

JULIA DE PAIVA GONÇALVES

**PAPEL DA AUTOFAGIA NAS RESPOSTAS À ACIDEZ E AO FOTOPERÍODO EM
*Arabidopsis thaliana***

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

Orientador: Wagner Luiz Araújo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

G635p
2022
Gonçalves, Julia de Paiva, 1997-
Papel da autofagia nas respostas à acidez e ao fotoperíodo em
Arabidopsis thaliana / Julia de Paiva Gonçalves. - Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Luiz Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.571>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Ácido fumárico. 3. Regulação da
expressão gênica. 4. Ritmos circadianos. 5. Senescência. I. Araújo,
Wagner Luiz, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 583.64

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

JULIA DE PAIVA GONÇALVES

PAPÉL DA AUTOFAGIA NAS RESPOSTAS À ACIDEZ E AO FOTOPERÍODO EM
Arabidopsis thaliana


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

APROVADA: 23 de agosto de 2022

Assentimento:



Julia de Paiva Gonçalves
Autora



Wagner Luiz Araújo
Orientador

*A minha mãe pelo amor e apoio
incondicional durante toda essa caminhada.*
Com carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

A energia superior do Universo que rege todas coisas.

A minha mãe e aos meus irmãos pelo incentivo e apoio incondicional, com toda dedicação e amor, que me fez chegar até aqui.

Aos amigos que fiz em Viçosa, Welson, Bianca, Marcelle, Rita, Aristides, Jean, Cassio, Shel, Jefferson, João Pedro e Welder, pelos momentos de cumplicidade e parcerias, além das boas risadas e momentos de descontração.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação em um curso de excelente qualidade, que me agregou além de conhecimentos, valores.

Ao pessoal do laboratório por todo auxílio durante esses anos de mestrado, em especial Marcelle, Bianca, Dora, Rodrigo, Welson e Wesley, que me ajudaram nas análises laboratoriais, de suma importância para a realização desse trabalho.

Ao professor Wagner Araújo por me orientar de forma tão solícita e acreditar no meu trabalho, me dando a oportunidade de aprender e conviver com esse excelente profissional, que contribuiu tanto para minha vida profissional quanto pessoal.

Ao professor Adriano Nunes-Nesi, que de forma tão solícita sempre me apoiou e esteve sempre aberto a qualquer ajuda, tanto profissional quanto pessoal, esclarecendo dúvidas e incrementando informações para esse trabalho.

A doutora Jessica Barros, que me co-orientou ao longo de todo esse trabalho, transmitindo seu conhecimento e me ajudando com o esclarecimento dúvidas, sempre de forma solícita e pontual.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

RESUMO

GONÇALVES, Julia de Paiva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Papel da autofagia nas respostas à acidez e ao fotoperíodo em *Arabidopsis thaliana***. Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Devido à sua natureza sésil, as plantas são repetidamente submetidas a vários e distintos estresses ambientais. Tais estresses, ainda que moderados, são capazes de desencadear respostas prejudiciais ao crescimento vegetal causando perdas no rendimento produtivo. Em plantas submetidas a distintos estresses abióticos, a autofagia apresenta-se como um dos principais sistemas proteolíticos de atenuação dos danos. A autofagia é governada pelos denominados genes relacionados à autofagia (ATG), e está envolvida na degradação e reciclagem de constituintes citoplasmáticos, através de seu sequestro até o vacúolo. Neste trabalho, investigou-se como e em que extensão a autofagia participa das respostas (i) ao ambiente ácido e (ii) a flutuações no fotoperíodo. Para tanto, alterações fisiológicas e metabólicas ocasionadas pela deficiência do processo autofágico (mutantes *atgs*) em *Arabidopsis thaliana* submetidas a tais estresse foram avaliadas. Na primeira parte, observou-se que o gene ATG5 participa ativamente das respostas ao ambiente ácido e sua ausência culmina em danos oxidativos severos, quando comparado às plantas deficientes para o gene ATG7, que lidam de forma mais efetiva com o estresse ácido através do aumento da expressão da oxidase alternativa (AOX). Em conjunto, os resultados sugerem que o pH ácido do meio induz a senescência, principalmente em mutantes com deficiência do processo autofágico. Em síntese, a autofagia está aparentemente relacionada às respostas a condição ácida mediando a interrupção da senescência precoce. Na segunda parte deste trabalho, investigou-se como a autofagia participa na sincronização dos ritmos circadianos e sua relação com o metabolismo em resposta a flutuação no fotoperíodo (dias curtos e dias longos). De modo geral, a deficiência no processo autofágico levou à dessincronização do relógio circadiano, alterando o padrão de expressão de genes centrais envolvidos na regulação do ritmo circadiano em função da variação no fotoperíodo. Além disso, o fotoperíodo parece também coordenar a expressão de genes autofágicos, o que conseqüentemente ocasiona variações no metabolismo energético das plantas. Tomadas em conjunto, essas alterações metabólicas e moleculares culminam em

maiores níveis de clorofila e maior fotossíntese em dias longos que se traduzem em maior crescimento e área foliar, quando comparado aos dias curtos. Assim, a autofagia é importante na sincronicidade do relógio em relação ao crescimento da parte aérea das plantas. Coletivamente, os resultados obtidos indicam a significância da autofagia nas respostas ao estresse ácido bem como na modulação e ajuste dos ritmos circadianos em plantas. Trabalhos futuros serão ainda necessários para esclarecer como e em que extensão essa aparente reprogramação metabólica e molecular modula as respostas vegetais à acidez do solo em condições de flutuação no fotoperíodo.

Palavras-chave: Acidose; Fumarato; Regulação gênica; Ritmo circadiano; Senescência.

ABSTRACT

GONÇALVES, Julia de Paiva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022.
Role of autophagy in acidity and photoperiod responses in *Arabidopsis thaliana*.
Advisor: Wagner Luiz Araújo.

Due to their sessile nature, plants are repeatedly subjected to various and distinct environmental stresses. Such stresses, even if moderate, are capable to trigger deleterious responses to plant development, compromising yield. In plants subjected to different abiotic stresses, autophagy presents itself as one of the main proteolytic systems of damage attenuation. Autophagy is governed by the so-called autophagy-related genes (ATG) and is involved in the degradation and recycling of cytoplasmic constituents, through their sequestration to the vacuole. In this work, we investigated how and to what extent autophagy participates in responses (i) to an acidic environment and (ii) to fluctuations in photoperiod. To this end, physiological and metabolic changes caused by the deficiency of the autophagic process (*atgs* mutants) in *Arabidopsis thaliana* submitted to such stress were evaluated. In the first chapter, it was observed that the ATG5 gene actively participates in the responses to the acid environment, and its absence culminates in severe oxidative damage, when compared to plants deficient in the ATG7 gene, which deal more effectively with acid stress through increased alternative oxidase (AOX) expression. Taken together, the results suggest that acidic pH induces senescence, especially in mutants with a deficiency of the autophagic process. In summary, autophagy is apparently related to plant responses to an acid condition in the interruption of early senescence. In the second part of this work, we investigated how autophagy participates in the synchronization of circadian rhythms and its relationship with metabolism in response to photoperiod fluctuation (short days and long days). In general, the autophagy deficiency led to the desynchronization of the circadian clock, significantly altering the expression pattern of genes central involved in the regulation of the circadian rhythm in response to photoperiod variation. In addition, the photoperiod also seems to coordinate the expression of autophagic genes, which consequently causes variations in the energy metabolism of plants. Taken together, these metabolic and molecular changes culminate in higher chlorophyll levels and photosynthesis on long days that are translate into greater growth and leaf area compared to short days. Thus, autophagy

is most likely important in clock synchronicity in relation to plant shoot growth and development. Collectively, our results indicate the significance of autophagy in acid stress responses as well and in the modulation and adjustment of circadian rhythms in plants. Future work is still required to clarify how and to what extent this apparent metabolic and molecular reprogramming modulates plant responses to soil acidity under photoperiod fluctuation conditions.

Keywords: Acidosis. Circadian rhythm. Fumarate. Gene regulation. Senescence.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	12
Capítulo 1: A autofagia é um mecanismo chave envolvido na interrupção da senescência sob estresse ácido.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 Condições de crescimento e tratamento com pH.....	18
2.2 Avaliação da taxa de crescimento da raiz	19
2.3 Avaliação da massa fresca	19
2.4 Ensaios histoquímicos de ROS.....	19
2.5 Avaliação das taxas respiratórias em plântulas inteiras	20
2.6 Determinação de metabólitos.....	20
2.7 Expressão gênica.....	20
2.8 Delineamento experimental e análise estatística	21
3. RESULTADOS	23
3.1 Impactos do pH no crescimento radicular	23
3.2 Respiração mitocondrial é afetada pelo pH do meio	25
3.3 Variação no pH culmina em estresse oxidativo.....	25
3.4 Alterações metabólicas em resposta às variações no pH.....	26
3.5 Expressão de genes relacionados com autofagia em resposta a mudanças no pH do meio de cultivo.....	30
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37
Capítulo 2: Papel da autofagia na regulação do relógio circadiano central.	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1 Condições de crescimento e tratamento com fotoperíodo	46
2.2 Análises biométricas	47
2.3 Análises de trocas gasosas.....	47
2.4 Determinação de metabólitos.....	48
2.5 Expressão gênica.....	48

2.6 Delineamento experimental e análise estatística	50
3. RESULTADOS	50
3.1 Crescimento é afetado pela variação no fotoperíodo	50
3.2 A fotossíntese é afetada em resposta à diferentes fotoperíodos	52
3.4 Alterações metabólicas em resposta às variações no fotoperíodo	53
3.5 Expressão gênica é alterada em resposta ao fotoperíodo	58
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSOES	64
REFERÊNCIAS	66
6. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	68
6.1 Tabelas suplementares	68

INTRODUÇÃO GERAL

Devido a sua natureza sésstil, as plantas são constantemente submetidas a diferentes estresses ambientais, como seca, irradiância, toxicidade iônica etc (Avin-Wittenberg, 2019). Tais estresses, ainda que moderados, são capazes de desencadear respostas deletérias ao desenvolvimento vegetal causando prejuízos ao rendimento produtivo (Chen et al., 2021). Estima-se que aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis no mundo consistem em solos ácidos ($\text{pH} < 5,0-5,5$), que é capaz de causar deficiência nutricional, sendo o estresse ácido um limitante para o desenvolvimento das plantas nestes ambientes (Bian et al., 2013, Kochian et al. 2015; Siqueira et al., 2022).

Além disso, a quantidade e tempo de exposição a luz, também é capaz de afetar o desenvolvimento das plantas (Song et al., 2010). O fotoperíodo é a quantidade de luz (e escuridão) em um ciclo diário (~24 horas) que, normalmente, se mostra mais longo no verão e mais curto no inverno (Liu et al., 2021). Vantagens seletivas são usualmente observadas em plantas que adquiriram mecanismos que lhes permitem detectar diferenças sazonais associadas às mudanças no fotoperíodo, sendo tais plantas capazes de programar sua reprodução para a primavera, onde as condições ambientais são mais favoráveis (Hayama & Coupland, 2004, Jackson, 2009, Song et al., 2010, Liu et al., 2021).

Em plantas submetidas a distintos estresses abióticos, a autofagia apresenta-se como um dos principais sistemas proteolíticos de atenuação de danos (Avin-Wittenberg, 2019; Chen et al., 2021). A autofagia é uma das principais vias de degradação celular que está envolvida na degradação e reciclagem de constituintes citoplasmáticos em metabólitos primários (Batoko et al., 2017). O mecanismo autofágico é governado pelos genes relacionados à autofagia (denominados ATG), altamente conservados entre eucariotos (Bassham, 2015; Wang et al., 2018; Barros et al., 2021).

Já foi demonstrado que a autofagia está relacionada a maior sobrevivência de células humanas quando submetidas a estresse ácido ($\text{pH} \leq 6$), em relação a remobilização de componentes celulares quando em déficit nutricional (Wojtkowiak et al., 2012). O mesmo papel foi associado a autofagia em resposta as plantas submetidas a déficit nutricional em diferentes fotoperíodos (Izumi et al., 2013). Com isso, buscou-se investigar como a autofagia se relaciona a resposta ao estresse ácido

e a diferentes fotoperíodos em plantas, uma vez que, essa relação se encontra incipiente e fragmentada na literatura atual.

REFERÊNCIAS

Avin-Wittenberg T (2019) Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell Environment* **42**: 1045-1053.

Barros JAS, Magen S, Lapidot-Cohen T, Rosental L, Brotman Y, Araújo WL, Avin-Wittenberg T (2021) Autophagy is required for lipid homeostasis during dark-induced senescence. *Plant Physiology* **185**: 1542-1558.

Bassham DC (2015) Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods* **75**: 181-188.

Batoko H, Dagdas Y, Baluska F, Sirko A (2017) Understanding and exploiting autophagy signaling in plants. *Essays Biochemistry* **61**: 675-685.

Bian M, Zhou M, Sun D, Li C (2013) Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. *The Crop Journal* **1**: 91-104.

Chen H, Dong J, Wang T (2021) Autophagy in plant abiotic stress management. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 4075.

Hayama R, Coupland G (2004) The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* **135**: 677-684.

Izumi M, Hidema J, Makino A, Ishida H (2013) Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**: 1682-1693.

Jackson SD (2009) Plant responses to photoperiod. *New Phytologist* **181**: 517-531.

Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhaes JV (2015) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology* **11**: 1-28.

Siqueira JA, Wakin T, Batista-Silva W, Silva JCF, Vicente MH, Silva JC, Clarindo WR, Zsögön A, Peres LEP, Veylder L, Fernie AR, Nunes-Nesi A, Araújo WL. (2022) A long and stressful day: Photoperiod shapes aluminium tolerance in plants. *Journal of Hazardous Materials* **432**: 128704.

Song YH, Ito S, Imaizumi T (2010) Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 594-603.

Wang P, Mugume Y, Bassham DC (2018) New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **80**: 113-122.

Wojtkowiak JW, Rothberg JM, Kumar V, Schramm KJ, Haller E, Proemsey JB, Lloyd MC, Sloane BF, Gillies RJ (2012) Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. *Cancer Research* **72**: 3938-3947.

Capítulo 1: A autofagia é um mecanismo chave envolvido na interrupção da senescência sob estresse ácido.

RESUMO

O estresse ácido é um grande limitante do desenvolvimento das plantas. Com efeito, este impacto é causado pelo aumento de prótons H^+ no solo que promove como consequência, distúrbio nutricional, toxidez por alumínio e manganês, lixiviação, mudanças metabólicas, além de raízes superficiais pela baixa disponibilidade de cálcio (Ca^{2+}). Em plantas submetidas a distintos estresses abióticos, a autofagia apresenta-se como um dos principais sistemas proteolíticos de atenuação de danos. A autofagia é governada por genes relacionados à autofagia (denominados ATG) e está envolvida na degradação e reciclagem de constituintes citoplasmáticos, através de seu sequestro até o vacúolo. Apesar de já ter sido demonstrado que a autofagia participa das repostas ao ambiente ácido em células humanas, pouco se sabe sobre a participação da autofagia nas repostas ao ambiente ácido em plantas. Os resultados aqui obtidos sugerem que, em plantas, o gene ATG5 participa ativamente das repostas ao ambiente ácido (pH 4,0), e sua ausência culmina em danos oxidativos, quando comparado às plantas deficientes no gene ATG7, que lidam de forma mais efetiva com o estresse ácido por, dentre outras repostas, um aumento da expressão de AOX (oxidase alternativa). O fumarato, que desempenha papel de controle do pH para assimilação de nitrato, parece estar relacionado com a manutenção do comprimento das raízes e o particionamento de biomassa, bem como funciona como uma reserva de carbono, ainda que temporária, para a síntese de amido. De modo interessante, o ambiente ácido ocasionou a diminuição do conteúdo de clorofilas e, ao mesmo tempo, um aumento significativo de açúcares solúveis nos mutantes deficientes na autofagia (*atg5-1* e *atg7-2*). Em conjunto, os resultados aqui obtidos sugerem que o pH ácido (pH4,0) induz a senescência, principalmente em plantas mutantes com deficiência do processo autofágico. É plausível sugerir que a autofagia esteja associada às repostas a condição ácida mediando, via ajustes metabólicos e moleculares, a interrupção da senescência precoce em *Arabidopsis thaliana*.

Palavras-chave: Acidose; Autofagia; Fumarato; Senescência.

1. INTRODUÇÃO

Devido à sua natureza séssil, as plantas são repetidamente submetidas a vários estresses ambientais, como seca, irradiância, toxicidade iônica, etc. (Avin-Wittenberg, 2019). Tais estresses, ainda que moderados, são capazes de desencadear respostas deletérias ao desenvolvimento vegetal causando prejuízos ao rendimento produtivo (Chen et al., 2021). Com efeito, o estresse ácido é amplamente descrito como um grande limitante do desenvolvimento das plantas (Shavrukov & Hirai, 2015). Estima-se que aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis no mundo consistem em solos ácidos (pH <5,0-5,5), tornando-se áreas inviáveis para agricultura por perdas significativas no rendimento das culturas atribuídas à acidez (Bian et al., 2013, Kochian et al. 2015; Siqueira et al., 2022). Alguns fatores têm contribuído com a acidificação dos solos incluindo a industrialização intensiva produzindo poluentes ácidos, o uso de fertilizantes contendo amônio na agricultura e poluentes atmosféricos que causam chuvas ácidas (Shavrukov & Hirai, 2015).

O estresse ácido é causado pelo aumento de prótons H^+ no solo que promove, como consequência, distúrbio nutricional pela menor disponibilidade de fósforo (P), cálcio (Ca), ferro (Fe) e magnésio (Mg) (Kidd & Proctor, 2001). Com efeito, em solos ácidos a toxidez por alumínio (Al) e manganês (Mn) é exacerbada junto com o aumento da lixiviação, que diminui a disponibilidade de nutrientes para as plantas, afetando sua sobrevivência (Bian et al., 2013; Bojórquez-Quintal et al. 2017; Kidd & Proctor, 2001). Cabe mencionar também que solos ácidos podem promover mudanças na atividade metabólica e na composição dos exsudatos radiculares (Schmitt et al., 2016). Em adição, em solos ácidos, as plantas apresentam raízes mais superficiais, pela baixa disponibilidade de Ca^{2+} , que é necessário para o crescimento e alongamento das raízes e, em última instância, levam à inibição da penetração de raízes no solo. Tomadas em conjunto, tais informações indicam que há uma menor utilização de nutrientes e água presentes no subsolo, aumentando o risco de deficiência nutricional e hídrica em solos ácidos (Kidd & Proctor, 2001).

Cumprе mencionar que tais desequilíbrios iônicos podem ser driblados por respostas, em sua maioria transcricionais, desencadeadas pelo baixo pH do solo (Tsai & Schmidt, 2021). Algumas dessas respostas compreendem (i) alterações na rizosfera na tentativa de aumento do pH ao redor das raízes; (ii) exsudação de ácidos orgânicos para quelação do Al que se encontra na sua forma tóxica prejudicando o

desenvolvimento das raízes e, por fim, (iii) aumento da área superficial das raízes via micorrizas (Nunes-Nesi et al., 2014). Com efeito, a correção do solo por técnicas como calagem não é, aparentemente, eficaz para a maioria das culturas (Marschner et al., 1995; Bian et al., 2013). Portanto, é de suma importância compreender os mecanismos de resposta e adaptação de plantas frente a condições de estresse por acidez do solo (Schmitt et al., 2016).

Em plantas submetidas a distintos estresses abióticos, a autofagia apresenta-se como um dos principais sistemas proteolíticos de atenuação de danos (Avin-Wittenberg, 2019; Chen et al., 2021). A autofagia é uma das principais vias de degradação celular que está envolvida na degradação e reciclagem de constituintes citoplasmáticos em metabólitos primários (Batoko et al., 2017). O mecanismo autofágico é governado pelos genes relacionados à autofagia (denominados ATG), altamente conservados entre eucariotos (Bassham, 2015; Wang et al., 2018; Barros et al., 2021). O processo autofágico medeia o sequestro e transporte de organelas e proteínas danificadas para a sua degradação no vacúolo (Bassham et al., 2006; Liu et al., 2009; Yoshimoto et al., 2010). Cabe ressaltar que a autofagia não é apenas um sistema de reciclagem generalizada, podendo apresentar também como alvos organelas específicas, complexos e agregados de proteínas (Üstü et al., 2017; Marshall e Vierstra, 2018), sendo, portanto, de suma importância, particularmente em resposta a uma gama de estresses.

Mais de 30 ATGs já foram identificados em levedura, a maioria dos quais possui homólogos em plantas incluindo *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e também em *Chlamydomonas reinhardtii* (Yoshimoto, 2015; Zeng et al., 2017). Até o momento, três tipos distintos de autofagia foram descritos em plantas: (i) microautofagia, mecanismo mediado pelo sequestro direto de componentes citoplasmáticos por invaginação do tonoplasto; (ii) macroautofagia, que consiste na degradação de componentes citoplasmáticos através do autofagossomo para o vacúolo, e (iii) megaautofagia, forma mais extrema da autofagia, na qual o tonoplasto se permeabiliza ou se rompe liberando hidrolases vacuolares diretamente no citoplasma e que representa o estágio final da morte celular programada (PCD) (Yoshimoto et al., 2010; Marshall & Vierstra, 2018; Qi et al., 2021).

