina	1,26 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,00	1,49 $\pm$ 0,09	0,73 $\pm$ 0,06	1,95 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,05	3,64 $\pm$ 0,16	1,01 $\pm$ 0,03	5,43 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,03	4,67 $\pm$ 0,38
Trealose	0,90 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,23	1,38 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,04
Treonina	0,85 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,01	1,18 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,00	1,29 $\pm$ 0,01
Triptofano	0,66 $\pm$ 0,00	0,85 $\pm$ NA	0,73 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,11	0,56 $\pm$ 0,10	0,53 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,12	1,83 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,06	1,74 $\pm$ 0,12
Valina	1,12 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,03	0,75 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,06	2,03 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,05	2,70 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,02	3,39 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,02	3,56 $\pm$ 0,21
Xilose Arabinose	1,46 $\pm$ 0,14	1,12 $\pm$ 0,00	1,01 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,03	1,07 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,04

Continuação tabela suplementar 7. Concentração de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 48 h de luz contínua. Dados são mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala log2 para medições de 5 pools (40 plântulas). Diferenças estatísticas significativas obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$), estão representados em negrito. As cores cinza e branca ao fundo da referência do tempo de coleta representam os períodos de noite subjetiva e de luz, respectivamente.

Metabólitos	Segundo ciclo de 24h de luz contínua											
	28h		32h		36h		40h		44h		48h	
	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
3-hidroxipiridina	1,36 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,15	0,96 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,04	1,05 $\pm$ 0,01	1,28 $\pm$ 0,13	1,12 $\pm$ 0,04	1,35 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,12	0,89 $\pm$ 0,06
4-Aminobutanoato	0,83 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,02	1,04 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,04	1,30 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 0,10	1,40 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,01	1,79 $\pm$ 0,18
5-Oxoprolina	1,03 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,03	1,26 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,14	0,84 $\pm$ 0,03	1,32 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,01
Agmatina	0,95 $\pm$ 0,07	1,09 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,03
Alanina	1,40 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,03	1,22 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,05	1,18 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,01	1,40 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,04
Arginina	1,09 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,00	1,25 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,00
Asparagina	0,83 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,00	1,61 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,06	1,59 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,18	0,98 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,06	1,73 $\pm$ 0,17
Aspartato	0,96 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,05
b-Alanina	0,79 $\pm$ 0,02	1,43 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,07	1,32 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,02	1,36 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,09	1,05 $\pm$ 0,05
Cis-Aconitato	0,81 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,21	1,04 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,15	1,18 $\pm$ 0,15	1,08 $\pm$ 0,09
Citramalato	0,93 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	1,23 $\pm$ 0,02	0,95 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,02	0,95 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,03	1,32 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,01	1,30 $\pm$ 0,02
Citrato	1,05 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 0,00	0,96 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,05	0,99 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,04	1,33 $\pm$ 0,12	1,11 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ NA
Citrulina	0,93 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,00	1,09 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,01	1,21 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,05	1,01 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,10	1,05 $\pm$ 0,05
Dehidroascorbato	0,95 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,18	1,06 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,00	1,04 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,03	1,22 $\pm$ 0,13	1,02 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,11
Eritritol	0,79 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,21	0,84 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,15	0,96 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,07	1,36 $\pm$ 0,34	1,14 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,02	1,22 $\pm$ 0,13	1,09 $\pm$ 0,14	1,13 $\pm$ 0,08
Fenilalanina	0,88 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,05	1,14 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,09	1,10 $\pm$ 0,05
Frutose	0,66 $\pm$ 0,06	1,60 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,02
Fumarato	0,43 $\pm$ 0,01	2,63 $\pm$ 0,33	0,57 $\pm$ 0,01	2,84 $\pm$ 0,25	0,68 $\pm$ 0,04	3,02 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,03	2,66 $\pm$ 0,16	0,71 $\pm$ 0,06	2,90 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,08	2,37 $\pm$ 0,09
Galactinol	1,08 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,03
Glc 6-P Gal 6-P	0,96 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,03	1,07 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,04
Glicerato	0,63 $\pm$ 0,00	1,09 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,05	1,38 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,09	1,47 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,07
Glicerol	0,93 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,10	0,76 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,17	0,74 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,00	0,82 $\pm$ 0,03	1,05 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,07
Glicerol 3-P	1,06 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,05	1,21 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,00	1,21 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,04
Glicina	1,67 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,05	1,50 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,02	1,46 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,02	1,37 $\pm$ 0,09	0,70 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,08	0,55 $\pm$ 0,03
Glicose	0,62 $\pm$ 0,04	2,08 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,02	1,93 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,02	2,32 $\pm$ 0,12	0,30 $\pm$ 0,01	1,89 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,02	2,27 $\pm$ 0,12	0,46 $\pm$ 0,01	2,14 $\pm$ 0,08
Glutamato	1,04 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,09	0,80 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,14	0,80 $\pm$ 0,08	1,31 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,08	0,90 $\pm$ 0,06
Glutamina	1,01 $\pm$ 0,08	2,34 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,05	2,20 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,05	2,91 $\pm$ 0,13	1,02 $\pm$ 0,09	2,11 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,03	2,61 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,08	3,07 $\pm$ 0,15

Continuação tabela suplementar 7. Concentração relativa de metabólitos obtidos por GC-TOF-MS de plântulas de Arabidopsis tratadas com AZD-8055 ou DMSO durante 48 h de luz contínua. Mediana dos valores relativos $\pm$ erro padrão na escala de log2 para medições de 5 pools (40 plântulas). Valores significativos obtidos pelo teste t-Student ($P < 0,05$) estão representados em negrito. As cores cinza claro e branca ao fundo da referência do tempo de coleta representam os períodos de noite subjetiva e de luz, respectivamente.

Metabólitos	Segundo ciclo de 24h de luz contínua											
	28h		32h		36h		40h		44h		48h	
	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD	DMSO	AZD
Histidina	0,80 $\pm$ 0,06	3,44 $\pm$ 0,32	0,98 $\pm$ 0,04	4,03 $\pm$ 0,25	0,97 $\pm$ 0,03	4,43 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,05	3,60 $\pm$ 0,17	1,03 $\pm$ 0,05	3,88 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,03	6,05 $\pm$ 0,20
Homoserina	2,21 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,03	2,33 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,02	2,56 $\pm$ 0,10	0,76 $\pm$ 0,04	2,26 $\pm$ 0,23	0,72 $\pm$ 0,03	2,26 $\pm$ 0,17	0,79 $\pm$ 0,07	1,82 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,03
Idose	0,64 $\pm$ 0,04	1,99 $\pm$ 0,13	0,48 $\pm$ 0,03	1,99 $\pm$ 0,13	0,24 $\pm$ 0,03	2,20 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,02	1,82 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,02	2,15 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,01	2,05 $\pm$ 0,08
Isocitrato	1,01 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,01	1,35 $\pm$ NA	0,96 $\pm$ 0,01	1,43 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,00	1,32 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,01	1,56 $\pm$ 0,04
Isoleucina	0,68 $\pm$ 0,03	6,51 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,01	5,29 $\pm$ 0,45	0,79 $\pm$ 0,01	5,72 $\pm$ 0,27	0,83 $\pm$ 0,01	5,93 $\pm$ 0,33	0,66 $\pm$ 0,03	6,55 $\pm$ 1,21	0,76 $\pm$ 0,04	5,18 $\pm$ 0,09
Leucina	0,67 $\pm$ 0,02	6,62 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,02	5,25 $\pm$ 0,43	0,66 $\pm$ 0,03	5,79 $\pm$ 0,35	0,67 $\pm$ 0,01	5,24 $\pm$ 0,17	0,63 $\pm$ 0,01	6,23 $\pm$ 1,13	0,77 $\pm$ 0,07	5,07 $\pm$ 0,14
Lisina	0,49 $\pm$ 0,02	5,71 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,02	4,84 $\pm$ 0,54	0,67 $\pm$ 0,02	5,81 $\pm$ 0,26	0,64 $\pm$ 0,04	4,74 $\pm$ 0,39	0,50 $\pm$ 0,01	6,08 $\pm$ 0,99	0,67 $\pm$ 0,03	5,37 $\pm$ 0,04
Malato	0,76 $\pm$ 0,05	1,75 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,10	0,89 $\pm$ 0,03	2,13 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,01	2,11 $\pm$ 0,16	0,87 $\pm$ 0,01	2,06 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,05	1,81 $\pm$ 0,07
Maltose	1,25 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,07	1,25 $\pm$ 0,18	0,83 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,02	1,24 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,18
Metionina	0,99 $\pm$ 0,03	1,43 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,03
Mio-Inositol	1,03 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,00	0,70 $\pm$ 0,00
O-Acetilserina	1,06 $\pm$ 0,15	0,92 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,01	1,03 $\pm$ 0,12	1,03 $\pm$ 0,03	1,36 $\pm$ 0,14	1,12 $\pm$ 0,06
Ornitina	0,70 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,09	1,31 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,02	1,30 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,08	1,53 $\pm$ 0,13	0,51 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,00
Ortofosfato	0,75 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,00	0,97 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,02
Piruvato	0,91 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,00	1,26 $\pm$ 0,09	0,72 $\pm$ 0,03	1,24 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,02
Prolina	1,80 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,02	1,99 $\pm$ 0,22	0,90 $\pm$ 0,09	1,76 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,09	1,97 $\pm$ 0,09	1,19 $\pm$ 0,15	1,80 $\pm$ 0,13	0,72 $\pm$ 0,06	2,16 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,05
Putrescina	0,81 $\pm$ 0,06	1,43 $\pm$ 0,16	0,76 $\pm$ 0,03	1,32 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,00	1,09 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 0,10	1,13 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,03
Rafinose	1,08 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,00	1,20 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,02
Sacarose	1,05 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,00	0,92 $\pm$ 0,07	0,44 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,00	1,34 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,03	1,49 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,01	1,32 $\pm$ 0,09	0,69 $\pm$ 0,05
Serina	0,96 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,03	1,32 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,01	1,38 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,01
Succinato	1,22 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,07	0,74 $\pm$ 0,03	1,14 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,03
Tirosina	0,74 $\pm$ 0,04	4,82 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,06	4,05 $\pm$ 0,17	0,81 $\pm$ 0,04	4,78 $\pm$ 0,12	0,92 $\pm$ 0,04	4,83 $\pm$ 0,26	0,88 $\pm$ 0,05	4,86 $\pm$ 0,70	0,90 $\pm$ 0,06	3,97 $\pm$ 0,01
Trealose	0,99 $\pm$ 0,00	0,91 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,18	1,32 $\pm$ 0,05	1,45 $\pm$ 0,29	0,97 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,08	1,44 $\pm$ 0,05	1,49 $\pm$ 0,02	1,63 $\pm$ 0,09	1,20 $\pm$ 0,03
Treonina	0,77 $\pm$ 0,03	1,48 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,04	1,52 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,04	1,55 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,02	1,51 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,02	1,50 $\pm$ 0,03
Triptofano	0,99 $\pm$ 0,03	2,20 $\pm$ 0,13	0,71 $\pm$ 0,09	1,75 $\pm$ 0,13	0,80 $\pm$ 0,05	2,22 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,03	2,87 $\pm$ 0,31	1,02 $\pm$ 0,03	3,11 $\pm$ 0,60	1,04 $\pm$ 0,08	2,25 $\pm$ 0,08
Valina	0,95 $\pm$ 0,02	3,60 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,01	3,18 $\pm$ 0,20	0,82 $\pm$ 0,01	3,59 $\pm$ 0,21	0,95 $\pm$ 0,01	3,54 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,04	3,80 $\pm$ 0,41	0,95 $\pm$ 0,04	3,45 $\pm$ 0,05
Xilose Arabinose	0,89 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,00