A macroautofagia, denominada usualmente de autofagia, é a forma mais estudada em plantas sendo transcricionalmente regulada em resposta a diversos estresses abióticos e déficit de nutrientes (Mitou et al., 2009). O processo autofágico

inicia-se com a montagem do complexo envolvendo ATG1-ATG13, que é negativamente regulado por Target of rapamycin (TOR), através da fosforilação do complexo (Wang et al., 2018). O complexo ATG1 -ATG13 estimula a mobilização de lipídios ao fagóforo em expansão, que é mediado pela proteína transmembrana ATG9, em conjunto com as proteínas ATG2 e ATG18 (Chen et al., 2019). Com efeito, a expansão da membrana do autofagossomo é dependente de dois sistemas de conjugação que atuam de modo similar ao processo de ubiquitinação (Chen et al., 2019). Neste contexto, ATG12 é conjugado em um complexo com ATG5 e ATG16, ao passo que ATG8 é processado pela protease ATG4 expondo uma glicina C-terminal (Mitou et al., 2009). Cumpre ressaltar que ambos os processos são ativados por ATG7 (Chen et al., 2019). Em adição, o complexo ATG12-ATG5 promove o processamento de ATG8 com o lipídeo Fosfatidiletanolamina (PE) e sua ancoragem na membrana do fagóforo (Marshall & Vierstra, 2018). Uma vez revestidos com ATG8, os autofagossomos são transportados para o vacúolo usando, possivelmente, a rede de microtúbulos (Bassham, 2006).

A autofagia, processo extremamente dinâmico, atua não apenas durante distintos estágios de desenvolvimento e senescência, mas também em resposta à infecção por patógenos ou diversos estresses ambientais e, dessa forma, desempenha papéis importantes no desenvolvimento, metabolismo em geral e tolerância a estresses vários em plantas (Shin et al., 2009; Haxim et al.; Zeng et al., 2017; Wang et al., 2018). Cabe mencionar também que, em resposta a vários estresses abióticos, a autofagia é ativada e, dessa forma, plantas deficientes em autofagia exibem geralmente senescência acelerada e são, usualmente, mais suscetíveis a tais condições (Ren et al. 2015; Avin-Wittenberg, 2019).

Em células humanas, a autofagia é um mecanismo de sobrevivência da célula quando esta é submetida ao meio com pH ácido ($\text{pH} \leq 6$) (Wojtkowiak et al., 2012). Em ambiente ácido há um aumento da expressão do gene ATG5, demonstrando que autofagia aumenta seus níveis basais atuando de forma a beneficiar a perpetuação celular (Wojtkowiak & Gillies, 2012; Ren et al., 2015). Ainda assim, pouco ou quase nada, se tem de informação se a autofagia também está relacionada as respostas das plantas a ambientes ácidos.

Com efeito, o meristema da raiz sofre com a toxicidade do pH (Hinsinger et al., 2003; Pacifici et al., 2018; Szurman-Zubrzycka et al., 2021). Cabe mencionar também que o potencial da autofagia na regulação da atividade e manutenção do crescimento

radicular foi recentemente demonstrado em plantas de *Arabidopsis* deficientes em autofagia (Huang et al., 2019). Tal estudo demonstrou que a autofagia, contribui para a manutenção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e auxina nas raízes, modulando a função dos peroxissomos em resposta à alta concentração de glicose, o que garante, em última instância, a atividade do meristema e o alongamento radicular (Huang et al., 2019).

Tomadas em conjunto, as evidências acima sugerem um importante papel da autofagia nas respostas a estresses abióticos vários (Wojtkowiak & Gillies, 2012; Wojtkowiak et al., 2012; Xu et al., 2020). Apesar de potencialmente atuar na supressão de danos oxidativos, o conhecimento acerca da significância da autofagia na modulação das respostas ao pH em plantas é ainda bastante incipiente e fragmentado. Assim, buscou-se investigar o papel da autofagia no controle dos danos radiculares acarretados pela exposição ao pH ácido a partir da caracterização das alterações fisiológicas e metabólicas ocasionadas pela deficiência do processo autofágico em mutantes *atgs* submetidos a este estresse.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições de crescimento e tratamento com pH

Foram utilizadas plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (Colombia-0) e mutantes para o processo autofágico (Tabela 1). Sementes foram esterilizadas em 1 mL de etanol 70% (v/v) por 1 minuto e, em seguida, em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 15 minutos. Todo o resíduo de hipoclorito de sódio foi removido por sucessivas lavagens (6x) em água estéril. Após a desinfestação, as sementes foram mantidas a 4°C por 48h e distribuídas em placas de Petri estéreis contendo meio de cultivo ½ MS (Murashige e Skoog, 1962), em pH 5,7 (controle) e em pH 4,0 ajustado com 1M KOH. As placas foram, então, mantidas durante 10 dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas luz: 12 horas escuro, temperatura de 22 °C durante o período luminoso e 20 °C no período de escuro, com umidade relativa de 60% e irradiância a 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 1. Descrição dos genótipos utilizados no presente trabalho.

Genótipos	Linhagem	Ecótipo	Referência
<i>atg 5-1</i>	SAIL	Columbia 0	Hanoaka et al., 2002
<i>atg 7-2</i>	GK	Columbia 0	Hofius et al., 2009
WT	-	Columbia 0	-

O material vegetal (planta inteira) foi coletado após 10 dias nos diferentes tratamentos (pH 5,7 e pH 4,0), imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até análises posteriores. Foram coletadas e combinadas 10 plantas presentes em uma placa, gerando uma amostra composta por repetição, em um total de cinco repetições. Experimentos independentes foram realizados para coleta de material vegetal para metabolismo e expressão gênica, respiração radicular e testes histoquímicos para identificação de ROS.

2.2 Avaliação da taxa de crescimento da raiz

As taxas de crescimento das raízes foram analisadas em plantas crescendo em placas de Petri (placas de ágar) conforme anteriormente descrito (Zhu et al., 2012), em um intervalo de 10 dias após o período de vernalização e transferência das placas para luz. Após este período, as placas foram escaneadas (HP Scanjet G2410 Flatbed Scanner) e o comprimento das raízes foi obtido com o auxílio do software ImageJ.

2.3 Avaliação da massa fresca

A massa fresca das plântulas inteiras foi analisada através de rápida coleta e pesagem após 10 dias da transferência das placas para luz, crescidas nas condições anteriormente descritas. Posteriormente, as plântulas, foram armazenadas à -80°C até análises posteriores.

2.4 Ensaio histoquímico de ROS

A avaliação qualitativa de ROS nas raízes foi realizada por teste histoquímico para peróxido (H_2O_2) e superóxido (O_2^-) como descrito anteriormente por Kong et al. (2011) com um tempo de exposição para 3,3'Diaminobenzidina (DAB) de 3h e Nitrobluetetrazolium (NBT) de 40 min. A identificação de H_2O_2 e O_2^- foi realizada utilizando $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ de DAB, e $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NBT, respectivamente. As amostras foram lavadas 3x com água destilada, clareadas com etanol 70% por 10 min e as

raízes observadas usando estereomicroscópio (Zeiss modelo Stemi 2000-C). As fotos foram analisadas com o auxílio do software ImageJ.

2.5 Avaliação das taxas respiratórias em plântulas inteiras

As taxas de consumo de oxigênio (O_2) foram avaliadas utilizando-se um eletrodo de oxigênio do tipo Clark, conforme descrito por Jiang et al. (2019). Antes de se mensurar as taxas respiratórias, o peso fresco das plântulas foi obtido e, em seguida, as mesmas foram incubadas em tampão contendo 50 mM de HEPES (*N*-(2-hidroxi-etil) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico), 10 mM de MES (ácido 2-*N*-morfolinoetanossulfônico) (pH 6,6) e 0,2 mM de $CaCl_2$. Para evitar a interferência da luz as medições foram feitas no escuro por 20 minutos. A taxa de consumo de O_2 foi calculada assumindo-se que a concentração de O_2 no tampão saturado de ar era de 260 μ M a 23°C.

2.6 Determinação de metabólitos

Amostras foram homogeneizadas, e submetidas à extração metanólica. Em síntese, foram adicionados 400 μ L de metanol a amostra seguido de agitação (750 rpm) a 80°C por 20 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado do precipitado. Ao sobrenadante foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (99,9%) e 430 μ L de água mili-Q. As amostras foram centrifugadas e a fase aquosa foi separada para análises futuras. Na fração solúvel foram determinados os teores de clorofilas (Sulpice et al., 2009), glicose, frutose e sacarose (Ferne et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (Cross et al., 2006), malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007). Na fração insolúvel, os teores de amido (Ferne et al., 2001) e proteínas (Bradford, 1976) foram determinados.

2.7 Expressão gênica

A análise quantitativa de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada com RNA total isolado de plantas inteiras. A extração do RNA foi realizada com TRizol® (Ambion, Life Technology) seguindo o manual do fabricante. A integridade do RNA foi verificada em géis de agarose a 1% (p/v) e a concentração foi medida antes e após a digestão com DNase I usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (<http://www.nanodrop.com/>). A digestão com DNase I (Ambion; <http://www.ambion.com/>) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total usando a transcriptase reversa

SuperScript III (Invitrogen; <http://www.invitrogen.com/>) de acordo com as instruções do fabricante. PCR quantitativa foi realizada utilizando o kit Power Syber Green, master mix. As amostras foram amplificadas segundo o programa: 94 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 56 °C por 15 s e 72 °C por 15 s. Para confirmar a presença de um único produto de amplificação, específico para cada reação, uma curva de desnaturação foi realizada imediatamente após a amplificação. As leituras foram realizadas no equipamento Applied Biosystem StepOnePlus™ Software v2.0. Os níveis de expressão foram determinados pelo método comparativo do CT (Threshold Cycle), segundo Schmittgen e Livak (2008). EF1a e F-Box foram usados como genes referência, os genes avaliados e seus respectivos primers estão descritos na Tabela 2.

2.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizados composto de dois níveis de pH (pH 5,7 e pH 4,0) com cinco repetições. Cada unidade experimental foi composta por dez plantas. A normalidade e homocedasticidade dos dados foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, ambos a 0,05 de probabilidade. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do teste F ($P \leq 0,05$). Quando significativas, as características foram submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$). Toda a análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software R (R Development Core Team, 2019).

Tabela 2. Genes selecionados para análises de expressão em mutantes atgs submetidas ao pH ácido.

Gene	Locus	Descrição	“Primer Forward”	“Primer Reverse”
EF1a	At1g18070	Fator de alongamento de tradução EF1a (Constitutivo)	TGGTTGTTATGCCGAACAAGGAAC	AAATTCTCACCCGGTCCTGCAC
F-BOX	At5g15710	Proteína da família F-BOX (Constitutivo)	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA
ATG2	At3g19190.1	Processo Autofágico	AAGGGAGTCCAAAGAGGGACTG	AACACCGAGTCCAACAGCTTCC
ATG5	At3g51830.1	Processo Autofágico	GTGGCTGGACAAGTTAAGACAGC	ACGAGATGTCATCCCAGGTATCG
ATG7	At5g45900	Processo Autofágico	ACGTGGTTGCACCTCAGGATTC	ACTAAGAGTTCAACGGCGAGAGC
AOX1	At1g32350	Redução de ROS na mitocôndria	GCCTACCGATTTGTTCTTCCAGAG	CGTCGAAGCGATTTGCAGTGTAG
EXP7	At4g01630	Expansão de parede celular	TCTGCTGGTTGGTTGCAAGC	AAGCTCCACCCATTGTACCAG
PGIP1	At5g06860.1	Estabilizadora de parede celular	CAACCTGGTCTATTGACTTATC	GAAGAACTGAAGAGGAGCTTCA
AKT1	At2g26650	Transportador de K ⁺	ACATGCTTCGTCTTTGGCGTCTTC	AGTTGCGGTCTTTCTCTAGTCTGG

3. RESULTADOS

3.1 Impactos do pH no crescimento radicular

Com o intuito de avaliar o efeito da deficiência da autofagia no crescimento das raízes em pH ácido, foram comparadas mutantes *atgs* (deficientes para autofagia) e plantas do tipo selvagem (WT) crescidas em condições ótimas de pH (5,7) e em pH ácido (4,0). Ao avaliar o comprimento da raiz, pode-se observar que o pH limitou o desenvolvimento radicular em plantas WT quando comparado a condição ótima de pH (5,7), diferentemente das linhas mutantes onde não foi observado diferença significativa quando comparado os pHs (Figura 1 e Figura 2). De modo geral, as linhas mutantes (*atg5-1* e *atg7-2*) foram menos afetadas pela acidificação do meio de crescimento que plantas WT (Figura 2). Registre-se, também, que em WT há uma tendência ao aumento de acúmulo de massa fresca total em ambiente ácido, quando comparado ao pH ótimo. Em condições ácidas, mutantes *atg5-1* e *atg7-2* apresentaram menor massa fresca em relação a WT.

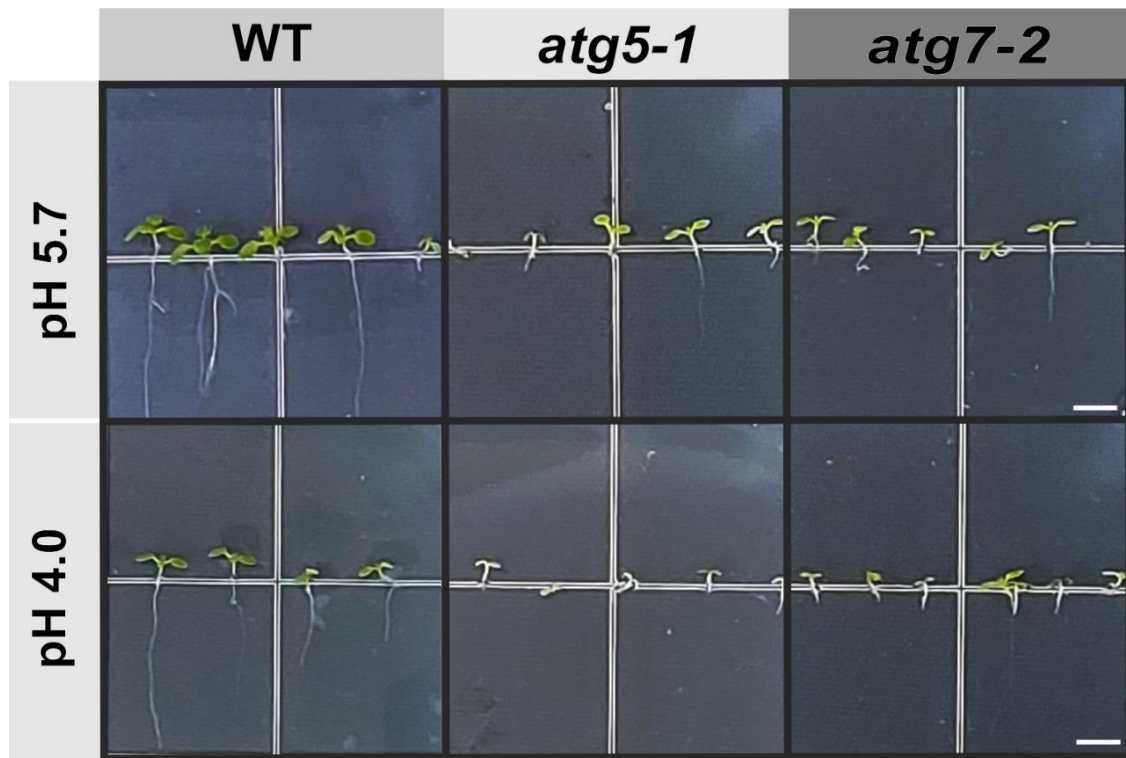


Figura 1. Imagens representativas de plântulas de *A. thaliana* com 10 dias de idade, após serem cultivadas em pH 5,7 e 4. Foram comparadas o tipo selvagem (WT) e mutantes *atg5-1* e *atg7-2* que possuem deficiência do fluxo autofágico. Barras de escala em branco representam 5mm.

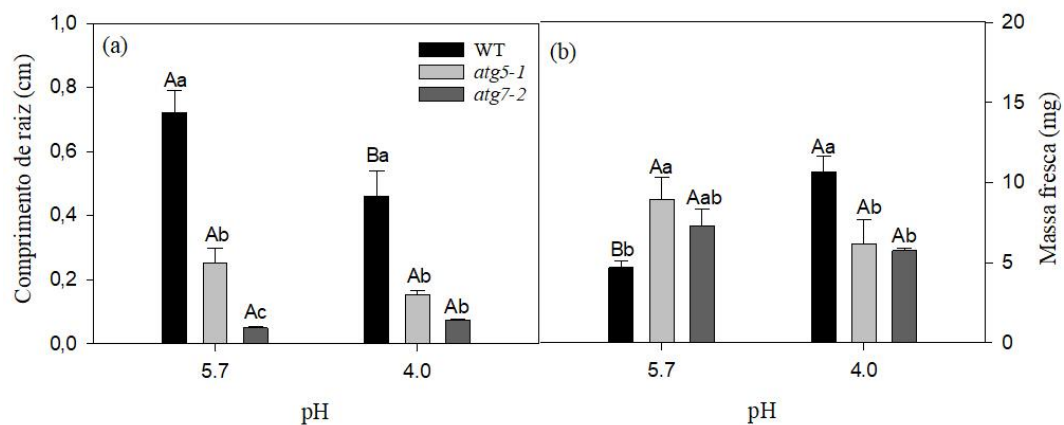


Figura 2. Crescimento radicular e massa fresca total de plântulas de *A. thaliana* com deficiência no fluxo autofágico (*atgs*) são afetados pelo pH do meio de cultivo. Comprimento radicular (a) e massa fresca total de plântulas (b) foram avaliados após um período de 10 dias de cultivo em pH 5,7 e 4. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas simples comparam genótipos sob diferentes condições de pH, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento de pH. As barras verticais representam o erro padrão de cinco repetições, cada uma com dez plântulas por genótipo.

3.2 Respiração mitocondrial é afetada pelo pH do meio

Com o intuito de avaliar o efeito da deficiência do fluxo autofágico sob a atividade respiratória em resposta à variação do pH, o consumo de O₂ foi avaliado. Em condições ótimas de crescimento (pH 5,7), a deficiência da autofagia afeta negativamente a respiração das plântulas na fase inicial de desenvolvimento, uma vez que, mutantes *atg* apresentam menor consumo de O₂ do que WT (Figura 3). Verificou-se, também, que o pH ácido reduziu o consumo de O₂ em plântulas WT, de forma significativa (Figura 3), embora não tenha afetado da mesma forma as linhagens mutantes (*atgs*), as quais não apresentaram diferenças entre os tratamentos (pH 5,7 e 4) e nem entre si dentro do mesmo tratamento.

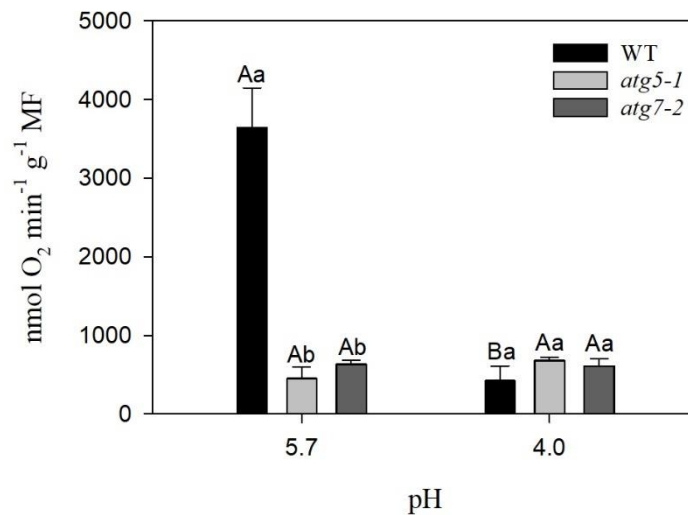


Figura 3. Consumo de O₂ em plantas de *A. thaliana* em resposta a variações no pH. Plantas do tipo selvagem (WT) e mutantes *atg* foram cultivadas por um período de 10 dias em pH 5,7 e 4. MF: matéria fresca. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam genótipos sob diferentes condições de pH, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento de pH. As barras verticais representam o erro padrão de cinco repetições, cada uma com dez plântulas por genótipo.

3.3 Variação no pH culmina em estresse oxidativo

Ensaio histoquímico por coloração diferencial com DAB e NBT foram utilizados para avaliar qualitativamente os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O₂⁻), respectivamente, em resposta à variação no pH do meio de cultivo. Independente do pH, plantas mutantes *atg5-1* e *atg7-2* apresentaram uma coloração mais intensa nos seus ápices radiculares tanto para DAB quanto para NBT, quando comparado aos ápices radiculares das plântulas WT (Figura 4). Tais resultados

indicam que a deficiência da autofagia pode, até certo ponto, ocasionar acúmulo de ROS nos ápices radiculares. Foi também observado que, independentemente do genótipo, há um maior acúmulo de (O_2^-) nas pontas das raízes em pH 4 (Figura 4). Ao compararmos os genótipos entre si, nos diferentes tratamentos (pH 5,7 e 4), foi observado que plântulas submetidas a um meio ácido, são caracterizadas por um acúmulo de ROS, tanto na parte aérea quanto nas raízes. Constata-se assim que o pH ácido influenciou no maior incremento de ROS em todos os genótipos avaliados.

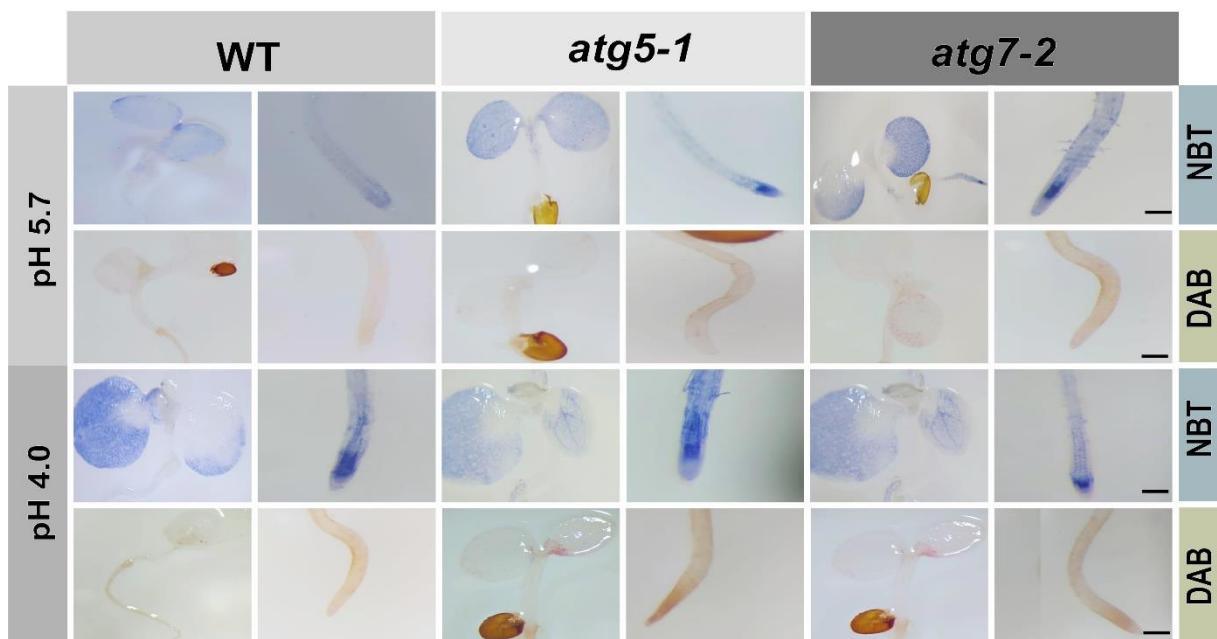


Figura 4. Ensaio histoquímico de espécies reativas de oxigênio (ROS) em função da variação do pH em *A. thaliana*. Foram utilizadas plântulas do tipo selvagem (WT) e com mutação para deficiência do processo autofágico (*atg5-1* e *atg7-2*). Imagens de O_2^- (barra superior – NBT) e H_2O_2 (barra inferior – DAB) obtidas em plantas expostas ao estresse ácido (pH 4,0) por dez dias. As plantas tratadas foram comparadas com o respectivo controle (pH 5,7) no mesmo momento. Barras de escala representam 1 mm. Abreviaturas: DAB, tetracloridrato de diaminobenzidina; NBT, nitroazul tetrazólio.

3.4 Alterações metabólicas em resposta às variações no pH

Para investigar como a autofagia participa nas respostas metabólicas de plântulas submetidas ao pH ácido, foram avaliados compostos relacionados ao metabolismo do nitrogênio, açúcares e compostos fotossintéticos. Foram observadas reduções nos teores de clorofilas totais em pH 4 (Figura 5). Ao se avaliar os genótipos, *atg5-1* tende a apresentar valores mais baixos de carotenoides (Figura 5^a) e clorofila total (Figura 5b) quando comparado ao tipo selvagem e o mutante *atg7-2* em pH 5,7.

Em contraste, nenhuma diferença entre genótipos foi observada para esses dois parâmetros em pH 4 (Figura 5).

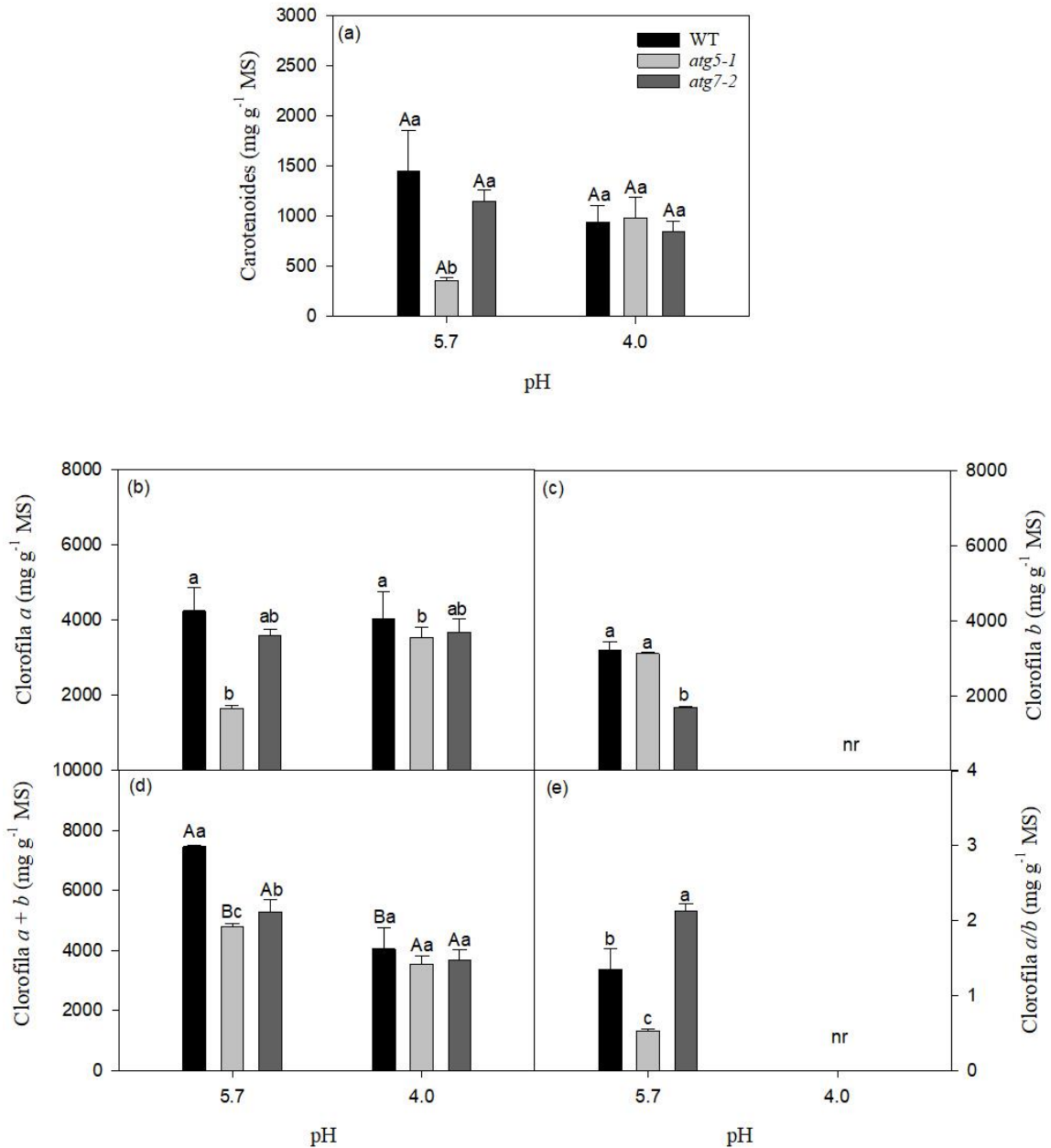


Figura 5. Níveis de pigmentos fotossintéticos em plantas de *A. thaliana* em resposta a variações no pH do meio de cultivo. Plantas do tipo selvagem (WT) e com deficiência no fluxo autofágico foram cultivadas por um período de 10 dias em pH 5,7 e 4. Foram avaliadas: (a) carotenoides; (b) clorofila a; (c) clorofila b; (d) clorofila a+b; (e) clorofila a/b. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam genótipos sob diferentes condições de pH, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento de pH. As barras verticais representam o erro padrão de cinco repetições, cada uma com dez plântulas por genótipo. Nr: não representativo.

Em relação aos compostos associados ao metabolismo do carbono, nota-se uma diminuição significativa em glicose (Figura 6^a), frutose (Figura 6b) e sacarose (Figura 6c) em plantas WT em pH 4 comparadas ao pH 5.7. De modo diferente, embora mutantes *atg7-2* apresentaram aumentos significativos nos níveis de glicose (Figura 6^a) e frutose (Figura 6b) em pH 4, mutantes *atg5-1* não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e nem em relação ao tipo selvagem (WT) no conteúdo de glicose (Figuras 6^a). Referente ao conteúdo de frutose, *atg5-1* apresenta um aumento em relação a WT em meio ácido, e também quando comparamos diferentes pHs, resultado este não tão acentuado quanto os observados no mutante *atg7-2* (Figura 6b). Em relação aos conteúdos de sacarose (Figura 6c) e amido (Figura 6d), não se observaram diferenças significativas entre os genótipos.

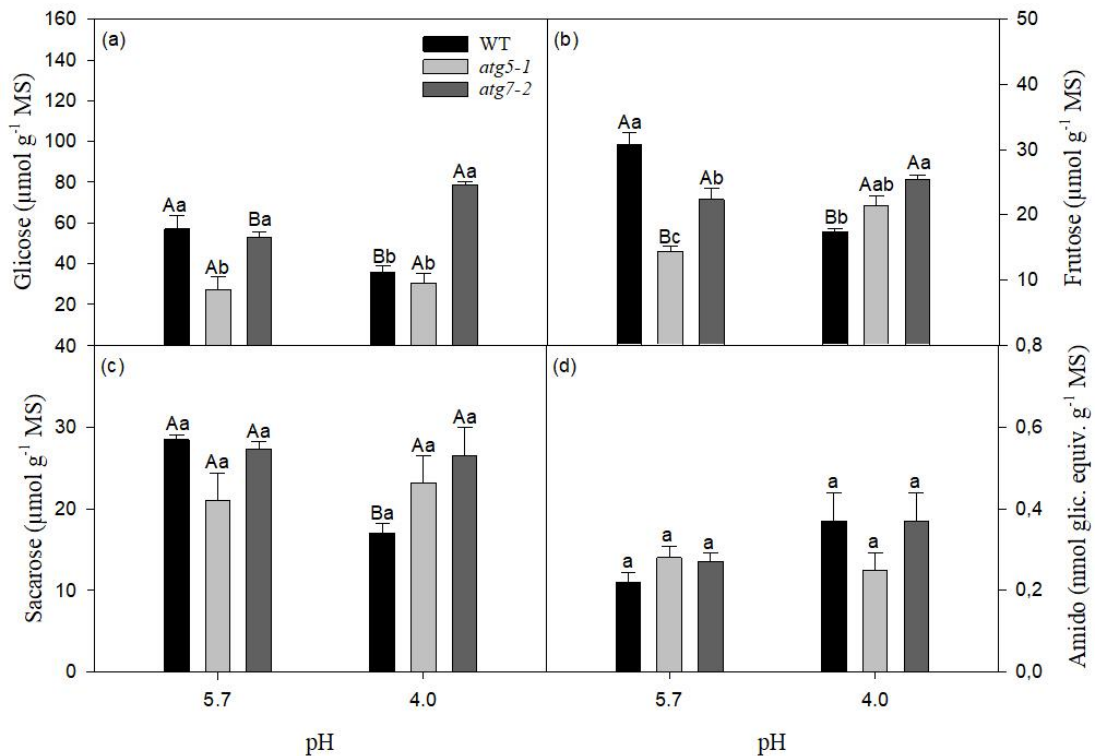


Figura 6. Níveis de açúcares em plantas de *A. thaliana* em resposta a variações no pH do meio de cultivo, coletadas no meio do período de luz. Plantas do tipo selvagem (WT) e com deficiência no fluxo autofágico foram cultivadas por um período de 10 dias em pH 5,7 e 4. Foram avaliados: (a) glicose; (b) frutose; (c) sacarose; (d) amido. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam genótipos sob diferentes condições de pH, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento de pH. As barras verticais representam o erro padrão de cinco repetições, cada uma com dez plântulas por genótipo.

Redução significativa no conteúdo de aminoácidos foi observada no mutante *atg5-1* sob pH ácido em relação ao WT (Figura 7^a). Com efeito, não se observaram diferenças significativas entre os genótipos em relação ao conteúdo de proteínas totais, embora o ambiente ácido afete, de forma drástica, o conteúdo de proteínas em todos os genótipos (Figura 7b). Ao se analisar os ácidos orgânicos, malato e fumarato, observou-se uma diminuição no conteúdo de malato em WT quando submetido ao ambiente ácido, diferente da situação observada em *atg7-2* que aumentou os níveis desse intermediário (Figura 7c). Em ambiente ácido, plantas WT foram caracterizadas por aumentos no conteúdo de fumarato, diferentemente dos mutantes *atgs* que apresentaram conteúdos inalterados ou reduzidos, como em *atg7-2* (Figura 7d).

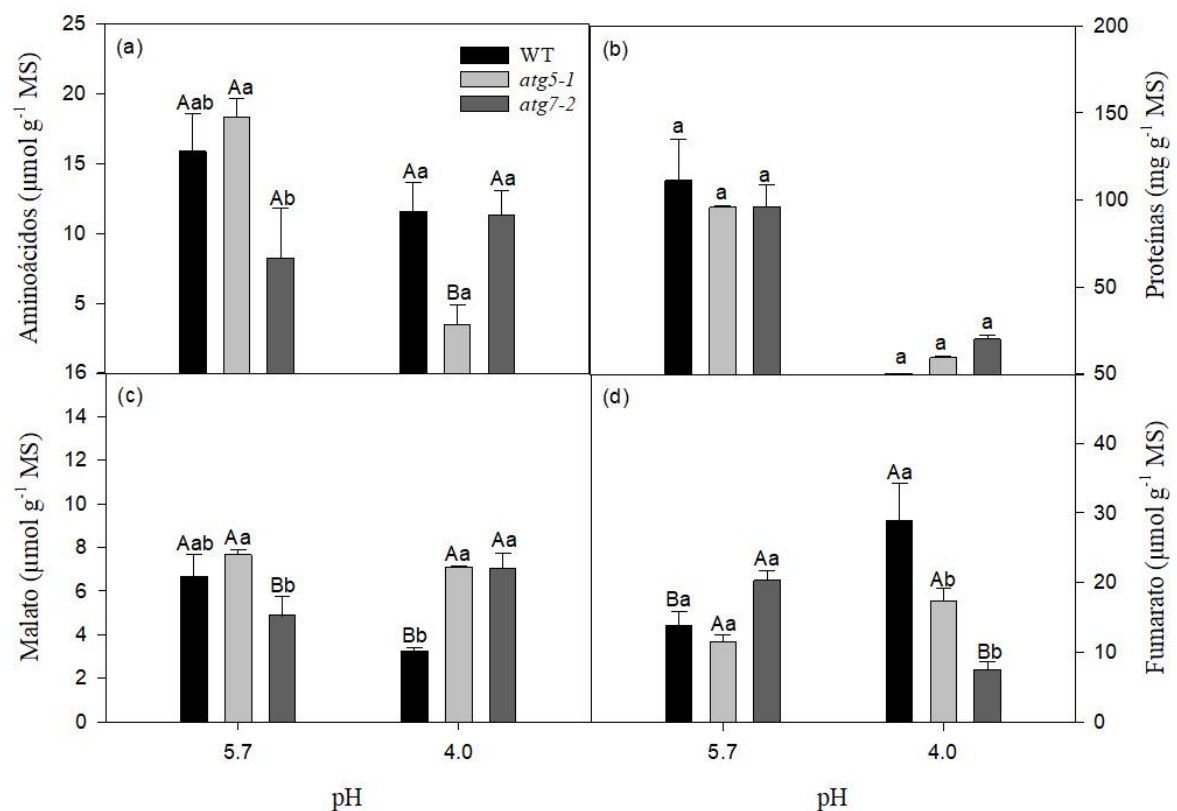


Figura 7. Níveis de ácidos orgânicos em plantas de *A. thaliana* em resposta a variações no pH do meio de cultivo, coletadas no meio do período de luz. Plantas do tipo selvagem (WT) e com deficiência no fluxo autofágico foram cultivadas por um período de 10 dias em pH 5,7 e 4. Foram avaliados: (a) aminoácidos; (b) proteínas; (c) malato; (d) fumarato. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam genótipos sob diferentes condições de pH, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento de pH. As barras verticais representam o erro padrão de cinco placas, cada uma com dez sementes por genótipo.

3.5 Expressão de genes relacionados com autofagia em resposta a mudanças no pH do meio de cultivo

Com o intuito de avaliar como o ambiente ácido afeta a expressão de genes relacionados a autofagia, a expressão de genes *atgs* em plantas do tipo selvagem (WT) foi inicialmente investigada (Figura 8a). É possível perceber que em pH 4 houve uma maior expressão do gene ATG5, mas não dos genes ATG2 e ATG7 em plantas WT (Figura 8a). Com intuito de investigar como a deficiência da autofagia é capaz de afetar genes relacionados ao estresse ácido foram avaliados, posteriormente, genes relacionados especificadamente os relacionados à homeostase celular com exsudação de K⁺ (AKT1), a estabilização e organização da parede celular (PGIP1 e EXP7) e a mitigação de ERO's via oxidase alternativa (AOX1) (Figura 9). Em síntese, percebe-se que há um aumento significativo da expressão de PGIP1 e EXP7 em plantas WT submetidas ao ambiente acidificado (Figura 9). Tal padrão, aumento da expressão em resposta ao pH 4,0, foi também observado em plantas *atg7-2* (Figura 9). Em mutantes *atg5-1* não foram observadas diferença significativa de expressão em resposta à variação no pH (5,7 e 4) para nenhum dos genes avaliados, mantendo-se a expressão sempre menor ou igual em relação ao WT quando submetido ao pH 4.

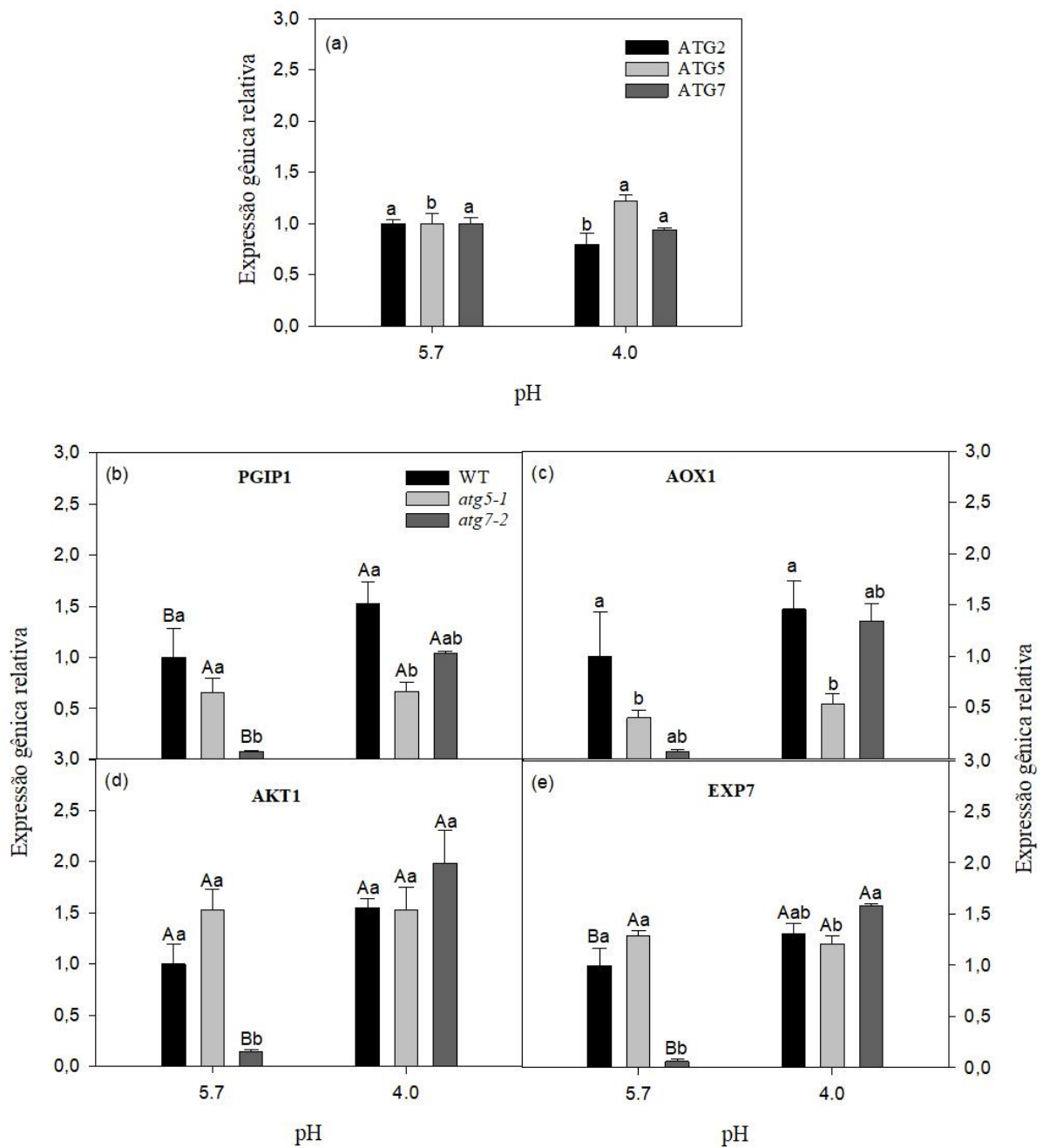


Figura 8. Expressão de genes relacionados a autofagia e oxidase alternativa em planta inteira de *A. thaliana* em resposta a variações no pH do meio de cultivo. Plantas do tipo selvagem (WT) e com deficiência no fluxo autofágico foram cultivadas por um período de 10 dias em pH 5,7 e 4. Foram avaliados genes relacionados a autofagia (ATGs) e ao estresse ácido (PGIP1, AOX1, AKT1, EXP7). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas simples comparam genótipos sob diferentes condições de pH, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento de pH. As barras verticais representam o erro padrão de cinco repetições, cada uma com dez plântulas por genótipo.