Tabela suplementar 8. Carregamento fatorial nas componentes 1 e 2. Valores responsáveis pelas separações estão representados em negrito e preenchido em cinza.

Metabólitos	PC1	PC2
4-Aminobutanoato/GABA	0,06	0,19
5-Oxoprolina	-0,09	0,10
Ácido isocitríco	-0,21	-0,20
Adenina	0,01	0,04
Agmatina	-0,02	0,07
Alanina	0,07	0,09
Arginina	0,07	0,03
Asparagina	-0,07	0,11
Aspartato	-0,03	0,02
b-Alanina	-0,10	0,06
Benzoato	0,08	0,05
Citrato	-0,12	0,18
Citrullina	0,04	0,01
Dehidroascorbato	-0,03	0,06
Espermidina	0,04	0,06
Fenilalanina	-0,18	0,06
Frutose	-0,10	-0,03
Fucose	-0,01	0,05
Fumarato	-0,22	-0,17
Galactinol	0,04	0,08
Gliceraldeído-3P	0,05	0,05
Glicerato	0,00	-0,17
Glicerol	0,09	0,06
Glicina	0,06	-0,44
Glicose	-0,24	-0,19
Glutamato	-0,01	0,03
Glutamina	-0,17	0,14
Homocisteína	-0,16	0,11
Idose	-0,01	-0,09
Isoleucina	-0,36	0,05
Leucina	-0,35	0,09
Lisina	-0,33	0,09
Malato	-0,14	-0,21
Maltose	0,04	0,31
Metionina	-0,11	0,01
Mio-Inositol	0,02	0,10
Nicotinato	0,06	0,04
O-Acetilserina	0,06	0,18
Ornitina	0,17	0,05
Ortofosfato	-0,03	0,10
Piruvato	0,08	0,04
Prolina	-0,06	0,04
Putrescina	-0,08	0,08
Rafinose	0,05	-0,14
Ramnose	-0,01	0,06
Sacarose	0,11	-0,03
Serina	-0,09	-0,19
Sinapato	0,03	0,06
Sorbose	-0,10	-0,36
Succinato	-0,01	0,06
Tiramina	0,03	0,05
Tirosina	-0,30	0,09
Trealose	0,02	0,05
Treonato	-0,01	0,02
Treonina	-0,18	-0,04
Triptofan	-0,15	0,09
Valina	-0,20	0,10
Xilose	-0,04	0,08

9. Anexos

9.1. Declaração de bioética e biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada ***"A importância da via "Target Of Rapamycin" na regulação do metabolismo primário vegetal ao longo do ciclo diuturno"***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Carolina Cassano Monte Bello
Nome do(a) aluno(a): Carolina Cassano Monte Bello

Assinatura: Camila Caldana
Nome do(a) orientador(a): Camila Caldana

Data: 08 de agosto de 2018

9.2. Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **A importância da via “Target Of Rapamycin” (TOR) na regulação do metabolismo primário vegetal ao longo do ciclo diurno**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 08 de agosto de 2018

Assinatura : Carolina Cassano Monte Bello
Nome do(a) autor(a): **Carolina Cassano Monte Bello**
RG n.º 434277897

Assinatura : Camila Caldana
Nome do(a) orientador(a): **Camila Caldana**
RG n.º 22606622-9