4. DISCUSSÃO

O entendimento acerca do papel do pH em modular respostas adaptativas em plantas é, ainda, fragmentado. De fato, a maioria dos trabalhos tem focado na distribuição de espécies vegetais em resposta às flutuações no pH do solo (Siqueira et al., 2022). Portanto, este trabalho buscou investigar a função da autofagia em resposta a acidez do meio. A autofagia desempenha papéis importantes em resposta a diferentes estresses abióticos incluindo a reciclagem de proteínas e organelas danificadas ou indesejadas, alocação de nutrientes e amenização do estresse oxidativo promovendo, em última instância, a sobrevivência das plantas (Avin-Wittenberg, 2018; Chen et al., 2021). Com isso, hipotetiza-se que a autofagia seja parte fundamental das respostas vegetais ao estresse ácido, causado pelo aumento de H^+ . Em consonância, os resultados aqui obtidos demonstram que o pH é capaz de afetar significativamente o desenvolvimento inicial de *A. thaliana*. Registre-se que, em resposta a acidez do meio de cultivo, plântulas apresentaram maior biomassa (Figura 2b), a despeito de uma diminuição no alongamento radicular (Figura 2b) explicada, ao menos em parte, pelo aumento de açúcares na parte aérea e seu reduzido transporte para as raízes (Figuras 6b e c) (Shavrukov & Hirai, 2015). Cabe mencionar, também, que, em ambiente ácido, outras respostas são usualmente desencadeadas podendo levar à diminuição do alongamento das raízes como: (i) exacerbada demanda de energia para homeostase entre íons, com o influxo de cátions e ânions, evitando que essa energia seja destinada ao alongamento radicular (Shavrukov & Hirai, 2015); (ii) desligamento gradual da atividade não apenas da H^+ -ATPase nas células da raiz, mas também de outras enzimas em toda a planta resultando, em última instância, na cessação do crescimento e estagnação da planta (Shavrukov & Hirai, 2015) e (iii) a deficiência no processo autofágico culminando com a não degradação dos peroxissomos oxidados sob estresse, levando a diminuição na síntese de auxina e, conseqüentemente, a diminuição do alongamento das raízes (Huang et al., 2019).

A autofagia mantém a homeostase celular pela eliminação de materiais celulares danificados e oxidados, evitando a ocorrência de estresse oxidativo na célula (Chen et al., 2021). Registre-se que a acidificação do meio de cultivo ($pH < 4,5$) influencia no acúmulo de EROs (Xalxo & Sahu, 2017). Nosso trabalho demonstrou, por teste qualitativo (DAB e NBT), que plantas mutantes (*atg5-1* e *atg7-2*) apresentam mais EROs que plantas WT em resposta ao pH ácido (Figura 4). Assim, como

consequência da deficiência do processo autofágico ocorre maior acúmulo de EROs e, conseqüentemente, os danos causados por tal acúmulo promovem a inibição do alongamento das raízes em ambos os pHs avaliados (Figura 4).

Sob condições de pH ideais, observa-se uma redução da respiração em *atgs* mutantes em comparação a WT (Figura 3), que poderia ser explicada, ao menos parcialmente, pelo excesso de EROs em *atg5-1* e *atg7-2* (Figura 4). Por outro lado, em pH 4, observou-se acúmulo do ânion-radical superóxido (O_2^-) mesmo em plantas WT, culminado com a inibição da respiração tanto em plantas WT quanto em mutantes *atg* (Figura 3). Cumpre ressaltar que o acúmulo de ânion-radical superóxido (O_2^-), gerado nos Complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons presente na membrana mitocondrial interna, ocasiona a interrupção da respiração mitocondrial e, sucessivamente, a perda de disponibilidade de energia na forma de ATP para processos celulares importantes (Ott et al., 2007; Keunen et al., 2011). Neste contexto, é plausível sugerir que em presença de um meio acentuadamente ácido (pH 4,0), o processo autofágico não foi capaz de eliminar de forma efetiva o superóxido (O_2^-), de forma a evitar que o estresse oxidativo causasse danos a respiração celular e, conseqüentemente, afetasse o crescimento das plântulas.

Em resposta à condição ácida observa-se, inicialmente, um aumento da expressão de genes da oxidase alternativa (AOX) (Shavrukov & Hirai, 2015), enzima que aceita elétrons diretamente da ubiquinona e, assim, contorna os Complexos III e IV da cadeia de transporte de elétrons reduzindo a produção de ATP (Keunen et al., 2011). AOX participa da via alternativa da respiração, que é ativada para diminuir a formação de EROs quando há um aumento de poder redutor, amenizando danos oxidativos (Polidoros et al., 2009). Neste trabalho, há maior expressão do gene AOX1 em WT em pH 4 que nos mutante *atg5-1*, observando-se ainda níveis baixíssimos de expressão em *atg5-1* (Figura 9). Tomados em conjunto, tais resultados explicam, ao menos em parte, a coloração mais acentuada em *atg5-1* para H_2O_2 e O_2^- nos ensaios histoquímicos, onde a baixa expressão de AOX1 associada ao acúmulo de superóxido e peróxido sugere maior estresse oxidativo neste mutante (Figura 4). Com efeito, o aumento da expressão de AOX em WT e *atg7-2* não foi suficiente para evitar o estresse e diminuir os danos observados com a diminuição do desenvolvimento das raízes, principalmente nos mutantes *atgs* em relação a WT.

A expressão de genes relacionados ao estresse ácido, tais como PGIP1, EXP7 e AKT1, aumentaram em ambiente ácido para WT e o mutante *atg7-2*, sendo

observada uma maior expressão de EXP7 no mutante *atg7-2*. Isso demonstra que a mutação *atg7-2* parece não influenciar a expressão de genes relacionados ao ambiente ácido. De modo diferente, *atg5-1* manteve níveis iguais ou menores de expressão para tais genes quando comparado aos níveis observados em plantas WT (Figura 9). O aumento da expressão do gene AKT1 auxilia na homeostase celular com exsudação de K⁺, ao passo que PGIP1 e EXP7 desempenham papéis de estabilização e organização da parede celular (Kobayashi et al., 2014; Tsai & Schmidt, 2020). É plausível sugerir, portanto, que a diminuição da expressão desses genes no mutante *atg5-1* esteja associada a maiores danos às raízes quando expostas ao pH ácido.

Os resultados obtidos até aqui demonstram que, de fato, a expressão do gene ATG5 é importante para as respostas ao estresse ácido, uma vez que, em pH 4, observa-se um aumento da sua expressão em WT (Figura 8). Isso indica que, a deficiência de ATG5, como no mutante *atg5-1*, pode promover um desbalanço na expressão de genes relacionados ao pH levando, dentre outras respostas, ao maior acúmulo de EROs, em comparação a WT e mesmo ao mutante *atg7-2*. A proteína ATG5 está envolvida no estágio inicial de formação do autofagossomo, formando um conjugado com ATG12 que é responsável pela formação inicial dessa estrutura de dupla membrana (Dong & Shen, 2013). Cabe mencionar também que mutantes *atg5* sofrem mais perante diferentes estresses abióticos (Pottier et al., 2019; Barros et al., 2020).

Apesar do mutante *atg5-1* ter sofrido mais com o estresse oxidativo em pH ácido, o comprimento da raiz e a massa fresca foram menos afetados quando comparados ao mutante *atg7-2* (Figura 2). Em adição, um aumento no conteúdo de fumarato foi encontrado em WT e *atg5-1*, quando comparado a *atg7-2* cuja concentração desse ácido orgânico reduziu (Figura 7). Araújo e colaboradores (2011) descreveram múltiplas funções associadas ao fumarato, e dentre elas, destaca-se a regulação do pH durante a assimilação do nitrato. Ademais, a diminuição da absorção de nitrato em ambiente ácido já foi descrita como um dos problemas enfrentados pelas plantas em condições de alta concentração de H⁺ (Hinsinger et al., 2003). O fumarato, intermediário do ciclo TCA, é exsudado pelas raízes como resposta ao ambiente externo que as circunda (Zell et al., 2010). É plausível sugerir que, em condição ácida, a planta responda ao excesso de H⁺ com aumento de exsudação de ácidos orgânicos (principalmente fumarato) que, neste caso, foi essencial para manter o controle do pH levando ao crescimento radicular e o incremento de biomassa.

Reduções no conteúdo de proteínas em ambiente ácido foram observadas em todos os genótipos o que é explicado pelo aumento do estresse oxidativo, e consequente acúmulo de EROs. Tais EROs reagem e oxidam biomoléculas como lipídios e proteínas, e causam danos irreversíveis as estruturas dessas moléculas levando ao comprometimento e/ou inativação das suas funções celulares (Timperio et al., 2008; Anjum et al., 2015). Cabe ressaltar também que isso ocorre com os aminoácidos que sofrem modificação oxidativa (Anjum et al., 2015). Levando-se em consideração que *atg5-1* é o mutante que mais sofre com o estresse oxidativo (Figura 4), menor acúmulo de aminoácidos no mutante *atg5-1* em relação a WT e *atg7-2* é também esperado. Trabalhos futuros deverão associar o envolvimento do metabolismo e o transporte de ácidos orgânicos bem como o catabolismo de aminoácidos com a tolerância ao baixo pH do solo.

Os níveis de açúcares solúveis aumentaram de forma significativa nos mutantes *atg* em relação ao WT (figura 6). Já foi previamente relatado que, durante o estresse, os açúcares solúveis se acumulam, afetando o metabolismo primário (Wingler e Roitsch, 2008). Essa sinalização por açúcares parece interagir com outros hormônios (e.g. ABA) levando a senescência em resposta à deficiência hídrica (Rook et al., 2006). Elevados níveis de açúcares solúveis em pH 4, principalmente em *atg7-2*, indicam que esse mutante está enfrentando um elevado estresse e, consequentemente, ocasiona a diminuição no seu comprimento de raiz e massa fresca. Registre-se, também, que em resposta à acidez, não houve uma diferença significativa entre os genótipos em relação ao acúmulo de amido (Figura 6). Em consonância com essa observação, tem sido relatado que em situações nas quais o acúmulo de amido é reduzido, ocorre um elevado acúmulo de fumarato, que funciona como uma reserva temporária de carbono para a síntese de amido (Araújo et al., 2011).

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados indicam que o pH ácido promove um significativo comprometimento do crescimento radicular associado a uma extensa reprogramação metabólica que culmina com a senescência das plântulas, principalmente em plantas mutantes (*atg5-1* e *atg7-2*). Tais características estão, em larga escala, relacionadas ao declínio dos componentes fotossintéticos (clorofila *b*), diminuição do teor de aminoácidos e aumento do teor de açúcares, como descrito anteriormente (Wingler & Roitsch, 2008), bem como ao aumento das EROs em condição ácida. Portanto, a autofagia parece desempenhar um importante papel

na evitação dos sintomas mais pronunciados ocasionados pelo ambiente ácido modulando, não somente o crescimento e desenvolvimento, mas também o particionamento de biomassa, o metabolismo primário e a contenção da senescência.

5. CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados aqui obtidos demonstram que a deficiência do processo autofágico em pH ácido culminou em danos oxidativos severos, principalmente em *atg5-1*, ao passo que o mutante *atg7-2* parece ser mais efetivo em lidar com o estresse oxidativo, fato provavelmente associado a maior expressão da AOX. Ademais, incrementos na expressão de genes relacionados a estabilidade da parede celular (e.g., EXP7, PGIP1 e AKT1) parecem ser de suma importância na resposta ao ambiente ácido. É plausível sugerir também que o gene ATG5, mais expresso em ambiente ácido, seja fundamental na resposta ao estresse ocasionado pelo excesso de H⁺. Em consonância com essa hipótese, os nossos resultados indicam que *atg5-1* tende a sofrer mais com estresse oxidativo, em relação ao mutante *atg7-2*. Não obstante, ao se avaliar o comprimento de raiz e a massa fresca, *atg5-1* obteve melhores resultados do que *atg7-2*, que seria explicado, ao menos parcialmente, pelo aumento da concentração de fumarato, que estaria envolvido no controle do pH para assimilação de nitrato. De modo interessante, o ambiente ácido ocasionou a diminuição de clorofilas (principalmente chl b) em todos os genótipos ao mesmo tempo que um aumento significativo de açúcares solúveis nos mutantes em relação a WT, principalmente em *atg7-2*. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o pH ácido induz a senescência, principalmente em mutantes com deficiência do processo autofágico. Embora a autofagia esteja aparentemente relacionada às respostas a condição ácida levando a interrupção da senescência precoce, o mecanismo por detrás dessas respostas ainda não está completamente elucidado. Em adição, é plausível sugerir que fumarato seja de vital importância para a resposta ao estresse ácido, ao estar relacionado com o comprimento das raízes e o particionamento de biomassa em todos os genótipos bem como funcionando como uma reserva de carbono, ainda que temporária, para a síntese de amido. Trabalhos futuros serão ainda necessários para esclarecer como e em que extensão essa aparente reprogramação metabólica evidente em mutantes *atg* module as respostas vegetais à acidez do solo.

REFERÊNCIAS

- Anjum NA, Sofo A, Scopa A, Roychoudhury A, Gill SS, Iqbal M, Lukatkin AS, Pereira E, Duarte AC, Iqbal A** (2015) Lipids and proteins—major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 4099-4121.
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. *Phytochemistry* **72**: 838-843.
- Avin-Wittenberg T** (2019) Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell Environment* **42**: 1045-1053.
- Barros JAS, Siqueira JAB, Cavalcanti JHF, Araújo WL, Avin-Wittenberg T** (2020) Multifaceted roles of plant autophagy in lipid and energy metabolism. *Trends Plant Science* **25**: 1141-1153.
- Barros JAS, Magen S, Lapidot-Cohen T, Rosental L, Brotman Y, Araújo WL, Avin-Wittenberg T** (2021) Autophagy is required for lipid homeostasis during dark-induced senescence. *Plant Physiology* **185**: 1542-1558.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 1-11.
- Bassham DC** (2015) Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods* **75**: 181-188.
- Batoko H, Dagdas Y, Baluska F, Sirko A** (2017) Understanding and exploiting autophagy signaling in plants. *Essays Biochem* **61**: 675-685.
- Bian M, Zhou M, Sun D, Li C** (2013) Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. *The Crop Journal* **1**: 91-104.
- Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarría-Machado I, Martínez-Estévez M** (2017) Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers Plant Science* **8**:1767.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* **72**: 248-254.
- Chen H, Dong J, Wang T** (2021) Autophagy in plant abiotic stress management. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 4075.

- Chen Q, Shinozaki D, Luo J, Pottier M, Havé M, Marmagne A, Reisdorf-Cren M, Chardon F, Thomine S, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C** (2019) Autophagy and nutrients management in plants. *Cells* **8**: 1-17.
- Cross JM, Von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**:1574-88.
- Dong J, Chen W** (2013) The Role of Autophagy in Chloroplast Degradation and Chlorophagy in Immune Defenses during Pst DC3000 (AvrRps4) Infection. *Plos One* **8**: e73091.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (2001) Fructose 2,6- bisphosphate activates pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263.
- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y** (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiology* **129**: 1181-1193.
- Haxim Y, Ismayil A, Jia Q, Wang Y, Zheng X, Chen T, Qian L, Liu N, Wang Y, Han S, Cheng J, Qi Y, Hong Y, Liu Y** (2017) Autophagy functions as an antiviral mechanism against geminiviruses in plants. *eLife* **6**: 1-17.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B** (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**: 43-59.
- Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NH, Mattsson O, Jørgensen LB, Jones JD, Mundy J, Petersen, M** (2009) Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell* **137**: 773-783.
- Huang L, Yu LJ, Zhang X, Fan B, Wang FZ, Dai YS, Qi H, Zhou Y, Xie LJ, Xiao S** (2019) Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in *Arabidopsis*. *Autophagy*: **15** (3): 407-422.
- Jiang Z, Watanabe CKA, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Terashima I, Noguchi K** (2019) Mitochondrial aox supports redox balance of photosynthetic electron transport, primary metabolite balance, and growth in *Arabidopsis thaliana* under high light. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 3067.

Kerk NM, Jiang K, Feldman LJ (2000) Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiology* **122**: 925-932.

Keunen E, Remans T, Bohler S, Vangronsveld J, Cuypers A (2011) Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 6894-6918.

Kidd PS, Proctor J (2001) Why plants grow poorly on very acid soils: are ecologists missing the obvious? *Journal of Experimental Botany* **357**: 791-799.

Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhaes JV (2015) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology* **11**: 1-28.

Kong X, Sun L, Zhou Y, Zhang M, Liu Y, Pan J, Li D (2011) ZmMKK4 regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* **30**: 2097-2104.

Liu Y, Xiong Y, Bassham DC (2009) Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* **5**: 954-963.

Marschner B, Henke U, Wessolek, G (1995) Effects of meliorative additives on the adsorption and binding forms of heavy metals in a contaminated topsoil from a former sewage farm. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde* **158** (1): 9-14.

Marshall RS & Vierstra RD (2018) Autophagy: the master of bulk and selective recycling. *Annual Review of Plant Biology* **69**: 1-36.

Mitou G, Budak H, Gozuacik D (2009) Techniques to study autophagy in plants. *International Journal of Plant Genomics*: 1-14.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal* **50**: 1093-1106.

Nunes-Nesi A, Brito DS, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends Plant Science* **19**: 399-407

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S et al. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913-922.

Pacifici E, Mambro RD, Loio RD, Costantino P, Sabatini S (2018) Acidic cell elongation drives cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *The EMBO Journal* **37**: 1-9.

Polidoros AN, Mylona PV, Arnholdt-Schmitt B (2009) Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum* **137**: 342-353

Pottier M, Dumont J, Masclaux-Daubresse C, Thomine S (2019) Autophagy is essential for optimal translocation of iron to seeds in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **70**: 859-869.

Qi H, Xia FN, Xiao S (2021) Autophagy in plants: physiological roles and post-translational regulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **63**: 161-179.

Ren H, Li Y, Zhao F, Pu X, Wei L, Lv X, Zhu F, Lin H (2015) The role of autophagy in alleviating damage of aluminum stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **79**: 167-175.

Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell & Environment* **29**: 426-434.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**: 1101-1108.

Schmitt M, Watanabe T, Jansen S (2016) The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. *AoB Plants* **8**: 1-13.

Shavrukov Y, Hirai Y (2016) Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany* **1**: 15–30.

Shin JH, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon JS, An G (2009) OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Molecules and Cells* **27**: 67-74.

Siqueira JA, Wakin T, Batista-Silva W, Silva JCF, Vicente MH, Silva JC, Clarindo WR, Zsögön A, Peres LEP, Veylder L, Fernie AR, Nunes-Nesi A, Araújo WL. (2022) A long and stressful day: Photoperiod shapes aluminium tolerance in plants. *Journal of Hazardous Materials* **432**: 128704.

Sulpice R, Pyl E T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Korff MV, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:10348–10353.

Szurman-Zubrzycka M, Chwiałkowska K, Niemira M, Kwaśniewski M, Nawrot M, Gajecka M, Larsen PB, Szarejko I (2021) Aluminum or low pH – which is the bigger enemy of barley? transcriptome analysis of barley root meristem under Al and low pH stress. *Frontiers in Genetics* **12**: 1-23.

Timperio AM, Egidio MG, Zolla L (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* **71**: 391-411.

Tsai HH, Schmidt W (2020) pH-dependent transcriptional profile changes in iron-deficient *Arabidopsis* roots. *BMC Genomics* **21**: 1-11.

Tsai HH, Schmidt W (2021) The enigma of environmental pH sensing in plants. *Nature Plants* **7**: 106-115.

Üstün S, Hafrén A, Hofius D (2017) Autophagy as a mediator of life and death in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **40**: 122-130.

Wang P, Mugume Y, Bassham DC (2018) New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **80**: 113-122.

Wingler A, Roitsch T (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* **10**: 50-62.

Wojtkowiak JW, Gillies RJ (2012) Autophagy on acid. *Autophagy* **8**: 1688-1689.

Wojtkowiak JW, Rothberg JM, Kumar V, Schramm KJ, Haller E, Proemsey JB, Lloyd MC, Sloane BF, Gillies RJ (2012) Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. *Cancer Research* **72**: 3938-3947.

Xalxo R, Sahu K (2017) Acid rain-induced oxidative stress regulated metabolic interventions and their amelioration mechanisms in plants. *Biologia* **72**: 1387-1393.

Xu F, Li X, Huang X, Pan J, Wang Y, Zhou S (2020) Development of a pH-responsive polymersome inducing endoplasmic reticulum stress and autophagy blockade. *Science* **6**: 1-12.

Yoshimoto K, Takano Y, Sakai Y (2010) Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Letters* **584**: 1350-1358.

Yoshimoto K (2015) Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant and Cell Physiology* **53**: 1355–1365.

Zell MB, Fahnenstich H, Maier A, Saigo M, Voznesenskaya EV, Edwards GE, Andreo C, Schleifenbaum F, Zell C, Drincovich MF, Maurino VG (2010) 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* **152**: 1251-1262.

Zeng X, Zeng Z, Liu C, Yuan W, Hou N, Bian H, Zhu M, Han N (2017) A barley homolog of yeast ATG6 is involved in multiple abiotic stress responses and stress resistance regulation. *Plant Physiology and Biochemistry* **115**: 97-106.

Zhu XF, Shi YZ, Lei GJ, Fry SC, Zhang BC, Zhou YH, Braam J, Jiang T, Xu XY, Mao CZ, et al (2012) XTH31, encoding an in vitro XEH/XET-Active enzyme, regulates aluminum sensitivity by modulating in vivo XET action, cell wall xyloglucan content, and aluminum binding capacity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4731-4747.

Capítulo 2: Papel da autofagia na regulação do relógio circadiano central.**RESUMO**

Vantagens seletivas são usualmente observadas para plantas que adquiriram mecanismos que lhes permitem detectar diferenças sazonais associadas às mudanças no fotoperíodo (comprimento do dia). A percepção do fotoperíodo é feita pelas folhas e dependendo das condições ambientais de luz, a sincronização do relógio circadiano é alterada. Responsável por coordenar os mais diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento, o relógio circadiano é um mecanismo interno que compreende uma rede de genes responsáveis pela adaptação das plantas as condições ambientais. Em resposta à estresses distintos, tem sido demonstrado que a autofagia desempenha papel importante na sobrevivência das plantas. A autofagia é um sistema proteolítico capaz de reciclar componentes celulares, através do sequestro e posterior degradação destes no vacúolo em momentos de limitada disponibilidade energética. Cumpre mencionar que, diretamente relacionados ao relógio circadiano, encontram-se os genes relacionados a autofagia (ATGs), onde TOC1 é capaz de inibir a iniciação da autofagia. Ainda assim, pouco, ou nada, se conhece acerca de como a autofagia participa na sincronização dos ritmos circadianos e sua relação com as mudanças metabólicas e de fatores de transcrição centrais. Nossos resultados demonstraram que a deficiência no processo autofágico levou à dessincronização do relógio, alterando significativamente o padrão de expressão de genes centrais na regulação do ritmo circadiano em função do fotoperíodo. Além disso, o fotoperíodo parece também coordenar a expressão de genes da autofagia, o que conseqüentemente ocasiona variações no metabolismo energético das plantas. Tomadas em conjunto, essas alterações metabólicas e moleculares culminam em maiores níveis de clorofila e maior fotossíntese em dias longos que se traduzem em maior crescimento, e área foliar, quando comparado ao fenótipo observado em dias curtos. Em suma, a autofagia apresenta-se como importante modulador na sincronidade do relógio em relação ao crescimento e desenvolvimento da parte aérea das plantas.

Palavras-chave: Autofagia; Fotoperíodo; Ritmo circadiano; Regulação gênica.

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras são as vantagens associadas a capacidade de coordenar processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento em determinadas épocas do ano, quando as condições ambientais são mais favoráveis (Song et al., 2010; Hayama & Coupland, 2004; Serrano-Bueno et al., 2017). No caso de plantas, programar a reprodução para a primavera, garante que essa planta possa se desenvolver antes de experimentar as duras condições do inverno, que se caracteriza por baixas temperaturas e déficit de água, resultando, em última instância, em menores taxas de sobrevivência da progênie (Lagercrantz, 2009). Neste contexto, vantagens seletivas são usualmente observadas para plantas que adquiriram mecanismos que lhes permitem detectar diferenças sazonais associadas às mudanças no fotoperíodo (Jackson, 2009, Liu et al., 2021).

O fotoperíodo é a quantidade de luz (e escuridão) em um ciclo diário (~24 horas), que, normalmente, se mostra mais longo no verão e mais curto no inverno (Liu et al., 2021). Em plantas, a percepção do comprimento do dia é realizada pelos fotorreceptores presente em folhas que detectam a luz (Serrano-Bueno et al., 2017). Baseados nessa percepção, existem três tipos principais de respostas vegetais ao fotoperíodo: (i) plantas de dia curto, em que a resposta é induzida quando o fotoperíodo é menor que o fotoperíodo crítico (CDL); (ii) plantas de dias longos em que a resposta é induzida quando o fotoperíodo excede o CDL; e (iii) plantas de dia neutro que não respondem às mudanças no fotoperíodo. O CDL é, portanto, a quantidade de horas de luz num ciclo diário (Jackson, 2009). Com efeito, condições de luz e temperatura atuam sincronizando o relógio circadiano com o ambiente externo (Thomas, 2006).

Responsável por coordenar os mais diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento, o relógio circadiano é um mecanismo interno responsável pela adaptação das plantas aos ciclos ambientais (Thomas, 2006). Registre-se, também, que o relógio circadiano compreende um mecanismo de manutenção do tempo com uma extensa rede de genes que apresentam múltiplos “loops” de retroalimentação de transcrição e tradução interligados (Serrano-Bueno et al., 2017). Neste contexto, fatores de transcrição centrais desse looping são CCA1 (*CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1*), LHY (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) e TOC1 (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*) (Song et al., 2010; Chen et al., 2022). Em adição, a arquitetura

molecular do relógio circadiano gera ritmos com um período aproximado de 24 horas que controla processos vários, incluindo o florescimento (Hayama & Coupland, 2004). Tais características permitem às plantas antecipar eventos periódicos futuros e regular vários processos de uma maneira específica em função da hora do dia (Liu et al., 2021). Ademais, evidências recentes indicam que a correspondência do tempo circadiano interno (planta) com o ambiente externo é de suma importância para a aptidão das plantas e a resistência à estresses (Nitschke et al., 2017, Serrano-Bueno et al., 2017).

O ritmo circadiano é alterado em resposta aos diferentes fotoperíodos, com diferenças na utilização dos recursos pelas plantas e como elas respondem a variadas condições ambientais (Yang et al., 2020). Cabe ressaltar que tanto o metabolismo nutricional quanto o metabolismo energético estão acoplados ao relógio circadiano em plantas (Chen et al., 2022). Nesse contexto, a autofagia apresenta papel importante na reciclagem de nutrientes em condições de estresse, assegurando a correta remobilização de nutrientes em momentos de limitada disponibilidade energética (Thompson & Vierstra, 2005; Izumi et al., 2013). Trabalhos anteriores reportaram o papel da autofagia na sobrevivência e desenvolvimento das plantas em resposta a diferentes fotoperíodos (Doelling et al., 2002). Em adição, Izumi e colaboradores (2013) relacionaram o retardo de crescimento de mutantes da autofagia em dias curtos à disponibilidade de energia durante a noite, demonstrando o papel da autofagia na geração de formas alternativas de energia nessas condições.

Apesar dos estudos relatados terem caracterizado respostas metabólicas específicas de mutantes *atg* a diferentes fotoperíodos, pouco se sabe acerca do papel do relógio circadiano na modulação dessas respostas. Cumpre mencionar que diretamente relacionados ao relógio circadiano, encontram-se os genes relacionados a autofagia (*ATGs*) que apresentam um ritmo robusto e são ritmicamente expressos (Juste et al., 2021). Neste contexto, o gene *TOC1*, um regulador metabólito central, regula também a autofagia através da fosforilação das proteínas *ATG1* e *ATG13*, que inibe a iniciação da autofagia quando os nutrientes são abundantes (Chen et al., 2022). *TOC1* é também capaz de evitar que a autofagia alcance níveis muito elevados que podem ocasionar morte celular em resposta às condições de deficiência nutricional (Thompson & Vierstra, 2005; Liu et al., 2019; Chen et al., 2022). Além disso, defeitos na autofagia parecem afetar, em larga escala, os ritmos endógenos, reduzindo a amplitude do ritmo do *TOC1* e encurtando o período do ritmo do *CCA1*

(Chen et al., 2022). A autofagia é, portanto, essencial para a manutenção do padrão do relógio circadiano especificadamente na sensibilidade das plantas às deficiências nutricionais (Juste et al., 2021; Chen et al., 2022; Yang et al., 2022).

Tem sido demonstrado que o período claro/escuro afeta a atividade autofágica, que é aumentada em resposta à ausência de luz (Yang et al., 2020; Juste et al., 2021), sugerindo uma possível relação da autofagia nas respostas associadas a sincronização do relógio circadiano. Não obstante, pouco, ou nada, se conhece acerca de como a autofagia participa nessa sincronização e sua relação com as mudanças metabólicas e de fatores de transcrição centrais. Portanto, buscou-se investigar qual o papel da autofagia a diferentes fotoperíodos e se a mesma é regulada pelo relógio circadiano central, a partir da caracterização das alterações fisiológicas e metabólicas em plantas deficientes no processo autofágico (*atgs*) submetidas a diferentes fotoperíodos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições de crescimento e tratamento com fotoperíodo

Foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (Columbia-0) e mutantes para o processo autofágico (Tabela 1). Sementes foram esterilizadas em 1 mL de etanol 70% (v/v) por 1 minuto e, em seguida, em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 15 minutos. Todo o resíduo de hipoclorito de sódio foi removido por sucessivas lavagens (6x) em água estéril. Após a desinfestação, as sementes foram vernalizadas a 4°C por 48h e distribuídas em placas de Petri estéreis contendo meio de cultivo ½ MS (Murashige and Skoog, 1962). As placas foram, então, mantidas durante 10 dias em câmara de crescimento em diferentes fotoperíodos. De modo simplificado, plantas foram cultivadas em dias curtos (8 horas luz: 16 horas escuro) ou em dias longos (16 horas luz: 8 horas escuro), igualmente em temperatura de 22 °C durante o período luminoso e 20 °C no período de escuro, umidade relativa em 60% e irradiância a 150 μmol fótons m⁻² s⁻¹.

Tabela 1. Descrição dos genótipos utilizados no presente trabalho.

Genótipos	Linhagem	Ecótipo	Referência
<i>atg 5-1</i>	SAIL	Columbia 0	Hanoaka et al., 2002
<i>atg 7-2</i>	GK	Columbia 0	Hofius et al., 2009
WT	-	Columbia 0	-

Após um período de 10 dias, as plântulas foram transplantadas para potes plásticos de 0,1 litros de capacidade em substrato comercial Carolina Soil Padrão EC 7 – 8 Kg. Após o transplântio, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento nas condições supracitadas por um período de quatro semanas. As análises fisiológicas e bioquímicas descritas abaixo foram realizadas em plantas com quatro semanas de idade.

2.2 Análises biométricas

Plantas com quatro semanas de idade foram coletadas para avaliação dos seguintes parâmetros de crescimento: massa fresca da roseta (MFR), massa seca da roseta (MSR), área foliar da roseta (AFR), área foliar específica (AFE). A AFR foi determinada pelo método da imagem digital, após digitalização das folhas com auxílio de um scanner (*HP Scanjet G2410 1200X1200*) e as imagens obtidas processadas com auxílio do software ImageJ (Baker et al., 1996). A AFE foi estimada utilizando a seguinte fórmula:

$$AFE = AFR / MSR$$

2.3 Análises de trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram avaliados utilizando um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – Infrared Gas Analyzer), modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.). As análises foram realizadas ao menos 2 horas após o início do período luminoso. A concentração de referência de CO₂ foi mantida em 400 mmol CO₂ mol⁻¹ de ar. Todas as medições foram realizadas usando a câmara foliar de 30 cm², mantendo a temperatura do bloco em 25 ° C e 150 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Para essa avaliação foram avaliadas sete plantas por genótipo, para cada condição de cultivo (dias curtos e dias longos).

2.4 Determinação de metabólitos

Amostras de rosetas foram coletadas durante o fotoperíodo de 24 horas, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C . Posteriormente, tais amostras foram homogeneizadas, e submetidas à extração metabólica. Em síntese, foram adicionados $400\mu\text{L}$ de metanol a amostra seguido de agitação (750 rpm) a 80°C por 20 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado do precipitado. Ao sobrenadante foram adicionados $200\mu\text{L}$ de clorofórmio (99,9%) e $430\mu\text{L}$ de água mili-Q. As amostras foram centrifugadas e a fase aquosa foi separada para análises futuras. Na fração solúvel foram determinados os teores de clorofilas (Sulpice et al., 2009), glicose, frutose e sacarose (Ferne et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (Cross et al., 2006), malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007). Na fração insolúvel os teores de amido (Ferne et al., 2001) e proteínas (Bradford, 1976) foram determinados.

2.5 Expressão gênica

A análise quantitativa de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada com RNA total isolado de rosetas. A extração do RNA foi realizada com TRizol® (Ambion, Life Technology) seguindo o manual do fabricante. A integridade do RNA foi verificada em géis de agarose a 1% (*p/v*) e a concentração foi medida antes e após a digestão com DNase I usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (<http://www.nanodrop.com/>). A digestão com DNase I (Ambion; <http://www.ambion.com/>) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de $1\mu\text{g}$ de RNA total usando a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen; <http://www.invitrogen.com/>) de acordo com as instruções do fabricante. PCR quantitativa foi realizada utilizando o kit Power Syber Green, master mix. As amostras foram amplificadas segundo o programa: 94°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 15 s, 56°C por 15 s e 72°C por 15 s. Para confirmar a presença de um único produto de amplificação, específico para cada reação, uma curva de desnaturação foi realizada imediatamente após a amplificação. As leituras foram realizadas no equipamento Applied Biosystem StepOnePlus™ Software v2.0. Os níveis de expressão foram determinados pelo método comparativo do CT (Threshold Cycle), segundo Schmittgen e Livak (2008). EF1a e F-Box foram usados como genes referência e os genes selecionados e seus respectivos primers estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Genes selecionados para análise de expressão em mutantes atgs submetidos a diferentes fotoperíodos.

Gene	Locus	Descrição	“Primer Forward”	“Primer Reverso”
EF1a	At1g18070	Fator de alongamento de tradução EF1a (Constitutivo)	TGGTTGTTATGCCGAACAAGGAAC	AAATTCTCACCCGGTCCTGCAC
F-BOX	At5g15710	Proteína da família F-BOX (Constitutivo)	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA
ATG2	At3g19190.1	Processo Autofágico	AAGGGAGTCCAAAGAGGGACTG	AACACCGAGTCCAACAGCTTCC
ATG5	At3g51830.1	Processo Autofágico	GTGGCTGGACAAGTTAAGACAGC	ACGAGATGTCATCCCAGGTATCG
ATG7	At5g45900	Processo Autofágico	ACGTGGTTGCACCTCAGGATTC	ACTAAGAGTTCAACGGCGAGAGC
ATG8h	At3g06420	Processo Autofágico	CCACGAGACATGACTGTTGGAC	AGTCCATGCGACTAGCGGTTTG
ATG18a	At3g62770	Processo Autofágico	CAAAGGAGTGTTACCGAGGTAT	ATCCATGCCAAGAATAACAACG
SOG1	At1g25580	SUPRESSOR DE RESPOSTA GAMMA 1	GCCTACCGATTTGTTCTTCCAGAG	CGTCGAAGCGATTTGCAGTGTAG
LHY	At1g01060	ALONGAMENTO TARDIO DO HIPOCOTILO	TCTGCTGGTTGGTTGCAAGC	AAGCTCCACCCATTGTACCAG
CCA1	At2g46830	ASSOCIADO AO RELÓGIO CIRCADIANO 1	CAACCTGGTCTATTGACTTATC	GAAGAACTGAAGAGGAGCTTCA
TOC1	At5g61380	CRONOGRAMA DA EXPRESSÃO DE CAB 1	ACATGCTTCGTCTTTGGCGTCTTC	AGTTGCGGTCTTTCTCTAGTCTGG

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado composto de dois fotoperíodos (dias curtos e dias longos) com sete repetições. A normalidade e homocedasticidade dos dados foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, ambos a 0,05 de probabilidade. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do teste F ($P \leq 0,05$). Quando significativas, as características foram submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$). Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o software R (R Development Core Team, 2019).

3. RESULTADOS

3.1 Crescimento é afetado pela variação no fotoperíodo

Com o intuito de avaliar os impactos da deficiência do fluxo autofágico em resposta à diferentes fotoperíodos, foram comparadas plantas do tipo selvagem (WT) e mutantes deficientes para autofagia (*atgs*), crescidas lado a lado, em condições de dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro). Foi possível observar que em dias longos as plantas tendem a apresentar aumentos na área foliar da roseta (AFR), área foliar específica (AFE), massa fresca (MF) e massa seca (MS), principalmente para os mutantes *atgs* (Figuras 1 e 2). De modo geral, independente do fotoperíodo, os mutantes *atg5-1* e *atg7-2* apresentaram menores valores para todas as variáveis analisadas em relação as plantas WT, exceto pela AFE onde não se observaram diferenças entre mutantes *atg* e WT (Figura 2).

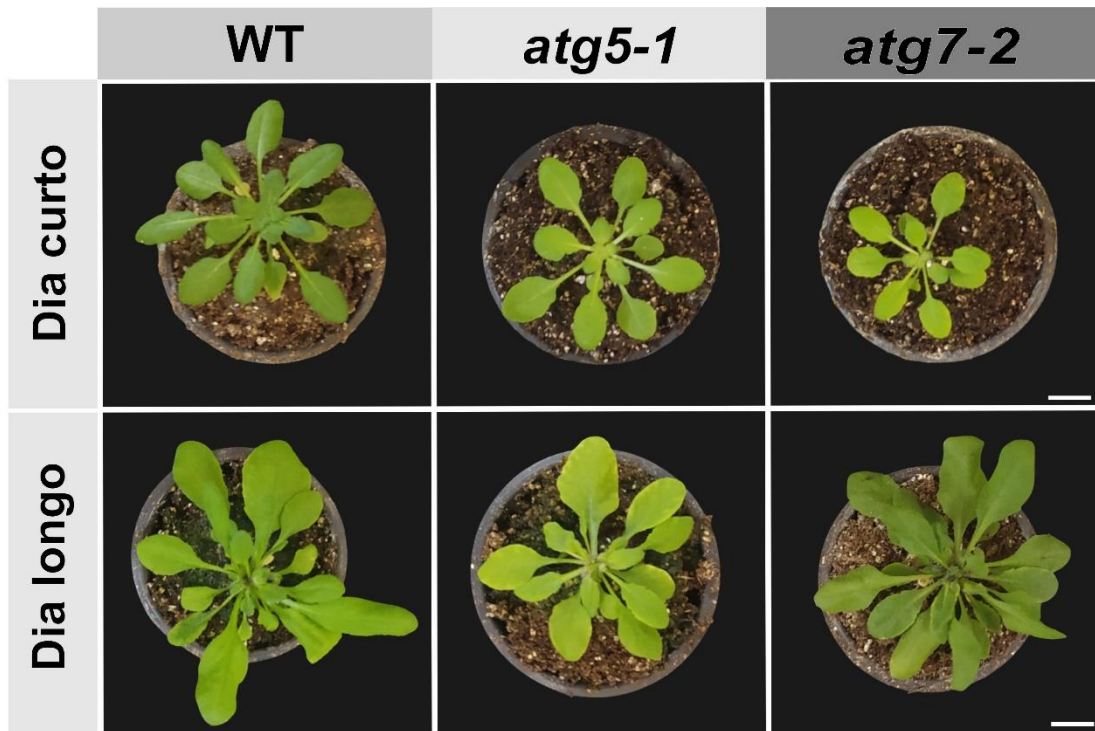


Figura 1. Imagens representativas de plantas de *A. thaliana* em resposta a variações no fotoperíodo. Plantas com quatro semanas de idade foram cultivadas em fotoperíodo de dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro). Foram comparadas plantas do tipo selvagem (WT) e mutantes *atg5-1* e *atg7-2* que possuem deficiência no fluxo autofágico. Barras de escala em branco representam 1cm.

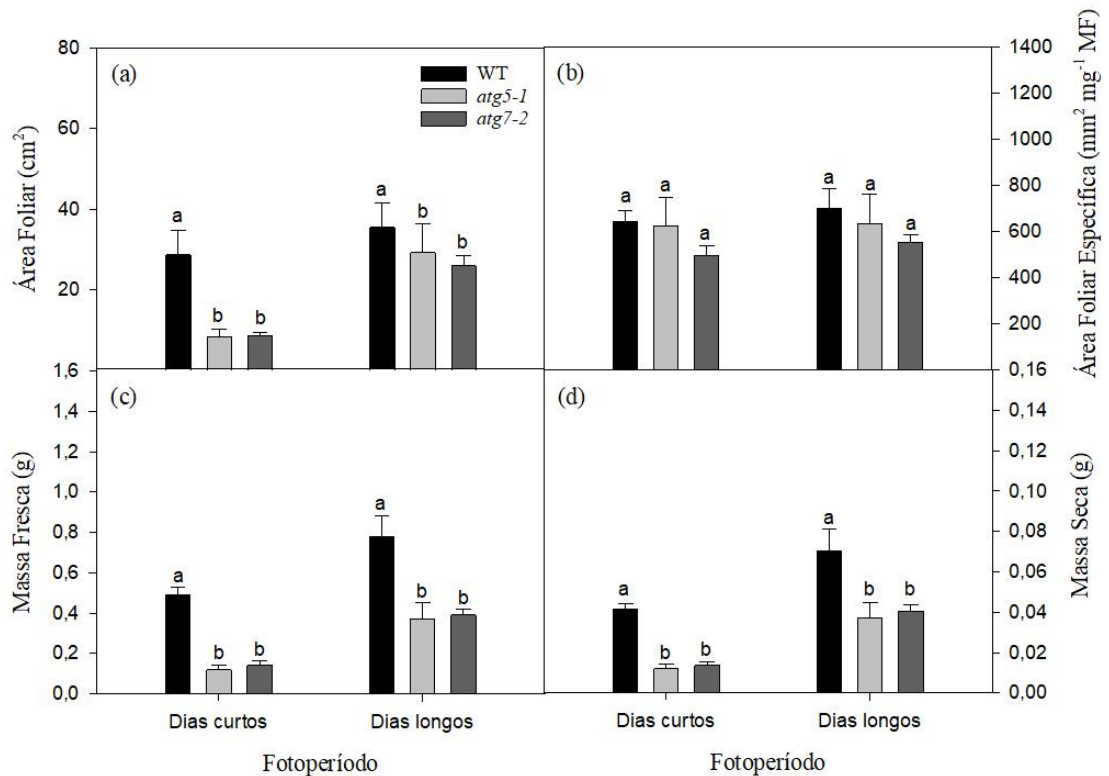


Figura 2. Parâmetros de crescimento são afetados pelo fotoperíodo em mutantes *atg*. Área foliar (a), área foliar específica (b), massa fresca (c) e massa seca (d) foram avaliados em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e mutantes com deficiência no fluxo autofágico (*atgs*). Parâmetros foram avaliados em plantas de quatro semanas de cultivo em fotoperíodo dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro). Valores representam média +/- erro padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam genótipos sob diferentes fotoperíodos, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo fotoperíodo.

3.2 A fotossíntese é afetada em resposta à diferentes fotoperíodos

Em consonância com a redução nos parâmetros de crescimento (Figuras 1 e 2), foi observado menores taxas fotossintéticas (A) em mutantes *atg5-1* e *atg7-2* comparado as plantas WT em ambos fotoperíodos (Figura 3). Em adição, diferenças em relação a A_N foram observadas em função da flutuação nos fotoperíodos e, assim, plantas cultivadas em dias longos foram caracterizadas por maiores A para todos os genótipos avaliados, quando comparado a plantas em dias curtos (Figura 3).

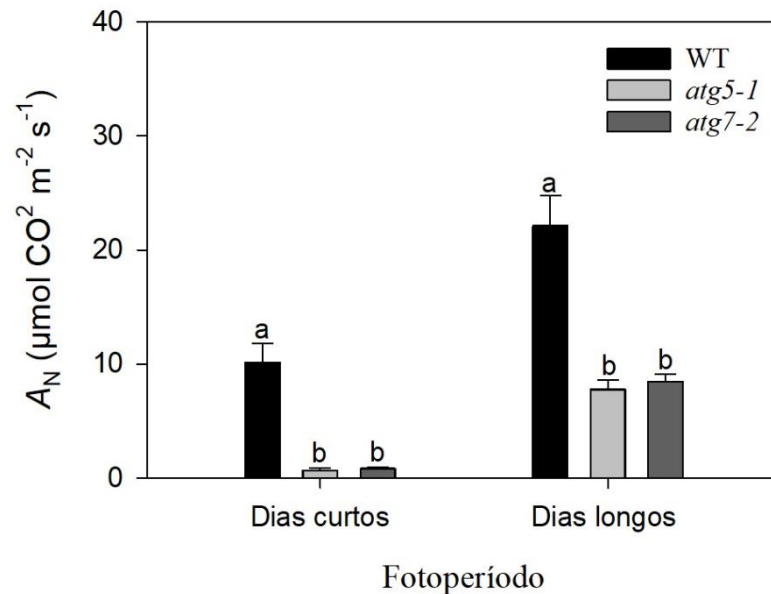


Figura 3. Fotossíntese é aumentada em plantas cultivadas em dias longos. A fotossíntese líquida (A_N) foi avaliada plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e mutantes com deficiência no fluxo autofágico (*atgs*). As análises foram realizadas em plantas de quatro semanas cultivadas em dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro). Valores representam média \pm erro padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam genótipos sob diferentes fotoperíodos, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo fotoperíodo.

3.4 Alterações metabólicas em resposta às variações no fotoperíodo

Para investigar como a autofagia participa nas respostas metabólicas de plantas submetidas a diferentes fotoperíodos, compostos relacionados ao metabolismo do nitrogênio, açúcares e pigmentos fotossintéticos foram avaliados. Não foram observadas diferenças significativas em relação a variação dos teores de clorofilas totais e carotenoides entre mutantes *atg* e WT independentemente dos fotoperíodos ou do horário de coleta ao longo do período do dia (noite ou dia) (Figura 4).

Em relação aos compostos associados ao metabolismo do carbono, foi possível observar que, em dias curtos, ocorre maior acúmulo de glicose (Figura 5a) e frutose (Figura 5b) ao meio do dia em plantas mutantes *atg*, que é consumida durante a noite, alcançando níveis similares ao final do ciclo entre plantas WT e mutantes *atg*. Por

outro lado, em dias longos observa-se um comportamento distinto para os genótipos avaliados com pequenas flutuações ao longo do dia entre os genótipos (Figura 5b). De modo diferente, em dias longos, parece ocorrer um acúmulo de frutose durante o dia e consumo durante a noite para WT (Figura 5d), que não ocorre em plantas *atg7-2* que apresentam dois pontos de acúmulo de frutose (4h e 16h) ao longo do dia (Figura 5c e d). Embora *atg7-2* tenha apresentado um ligeiro acúmulo de sacarose no meio do dia (4h) e no meio da noite (16h) em dias curtos, não houve diferenças significativa entre WT e *atg5-1* durante o dia, com pequena ou ausente variação em um intervalo de 24 horas (Figura 5e). Comportamento distinto foi observado em dias longos, onde *atg5-1* apresentou maiores níveis de sacarose no final do dia e meio da noite, diferentemente de WT e *atg7-2* que parecem ter acúmulo apenas no primeiro horário do dia com posterior redução durante a noite, no caso de *atg7-2*, ou se mantém constante em WT (Figura 5f). Tanto em dias curtos quanto em longos, observa-se um consumo de amido durante a noite, sendo que em dias curtos há um maior acúmulo de amido durante o dia (Figura 5g), ao passo que em dias longos, o acúmulo de açúcar é bem menor ao longo do dia (Figura 5h).

Redução significativa no conteúdo de aminoácidos foram observadas em dias curtos para todos os genótipos (Figura 6a), ao passo que em dias longos houve um aumento no conteúdo de aminoácidos em *atg5-1* e *atg7-2* observado às 16 horas (Figura 6b). Com efeito, observou-se um acúmulo de proteínas no início do dia para todos os genótipos em dias curtos, com posterior degradação ao decorrer do dia (Figura 6c), ao passo que em dias longos não se observou nenhuma diferença entre os genótipos e nem entre os diferentes horários durante o período de 24 horas para o conteúdo de proteínas (Figura 6d). Referente aos níveis de malato e fumarato, intermediários do ciclo TCA na respiração mitocondrial, observou-se um acúmulo de malato durante o dia em dias curtos, com posterior degradação durante a noite para todos os genótipos (Figura 6e). Em dias longos, os níveis de malato não sofreram grandes alterações durante o dia para todos os genótipos (Figura 6i), ao passo que o fumarato apresentou maiores níveis em plantas WT quando comparado a *atg5-1* e *atg7-2*, com um acúmulo observado às 20 horas (final do dia/início da noite) (Figura 6h).

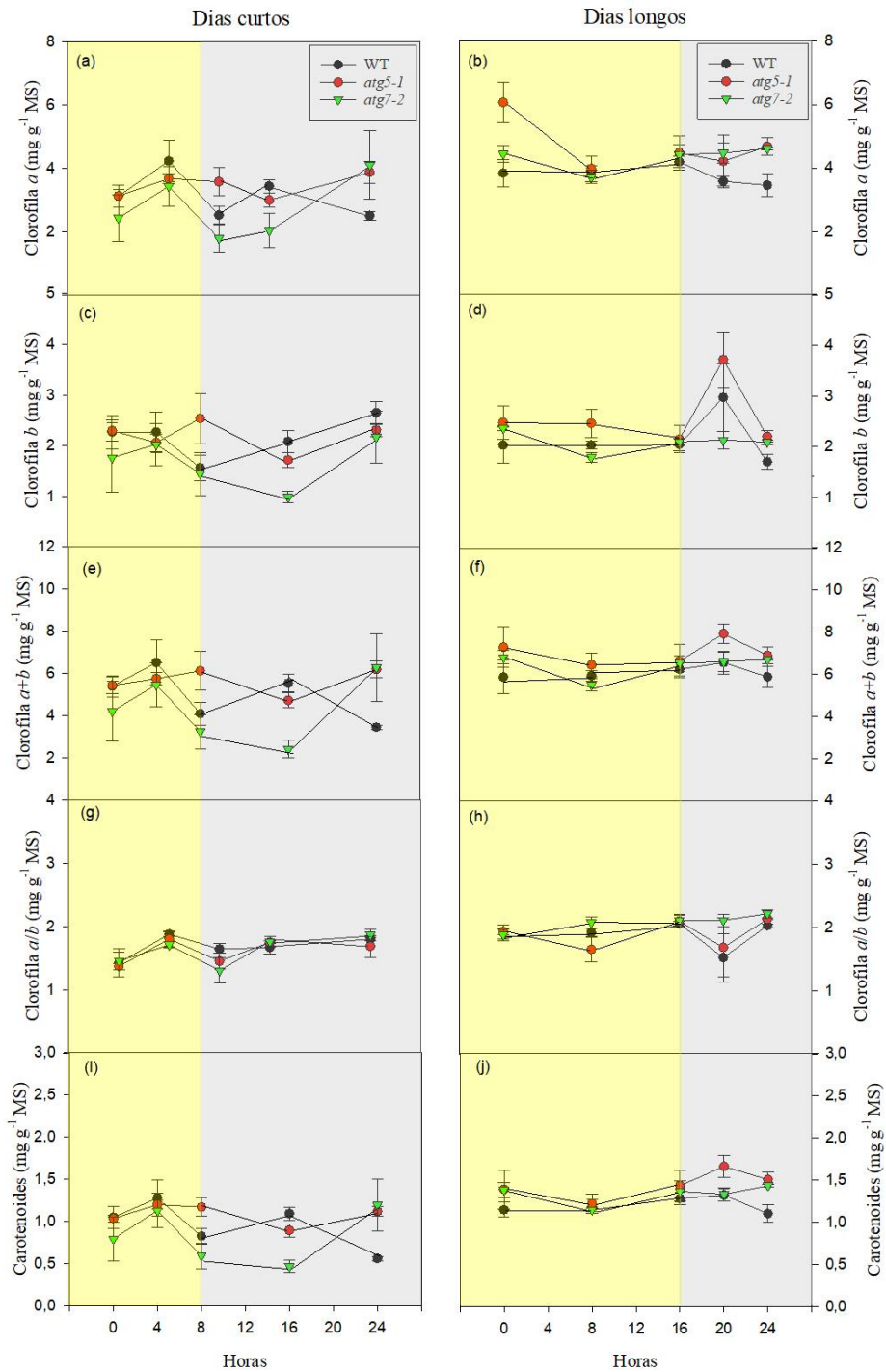


Figura 4. Níveis de pigmentos fotossintéticos são aumentados em dias longos. Parâmetros foram avaliados em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e mutantes com deficiência no fluxo autofágico (*atgs*). Plantas de quatro semanas cultivadas em dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro) foram utilizadas. Valores representam média +/- erro padrão de sete repetições. Retângulos claros e escuros denotam períodos diurno e noturno em dias curtos (8 h claro/16 h escuro) e dias longos (16 h claro/8 h escuro), respectivamente.

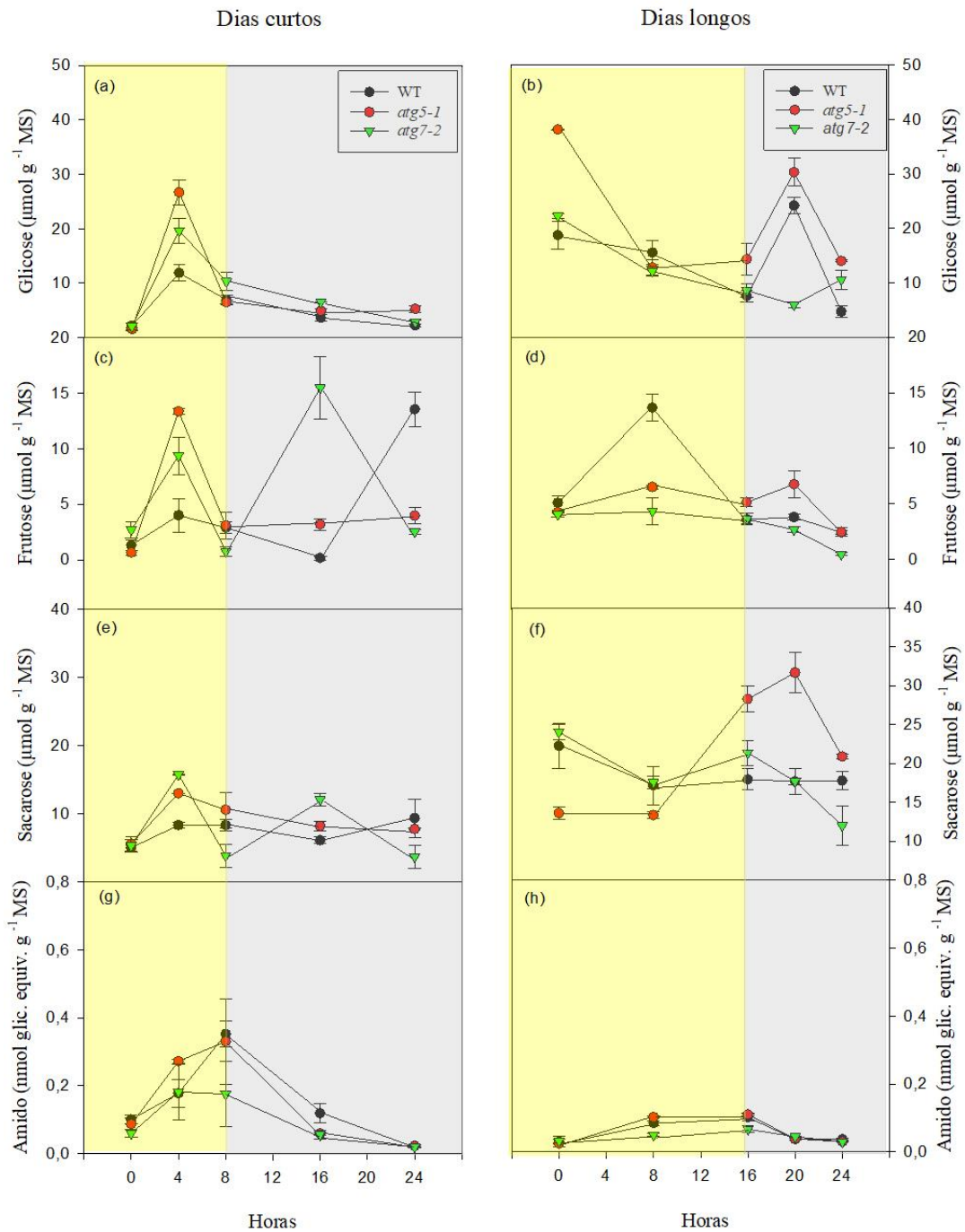


Figura 5. Níveis de açúcares em rosetas de *A. thaliana* difere em resposta a variações no fotoperíodo. Parâmetros foram avaliados em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e mutantes com deficiência no fluxo autofágico (*atgs*). Plantas de quatro semanas cultivadas em dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro) foram utilizadas. Valores representam média +/- erro padrão de sete repetições. Retângulos claros e escuros denotam períodos diurno e noturno em dias curtos (8 h claro/16 h escuro) e dias longos (16 h claro/8 h escuro), respectivamente.

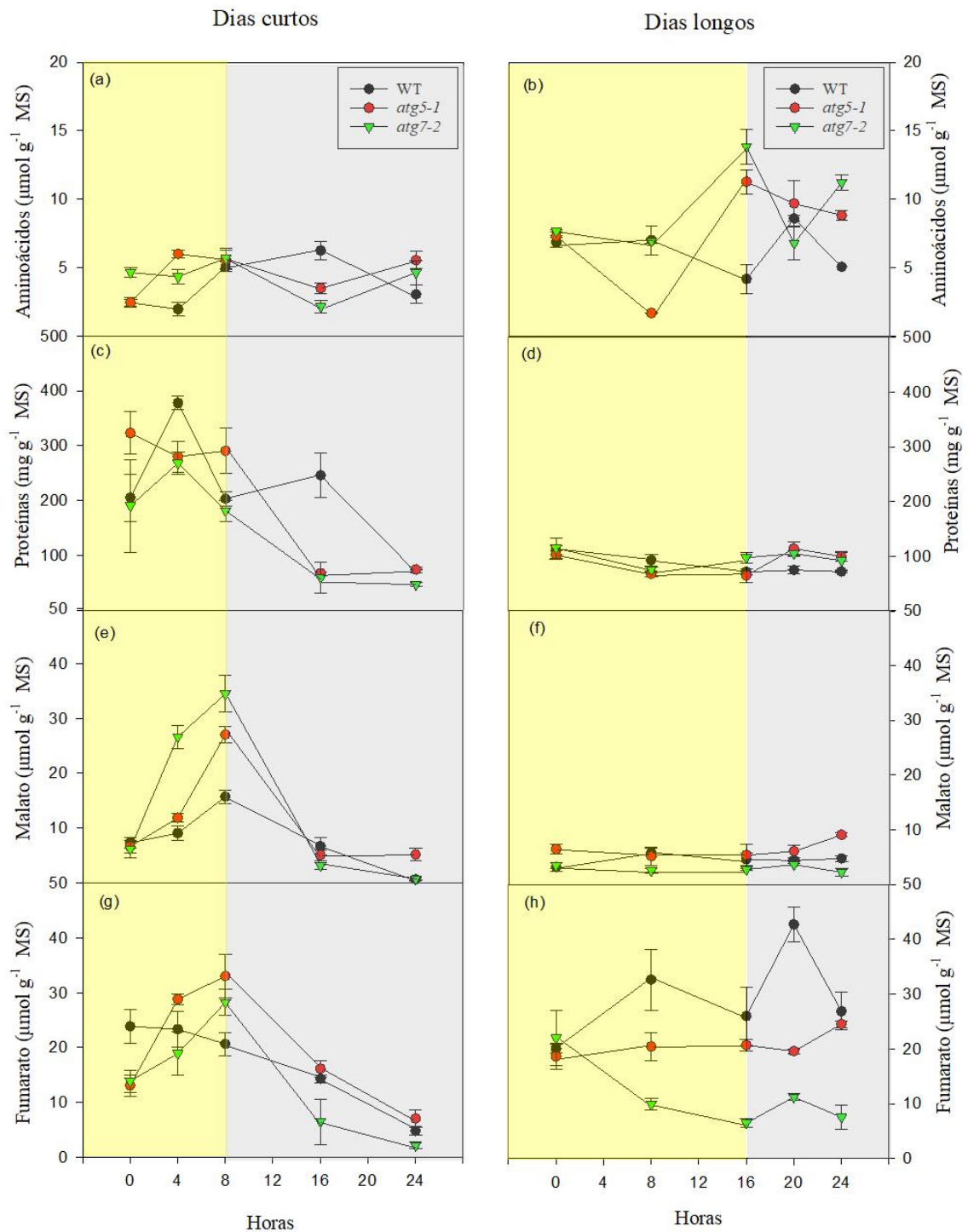


Figura 6. Níveis de ácidos orgânicos em rosetas de *A. thaliana* em resposta a variações no fotoperíodo. Parâmetros foram avaliados em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e mutantes com deficiência no fluxo autofágico (*atgs*). Plantas de quatro semanas cultivadas em dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro) foram utilizadas. Valores representam média \pm erro padrão de sete repetições. Retângulos claros e escuros denotam períodos diurno e noturno em dias curtos (8 h claro/16 h escuro) e dias longos (16 h claro/8 h escuro), respectivamente.

3.5 Expressão gênica é alterada em resposta ao fotoperíodo

Com o intuito de avaliar como o fotoperíodo afeta a expressão de genes relacionados a autofagia, a expressão dos genes *ATGs* em plantas WT foi inicialmente investigada. É possível perceber que a expressão dos genes varia durante o período de 24 horas e nos diferentes fotoperíodos (Figura 7). Em dias curtos, *ATG2* não aumentou sua expressão em nenhum dos horários avaliados, diferente dos dias longos onde há um aumento da expressão desse gene durante o dia, e redução no período da noite (Figura 7a e b). A expressão do gene *ATG5* em dias curtos diminuiu durante o período de luz, mas aumentou durante a noite, e esse comportamento foi contrário quando avaliada a sua expressão em dias longos (Figura 7c e d). Referente aos genes *ATG7* e *ATG18a*, um pico de expressão durante a noite foi observado em dias longos, diferente de dias curtos onde não há variação na expressão desses genes (Figura 7e, f, i e j). Tanto em dias longos, quanto em dias curtos, *ATG8h* apresentou o mesmo padrão de expressão ao decorrer do intervalo de 24 horas (Figura 7g e h).

Em relação a avaliação de como o fotoperíodo afeta a expressão de genes relacionados ao relógio circadiano em mutantes deficientes para autofagia, a expressão dos genes *SOG1*, *TOC1*, *LHY* e *CCA1* em plantas WT e em *atg* mutantes (*atg5-1* e *atg7-2*) foi investigada. É possível perceber que a expressão dos genes em dias curtos não variou entre o genótipo selvagem (WT) e o mutante *atg5-1* na maioria dos pontos avaliados. Cabe ressaltar, contudo, que plantas WT apresenta um pico de expressão de *TOC1* e *LHY* no final da noite não observado em plantas *atg5-1* (Figura 8c, e). Em síntese, percebe-se que em dias longos há um comportamento distinto em mutantes *atg5-1* e *atg7-2*, com ausência de alterações na expressão dos genes em um intervalo de 24 horas (Figura 8b, d, f, h). Em dias curtos e longos, há picos na expressão de *SOG1* no início da noite (8 e 16h), e de *TOC1* no início e final da noite (16h e 24h) para WT, diferente de *LHY* e *CCA1* que apresentaram picos de expressão no início do dia (0h) e final da noite (24h) (Figura 8b, d, f, h).

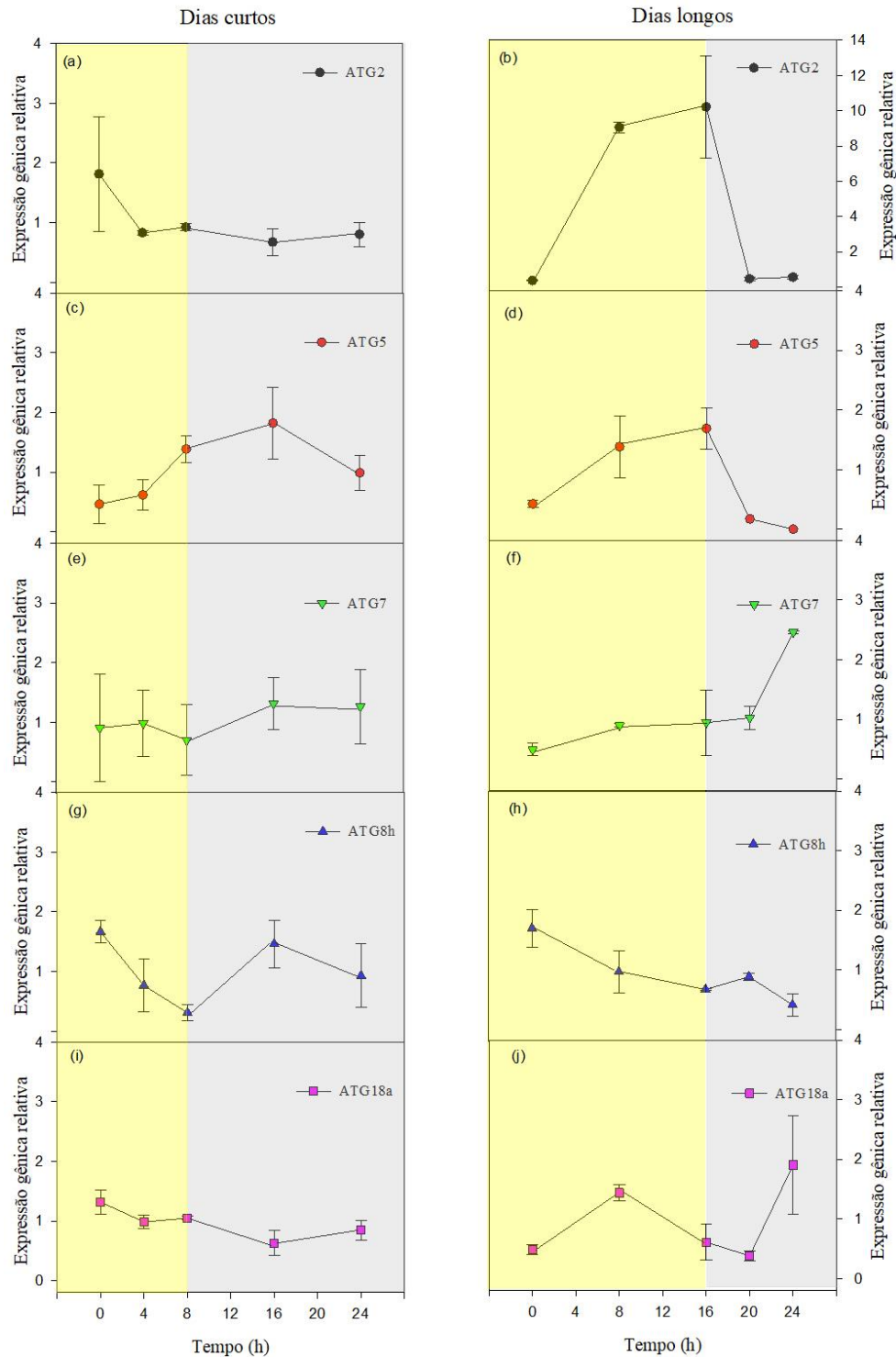


Figura 7. Alterações no padrão de expressão gênica dos genes ATG em *A. thaliana* em resposta a variações no fotoperíodo. Foram avaliados genes relacionados a autofagia ATG2, ATG5, ATG7, ATG18a em plantas do tipo selvagem (WT). Parâmetros foram avaliados em plantas de quatro semanas cultivadas em dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro). Valores representam média +/- erro padrão de sete repetições. Retângulos claros e escuros denotam períodos diurno e noturno em dias curtos (8 h claro/16 h escuro) e dias longos (16 h claro/8 h escuro), respectivamente.

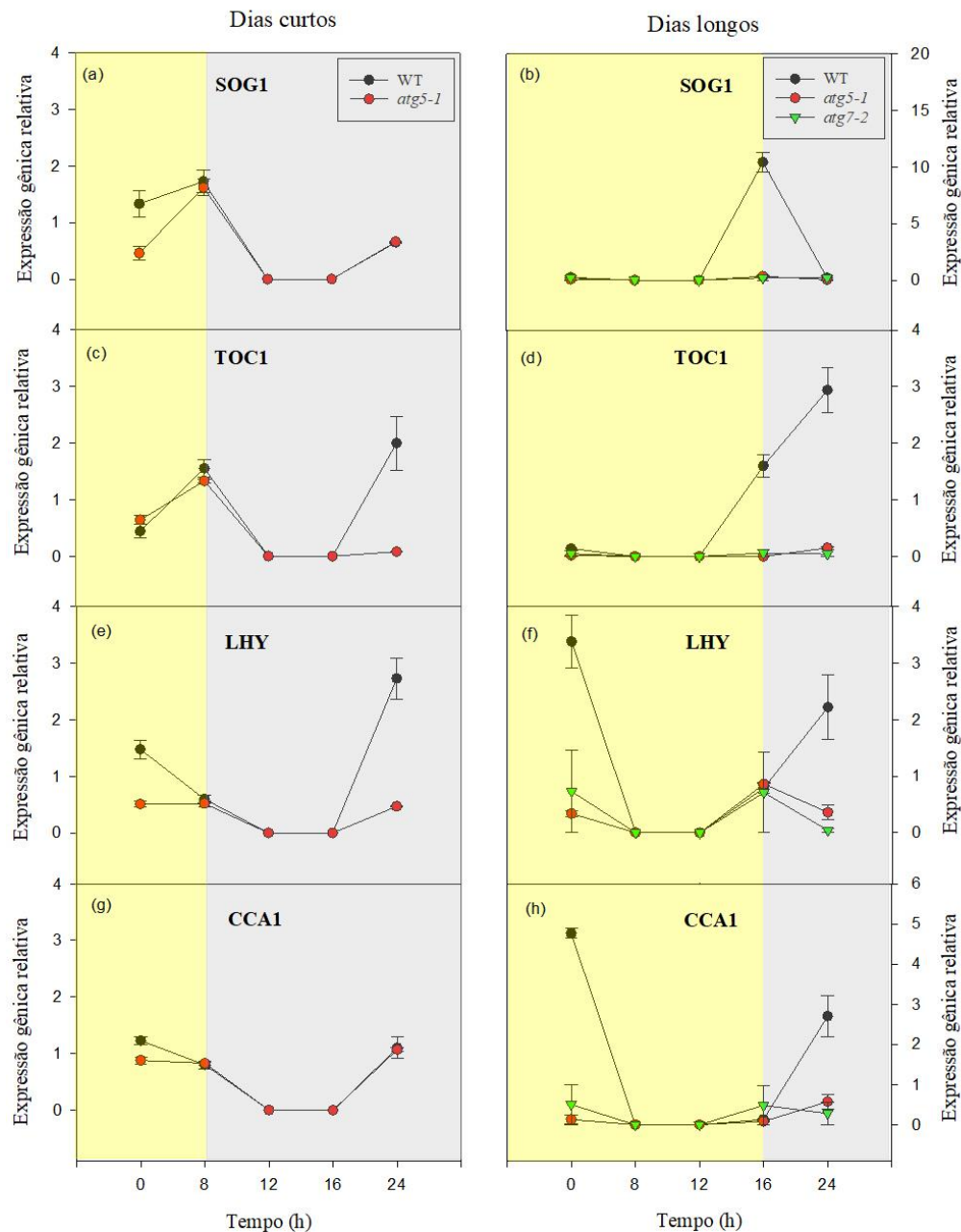


Figura 8. Expressão gênica em rosetas de *A. thaliana* em resposta a variações no fotoperíodo. Parâmetros foram avaliados em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e mutantes com deficiência no fluxo autofágico (*atgs*). Foram avaliados genes relacionados ao relógio circadiano SOG1 (*SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1*), TOC1 (*TIMING OF CAB EXPRESSION*), LHY (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) e CCA1 (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*). Parâmetros foram avaliados em plantas de quatro semanas cultivadas em dias curtos (8 horas de luz: 16 horas de escuro) e dias longos (16 horas de luz: 8 horas de escuro). Valores representam média +/- erro padrão de sete repetições. Retângulos claros e escuros denotam períodos diurno e noturno em dias curtos (8 h claro/16 h escuro) e dias longos (16 h claro/8 h escuro), respectivamente.

4. DISCUSSÃO

O entendimento acerca da sincronização do relógio circadiano com o fotoperíodo é ainda pouco conhecido e bastante fragmentado. Com efeito, inúmeros trabalhos têm focado em investigar mecanismos moleculares, mais especificamente de regulação gênica, como forma de obter respostas acerca de tal sincronização (Song et al., 2010). Neste contexto, este trabalho buscou investigar o papel da autofagia em modular respostas associadas ao relógio circadiano em resposta à diferentes fotoperíodos. A autofagia desempenha papéis importantes nas respostas a limitações nutricionais em diferentes fotoperíodos, estando diretamente envolvida na reciclagem de proteínas e organelas danificadas ou indesejadas e alocação de nutrientes, promovendo, em última instância, a sobrevivência das plantas (Avin-Wittenberg, 2019; Chen et al., 2021). Com isso, é plausível sugerir que a autofagia seja parte fundamental da sincronização do relógio circadiano na percepção ao fotoperíodo, promovendo a sobrevivência das plantas em resposta à diferentes condições de comprimento do dia. Em consonância, os resultados aqui obtidos demonstram que o fotoperíodo é capaz de afetar significativamente o desenvolvimento em *A. thaliana*.

Nosso trabalho demonstrou que plantas submetidas a dias longos, apresentam maior crescimento e ganho de biomassa quando comparadas com dias curtos (SD) (Figura 1 e 2). Adam & Langton (2004) relatam que dias longos frequentemente promovem aumento no peso seco e na AF, quando comparado com plantas que crescem em dias curtos. Utilizando 50 espécies diferentes, foi demonstrado que 41 espécies (82%), apresentaram folhas maiores em condição de dias longos (Adam & Langton, 2004). Os resultados aqui obtidos indicam que aumentos na AF não foram acompanhados por aumentos na AFE, principalmente para os mutantes *atg*, que mantiveram valores similares em dias curtos e dias longos, e em relação a WT (Figura 2b). É plausível sugerir que o peso seco esteja sendo conduzido para expansão da AF influenciada pela partição diferencial de assimilados em dias longos (Langton et al., 2003). O aumento da AF em dias longos pode ser relacionado com maiores níveis de clorofila, fotossíntese e peso seco (Langton et al., 2003). Para todos os genótipos aqui estudados, esse comportamento foi observado embora, de forma mais aparente, para WT, que apresentou maiores valores que mutantes *atgs* (Figura 2a e d, 3 e 4). Os resultados obtidos indicam que, até certo ponto, prejuízos na autofagia influenciam

não apenas a fotossíntese, mas também a área foliar em resposta às flutuações no fotoperíodo.

A regulação do metabolismo em resposta ao ciclo circadiano é altamente dependente da sinalização do relógio circadiano em conjunto com redes reguladoras metabólicas várias (Ma et al., 2012). Independente dos genótipos ou dos fotoperíodos aqui avaliados os níveis de pigmentos fotossintéticos não sofreram alterações significativas durante o período claro/escuro (Figura 4). Por outro lado, ao se analisar o comportamento de açúcares solúveis e amido, percebe-se que, em dias curtos, há um acúmulo significativo no período de luz, com consumo durante o período noturno, ao passo que em dias longos o comportamento é distinto com maiores tendências de acúmulo destes açúcares na ausência de luz (Figura 5). Em adição, o aumento destes açúcares parece coincidir com o período onde alguns genes da autofagia estão sendo menos expressos (Figura 7b, c, d, e, j). Tais resultados sugerem que um maior consumo desses açúcares ocorra nos momentos de maior atividade autofágica. Em consonância, a autofagia atuaria na disponibilidade energética, degradando componentes ricos em energia, deixando-os disponíveis para utilização pelas plantas durante o seu desenvolvimento, como previamente observado (Ma et al., 2012; Yang et al., 2020).

Em dias longos, o conteúdo de amido foi reduzido em todos os genótipos (Figura 5h), indicando que as plantas submetidas a essa condição não acumulam estoques consideráveis de energia para o período em ausência de luz, uma vez que este é mais curto que o período de luz onde há fotossíntese e, conseqüentemente, disponibilidade energética. Por outro lado, aumentos nos conteúdos de aminoácidos livres foram observados em todos os genótipos quando cultivados em dias longos (Figura 6b). Em plantas mutantes para a biossíntese de amido, foi anteriormente observado que ocorrem aumentos de aminoácidos livres e, em autofagia atua degradando estes aminoácidos gerando uma fonte de energia alternativa para plantas na ausência de luz (Izumi et al., 2013). Os resultados aqui obtidos indicam que algo semelhante possa estar acontecendo em resposta às flutuações no fotoperíodo. Trabalhos futuros devem, portanto, associar como o metabolismo de aminoácidos e a biossíntese de amido é alterado em mutantes para a autofagia em resposta ao comprimento do dia com vistas à obtenção de energia.

Em dias curtos tanto as mutantes *atgs* quanto WT foram caracterizados por uma tendência em acumular mais malato, fumarato e proteínas durante o dia, que são degradados na ausência de luz (Figura 6c, e, f). É plausível sugerir que tais compostos possam ser degradados pelo fluxo autofágico durante o período de escuro, culminando em uma fonte de energia alternativa para as plantas na ausência da fotossíntese. Em consonância com essa hipótese, o fumarato pode servir como fonte de armazenamento rápido de energia, particularmente em condições de estresse (Araújo et al., 2011). Em dias longos, plantas WT acumulam mais fumarato e aminoácidos durante a noite (Figura 6b e h), os quais, provavelmente, são degradados posteriormente pela via autofágica na presença de luz culminando na geração de energia. Tal aspecto é diferente do observado em mutantes *atgs* que apresentam um pico de aminoácidos ao final do dia com níveis inferiores e constantes de fumarato quando comparado a plantas WT. Tais resultados indicam uma menor capacidade energética em mutantes *atg* e explicam, ao menos parcialmente, os impactos observados no crescimento dessas plantas. O fotoperíodo parece influenciar, de diferentes formas, a regulação dos genes relacionados à autofagia (*ATGs*). Em dias curtos, aumentos na expressão da *ATGs* durante o escuro (Figura 7), associados com a degradação de amido (Figura 5g e h) garantem, conseqüentemente, maior geração de energia em condições de limitada disponibilidade. Com efeito, nossos resultados demonstram que o aumento da expressão de genes *ATGs* durante o período de luz em dias longos possa estar associado à maior geração de energia suportando, em última instância, o maior crescimento observado nessas plantas (Figura 1). Cabe mencionar também que aumentos nos níveis autofágicos foram previamente relatados apenas em ausência de luz suportando a degradação de compostos armazenadores de energia, como amido (Yang et al., 2020; Chen et al., 2022).

Os resultados aqui obtidos indicam também que a autofagia seja capaz de modular, potencialmente, genes chaves (*SOG1*, *TOC1*, *LHY* e *CCA1*) na rede de transcrição do relógio circadiano (Figura 8). Foi possível observar que em plantas WT a sincronização dos transcritos centrais do ritmo circadiano ocorre independente do fotoperíodo, diferentemente dos mutantes com deficiência autofágica (*atgs*), onde tais genes não aumentaram sua expressão em nenhum momento no decorrer do período claro/escuro de 24 horas (Figura 8). Embora o mecanismo de desregulação do ritmo circadiano em mutantes *atg* não seja evidente é plausível sugerir que a autofagia seja

peça fundamental neste processo. O gene *TOC1* regula positivamente *LHY* e *CCA1*, que regulam negativamente a expressão de *TOC1* (Song et al., 2010). Assim, à medida que os níveis de proteína *CCA1* e *LHY* diminuem, a repressão desaparece, facilitando o acúmulo dos transcritos dos genes do relógio noturno, como *TOC1* (Song et al., 2010). Portanto, é de se esperar que a desregulação da expressão de *CCA1* e *LHY* causa a posterior desregulação das saídas transcricionais específicas da hora do dia (Nitschke et al., 2017). Com efeito, *CCA1* e *LHY* atingem seus picos ao amanhecer e *TOC1* no final do dia, início da noite (Song et al., 2010; Serrano-Bueno et al., 2017; Chen et al., 2022). Por outro lado, *SOG1* seria o regulador mestre das respostas ao dano ao DNA, atuando em respostas várias de estresse ambiental, e sua expressão também se correlaciona com a duração do dia com picos ao anoitecer (Pagano et al., 2022).

De modo geral, os resultados aqui apresentados indicam que uma potencial reprogramação metabólica e molecular em resposta às variações no fotoperíodo seja capaz de modular respostas diferenciais em plantas levando a um maior crescimento em dias longos. Neste contexto, a duração do período de claro/escuro em um intervalo de 24h parece ditar, em larga escala, como as plantas modelam seus sistemas internos, principalmente o relógio circadiano, para a sincronização com o ambiente externo (Siqueira et al., 2022). Registre-se também que a autofagia parece atuar na sincronização de genes centrais do ritmo circadiano, ocasionando uma melhor utilização dos recursos metabólitos e da geração de energia em função de variações no fotoperíodo.

5. CONCLUSOES

Em suma, os resultados aqui obtidos demonstram que a deficiência no processo autofágico levou à dessincronização do relógio, alterando significativamente o padrão de expressão de genes centrais na regulação do ritmo circadiano em função do fotoperíodo. Além disso, o fotoperíodo parece também coordenar a expressão dos genes ATGs, modulando-os em resposta ao tempo de exposição claro/escuro. É plausível que tais mudanças na expressão de genes relacionados a autofagia e, conseqüentemente da atividade autofágica, ocasionem variações no metabolismo regulando a degradação de açúcares, amino ácidos e amido para geração de energia para as plantas. De modo interessante, em dias longos, as plantas foram

caracterizadas por uma maior utilização dos aminoácidos que parecem funcionar como uma fonte alternativa de energia, diferentemente do observado em dias curtos, nos quais uma aparente indução ao aumento do nível de proteínas foi observada. Em consonância, os níveis de fumarato também parecem servir como uma fonte de reserva de energia, principalmente em plantas WT, quando comparado as mutantes *atgs* em dias longos. Tomadas em conjunto, essas alterações metabólicas e moleculares culminam em maiores níveis de clorofila e maior fotossíntese em dias longos que se traduzem em maior crescimento e AF quando comparado aos dias curtos. Em adição, mesmo em dias longos, os mutantes deficientes para autofagia (*atg5-1* e *atg7-2*) apresentam crescimento reduzido em relação ao WT, indicando a importância da sincronicidade do relógio circadiano em relação ao crescimento e desenvolvimento da parte aérea das plantas que é, aparentemente, afetada na ausência da autofagia. Trabalhos futuros serão ainda necessários para esclarecer como e em que extensão essa aparente reprogramação metabólica evidente em mutantes *atg* modula as respostas vegetais aos diferentes fotoperíodos.

REFERÊNCIAS

- Adams SR, Langton FA** (2005) Photoperiod and plant growth: a review. *Horticultural Science and Biotechnology* **80**: 2–10.
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. *Phytochemistry* **72**: 838-843.
- Avin-Wittenberg T** (2019) Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell Environ* **42**: 1045–1053.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 1-11.
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Advance Access published 1976.
- Chen Q, Shinozaki D, Luo J, Pottier M, Havé M, Marmagne A, Reisdorf-Cren M, Chardon F, Thomine S, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C** (2019) Autophagy and nutrients management in plants. *Cells* **8**: 1-17.
- Chen H, Dong J, Wang T** (2021) Autophagy in plant abiotic stress management. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 4075.
- Chen W, Hu Z, Yu MT, Zhu S, Xing J, Limei C, Pu W, Yu F** (2022) A molecular link between autophagy and circadian rhythm in plants. *Molecular Physiology* **64**: 1044–1058.
- Cross JM, Von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol* **142**:1574-88.
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Viestra RD** (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 33105-33114.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (2001) Fructose 2,6- bisphosphate activates pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250–263.

- Hayama R, Coupland G** (2004) The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* **135**: 677–684.
- Izumi M, Hidema J, Makino A, Ishida H** (2013) Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**: 1682–1693.
- Jackson SD** (2009) Plant responses to photoperiod. *New Phytologist* **181**: 517–531.
- Juste YR, Kaushik S, Bourdenx M et al.** (2021) Reciprocal regulation of chaperone-mediated autophagy and the circadian clock. *Nat Cell Biol* **23**: 1255–1270.
- Lagercrantz U** (2009) At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants? *Journal of Experimental Botany* **60**: 2501–2515.
- Langton FA, Adams SR, Cockshull KE** (2003) Effects of photoperiod on leaf greenness of four bedding plant species. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**: 400-404.
- Liu J, Yang M, Kang R, Klionsky DJ, Tang D** (2019) Autophagic degradation of the circadian clock regulator promotes ferroptosis. *Autophagy* **15**: 2033–2035.
- Ma D, Li S, Molusky MM, Lin JD** (2012) Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism? *Trends in Endocrinology & Metabolism* **23**: 319-325.
- Marshall RS & Vierstra RD** (2018) Autophagy: The master of bulk and selective recycling. *Annual Review of Plant Biology* **69**: 1-36.
- Mitou G, Budak H, Gozuacik D** (2009) Techniques to study autophagy in plants. *International Journal of Plant Genomics*: 1-14.
- Nitschke S, Cortleven A, Schmölling T** (2017) Novel stress in plants by altering the photoperiod. *Trends in Plant Science* **22**: 913-916.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J.* **50**:1093–1106.
- Pagano A, Gualtieri C, Mutti G, Raveane A et al.** (2022) Identification and Characterization of SOG1 (Suppressor of Gamma Response 1) Homologues in Plants Using Data Mining Resources and Gene Expression Profiling. *Genes* **13**: 667.
- Schmittgen TD, Livak KJ** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**: 1101-1108.
- Serrano-Bueno G, Romero-Campero FJ, Lucas-Reina E, Romero JM, Valverde F** (2017) Evolution of photoperiod sensing in plants and algae. *Current Opinion in Plant Biology* **37**: 10-17.

Siqueira JA, Wakin T, Batista-Silva W et al. (2022) A long and stressful day: Photoperiod shapes aluminium tolerance in plants. *Journal of Hazardous Materials* **432**: 128704.

Song YH, Ito S, Imaizumi T (2010) Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 594-603.

Sulpice, R., Pyl, E. T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., et al. (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:10348–10353.

Thomas B (2006) Light signals and flowering. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3387–3393.

Thompson AR, Vierstra RD (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 165-173.

Wang P, Mugume Y, Bassham DC (2018) New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **80**: 113-122.

Yang C, Shen W, Yang L, Sun Y, Li X, Lai M et al. (2020) HY5-HDA9 module transcriptionally regulates plant autophagy in response to light-to-dark conversion and nitrogen starvation. *Molecular Plant* **13**: 515-531.

Yang MK, Zhu XJ, Chen CM, Guo X, Xu SX, Xu YR et al. (2022) The plant circadian clock regulates autophagy rhythm through transcription factor LUX ARRHYTHMO. *Journal of Integrative Plant Biology*.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

6.1 Tabelas suplementares

Tabela suplementar S1: Análise estatística dos níveis de pigmentos fotossintéticos em rosetas sob em diferentes fotoperíodos (Figura 4).

	Horas	Dias curtos			Dias longos		
		WT	<i>atg5-1</i>	<i>atg7-2</i>	WT	<i>atg5-1</i>	<i>atg7-2</i>
Clorofila a	00h	3,122 ± 0,351 a	3,131 ± 0,191 a	2,434 ± 0,734 a	3,837 ± 0,434 b	6,065 ± 0,630 a	4,444 ± 0,274 ab
	04h	4,235 ± 0,659 a	3,679 ± 0,153 a	3,433 ± 0,627 a	-	-	-
	08h	2,524 ± 0,280 a	3,579 ± 0,436 a	1,789 ± 0,437 a	3,895 ± 0,184 b	3,981 ± 0,407 a	3,713 ± 0,206 ab
	16h	3,439 ± 0,209 a	3,000 ± 0,219 a	2,041 ± 0,537 a	4,195 ± 0,181 b	4,480 ± 0,541 a	4,425 ± 0,309 ab
	20h	-	-	-	3,585 ± 0,149 b	4,211 ± 0,845 a	4,473 ± 0,309 ab
	24h	2,505 ± 0,143 a	3,874 ± 0,352 a	4,104 ± 1,088 a	3,456 ± 0,354 b	4,686 ± 0,277 a	4,618 ± 0,038 ab
Clorofila b	00h	2,266 ± 0,332 Aa	2,296 ± 0,208 Aa	1,765 ± 0,680 ABa	2,032 ± 0,356 b	2,480 ± 0,332 a	2,366 ± 0,046 b
	04h	2,268 ± 0,395 Aa	2,061 ± 0,173 Aa	2,024 ± 0,417 Aa	-	-	-
	08h	1,563 ± 0,249 Aa	2,535 ± 0,499 Aa	1,444 ± 0,423 ABa	2,032 ± 0,073 b	2,461 ± 0,277 a	1,790 ± 0,090 b
	16h	2,082 ± 0,213 Aa	1,717 ± 0,146 Aa	0,987 ± 0,120 Bb	2,045 ± 0,123 b	2,146 ± 0,269 a	2,096 ± 0,0672 b
	20h	-	-	-	2,970 ± 0,668 b	3,715 ± 0,552 a	2,131 ± 0,170 b
	24h	2,648 ± 0,228 Bb	2,308 ± 0,131 Aa	2,167 ± 0,511 Aa	1,704 ± 0,150 b	2,201 ± 0,116 a	2,089 ± 0,044 b
Clorofila a+b	00h	5,388 ± 0,499 b	5,427 ± 0,395 a	4,199 ± 1,405 b	5,869 ± 0,790 b	7,290 ± 0,956 a	6,811 ± 0,310 b
	04h	6,503 ± 1,054 b	5,741 ± 0,288 a	5,458 ± 1,044 b	-	-	-
	08h	4,087 ± 0,529 b	6,115 ± 0,928 a	3,233 ± 0,802 b	5,928 ± 0,241 b	6,442 ± 0,557 a	5,503 ± 0,296 b
	16h	5,522 ± 0,410 b	4,718 ± 0,366 a	2,405 ± 0,405 b	6,240 ± 0,305 b	6,626 ± 0,803 a	6,521 ± 0,373 b
	20h	-	-	-	6,556 ± 0,530 b	7,926 ± 0,442 a	6,604 ± 0,453 b
	24h	3,440 ± 0,118 b	6,183 ± 0,388 a	6,272 ± 1,593 b	5,880 ± 0,504 b	6,888 ± 0,393 a	6,708 ± 0,034 b
Clorofila a/b	00h	1,426 ± 0,225 Aa	1,371 ± 0,048 Aa	1,458 ± 0,143 Aa	1,926 ± 0,106 a	1,931 ± 0,052 a	1,876 ± 0,093 a
	04h	1,879 ± 0,034 Aa	1,803 ± 0,128 Aa	1,711 ± 0,047 Aa	-	-	-
	08h	1,644 ± 0,091 Aa	1,455 ± 0,129 Aa	1,307 ± 0,203 Aa	1,917 ± 0,065 a	1,649 ± 0,195 a	2,073 ± 0,089 a
	16h	1,670 ± 0,105 Aa	1,751 ± 0,023 Aa	1,761 ± 0,078 Aa	2,055 ± 0,034 a	2,093 ± 0,088 a	2,106 ± 0,101 a
	20h	-	-	-	1,520 ± 0,382 a	1,680 ± 0,469 a	2,107 ± 0,101 a
	24h	1,804 ± 0,033 Bb	1,688 ± 0,174 Aa	1,872 ± 0,089 Aa	2,024 ± 0,032 a	2,127 ± 0,013 a	2,212 ± 0,059 a
Carotenoides	00h	1,046 ± 0,125 Aa	1,034 ± 0,043 Aa	0,793 ± 0,261 ABa	1,143 ± 0,089 b	1,384 ± 0,231 a	1,379 ± 0,085 b
	04h	1,275 ± 0,214 Aa	1,197 ± 0,051 Aa	1,127 ± 0,202 Aa	-	-	-
	08h	0,824 ± 0,095 ABb	1,168 ± 0,111 Aa	0,591 ± 0,149 ABb	1,185 ± 0,087 b	1,217 ± 0,116 a	1,145 ± 0,021 b
	16h	1,090 ± 0,077 Aa	0,893 ± 0,078 Ab	0,467 ± 0,076 Bb	1,277 ± 0,070 b	1,428 ± 0,179 a	1,362 ± 0,121 b
	20h	-	-	-	1,319 ± 0,069 b	1,658 ± 0,130 a	1,328 ± 0,078 b
	24h	0,560 ± 0,026 Bb	1,118 ± 0,056 Aa	1,191 ± 0,308 Aa	1,098 ± 0,106 b	1,502 ± 0,091 a	1,429 ± 0,013 b

Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas simples comparam genótipos sob diferentes horários dentro do fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo horário de fotoperíodo.

Tabela suplementar S2: Análise estatística dos níveis de açúcares em rosetas de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fotoperíodos (Figure 5).

		Dias curtos			Dias longos		
	Horas	WT	<i>atg5-1</i>	<i>atg7-2</i>	WT	<i>atg5-1</i>	<i>atg7-2</i>
Glicose	00h	2,168 ± 0,452 Ba	1,543 ± 0,315 Ba	2,055 ± 0,571 Ca	18,722 ± 2,552 Ab	38,144 ± 0,112 Aa	22,248 ± 0,512 Ab
	04h	11,892 ± 1,446 Ac	26,684 ± 2,255 Aa	19,636 ± 2,270 Ab	-	-	-
	08h	6,955 ± 0,775 ABa	6,472 ± 0,378 Ba	10,337 ± 1,642 Ba	15,529 ± 2,164 ABa	12,788 ± 1,381 Ba	12,100 ± 0,934 Ba
	16h	3,641 ± 0,700 Ba	4,906 ± 0,330 Ba	6,515 ± 0,027 BCa	7,548 ± 1,102 BCa	14,315 ± 2,986 Ba	8,563 ± 1,198 Ba
	20h	-	-	-	24,166 ± 1,520 Aa	30,312 ± 2,554 Aa	5,979 ± 0,497 Bb
	24h	2,227 ± 0,341 Ba	5,285 ± 0,631 Ba	2,859 ± 0,291 Ca	4,690 ± 1,003 Cb	13,980 ± 0,179 Ba	10,578 ± 1,784 Bab
Frutose	00h	1,303 ± 0,434 Ba	0,646 ± 0,210 Ba	2,692 ± 0,758 BCa	5,083 ± 0,674 Ba	4,255 ± 0,120 ABa	4,043 ± 0,219 Aa
	04h	3,992 ± 1,524 Bb	13,361 ± 0,288 Aa	9,369 ± 1,681 Bb	-	-	-
	08h	2,879 ± 0,535 Ba	3,080 ± 1,189 Ba	0,743 ± 0,445 Ca	13,669 ± 1,186 Aa	6,518 ± 0,170 Ab	4,341 ± 1,178 Ac
	16h	0,157 ± 0,157 Bb	3,186 ± 0,507 Bb	15,478 ± 2,821 Aa	3,597 ± 0,348 BCa	5,142 ± 0,404 Aa	3,620 ± 0,530 Aa
	20h	-	-	-	3,806 ± 0,253 BCb	6,761 ± 1,240 Aa	2,678 ± 0,240 ABb
	24h	13,541 ± 1,538 Aa	3,965 ± 0,716 Bb	2,505 ± 0,183 BCb	2,414 ± 0,174 Ca	2,461 ± 0,409 Ba	0,463 ± 0,127 Ba
Sacarose	00h	4,978 ± 0,431 Aa	5,543 ± 1,133 Ba	5,300 ± 0,909 BCa	22,210 ± 2,895 Ab	13,572 ± 0,750 Cb	24,020 ± 0,966 Aa
	04h	8,290 ± 0,469 Ab	12,981 ± 0,023 Aab	15,743 ± 0,075 Aa	-	-	-
	08h	8,294 ± 0,882 Aab	10,548 ± 2,609 ABa	3,810 ± 1,737 Cb	17,130 ± 2,461 Aa	13,324 ± 0,387 Ca	17,528 ± 0,77 ABa
	16h	6,071 ± 0,507 Aa	8,170 ± 0,724 ABa	12,035 ± 0,977 ABa	17,906 ± 1,360 Ab	28,254 ± 1,66 ABa	21,338 ± 1,610 Ab
	20h	-	-	-	17,668 ± 1,705 Ab	31,649 ± 2,553 Aa	17,674 ± 0,43 ABb
	24h	9,320 ± 2,802 Aa	7,732 ± 0,186 ABa	3,660 ± 1,732 BCa	17,751 ± 1,177 Aab	20,862 ± 0,30 BCa	11,960 ± 2,543 Bb
Amido	00h	0,100 ± 0,012 a	0,087 ± 0,0176 a	0,059 ± 0,010 a	0,030 ± 0,015 Ba	0,024 ± 0,0003 Bb	0,032 ± 0,005 Bab
	04h	0,177 ± 0,040 a	0,272 ± 0,0004 a	0,181 ± 0,081 a	-	-	-
	08h	0,351 ± 0,036 a	0,330 ± 0,125 a	0,175 ± 0,096 a	0,085 ± 0,0006 Aa	0,102 ± 0,0003 Aa	0,049 ± 0,004 ABb
	16h	0,118 ± 0,028 a	0,058 ± 0,0004 a	0,055 ± 0,012 a	0,101 ± 0,010 Aa	0,109 ± 0,0004 Aa	0,066 ± 0,0009 Ab
	20h	-	-	-	0,037 ± 0,0002 Ba	0,038 ± 0,0003 Ba	0,045 ± 0,004 ABa
	24h	0,023 ± 0,003 a	0,022 ± 0,0003 a	0,019 ± 0,0001 a	0,037 ± 0,0004 Ba	0,030 ± 0,0001 Ba	0,030 ± 0,0008 Ba

Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas simples comparam genótipos sob diferentes horários dentro do fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo horário de fotoperíodo.

Tabela suplementar S3: Análise estatística dos níveis de ácidos orgânicos em rosetas de *A. thaliana* em diferentes fotoperíodos (Figure 6).

		Dias curtos			Dias longos		
	Horas	WT	<i>atg5-1</i>	<i>atg7-2</i>	WT	<i>atg5-1</i>	<i>atg7-2</i>
Aminoácido	00h	2,466 ± 0,233 Bb	2,475 ± 0,329 Cb	4,670 ± 0,356 Aa	6,861 ± 0,33 ABa	7,303 ± 0,073 Ba	7,680 ± 0,075 Ba
	04h	1,990 ± 0,499 Bb	6,020 ± 0,284 Aa	4,359 ± 0,527 ABa	-	-	-
	08h	5,087 ± 0,375 Aa	5,596 ± 0,697 ABa	5,710 ± 0,743 Aa	7,020 ± 1,06 ABa	1,707 ± 0,028 Cb	6,953 ± 0,160 Ba
	16h	6,262 ± 0,692 Aa	3,511 ± 0,418 BCb	2,175 ± 0,454 Bb	4,195 ± 1,07 Bb	11,278 ± 0,869 Aa	13,858 ± 1,259 Aa
	20h	-	-	-	8,602 ± 0,21 Aab	9,698 ± 1,664 ABa	6,806 ± 1,188 Bb
	24h	3,060 ± 0,665 Bb	5,560 ± 0,634 ABa	4,658 ± 0,867 Aa	5,074 ± 0,004 Bb	8,830 ± 0,378 ABa	11,231 ± 0,543 Aa
Proteínas diluídas	00h	205,052 ± 42,90 BCb	322,827 ± 38,593 Aa	190,272 ± 84,72 ABb	111,084 ± 8,10 Aa	102,681 ± 8,10 ABa	115,440 ± 18,33 Aa
	04h	377,663 ± 12,395 Aa	280,134 ± 27,952 Aa	268,043 ± 20,35 Aa	-	-	-
	08h	202,832 ± 12,547 BCa	290,345 ± 41,429 Aa	181,127 ± 19,13 ABa	92,888 ± 10,71 Aa	67,926 ± 5,012 Ba	75,952 ± 4,639 Aa
	16h	245,936 ± 40,108 ABa	67,042 ± 3,514 Bb	59,207 ± 27,54 BCb	71,620 ± 4,78 Aa	65,176 ± 12,77 Ba	97,736 ± 9,642 Aa
	20h	-	-	-	75,151 ± 7,44 Ab	114,092 ± 11,70 Aa	104,986 ± 5,15 Aab
	24h	74,032 ± 0,844 Ca	73,857 ± 4,920 Ba	46,878 ± 2,925 Ca	72,242 ± 1,48 Aa	99,692 ± 7,78 ABa	92,429 ± 16,612 Aa
Malato	00h	7,331 ± 0,904 ABa	6,642 ± 1,132 Ba	6,181 ± 1,562 Ba	3,211 ± 0,790 b	6,477 ± 0,820 a	3,4790 ± 0,593 c
	04h	9,078 ± 1,347 ABb	11,880 ± 0,826 Bb	26,635 ± 2,059 Aa	-	-	-
	08h	15,739 ± 1,226 Ab	27,039 ± 1,460 Aa	34,496 ± 3,338 Aa	5,800 ± 0,811 b	5,160 ± 1,629 a	2,536 ± 0,482 c
	16h	6,697 ± 1,510 ABa	5,055 ± 1,010 Ba	3,145 ± 0,612 Ba	4,599 ± 1,261 b	5,375 ± 1,928 a	2,756 ± 0,142 c
	20h	-	-	-	4,394 ± 0,125 b	6,071 ± 1,158 a	3,659 ± 0,184 c
	24h	0,648 ± 0,323 Ba	5,163 ± 1,188 Ba	0,735 ± 0,221 Ba	4,745 ± 0,550 b	9,077 ± 0,365 a	2,252 ± 0,695 c
Fumarato	00h	23,865 ± 3,041 Aa	13,086 ± 1,969 Bb	13,903 ± 2,03 BCb	20,017 ± 0,80 Ca	18,592 ± 2,377 Aa	21,976 ± 5,053 Aa
	04h	23,344 ± 3,195 Aa	28,808 ± 0,907 Aa	18,898 ± 3,907 ABa	-	-	-
	08h	20,655 ± 2,127 Ab	33,021 ± 3,968 Aa	28,235 ± 2,418 Aab	32,609 ± 5,58 ABa	20,397 ± 2,624 Ab	9,890 ± 1,088 Bc
	16h	14,295 ± 0,690 ABa	16,124 ± 1,522 Ba	6,486 ± 4,135 CDa	25,960 ± 5,21 BCa	20,668 ± 1,052 Aa	6,461 ± 0,834 Bb
	20h	-	-	-	42,683 ± 3,083 Aa	19,558 ± 0,480 Ab	11,209 ± 0,648 ABb
	24h	4,801 ± 0,752 Ba	7,048 ± 1,616 Ba	2,147 ± 0,586 Da	26,851 ± 3,45 BCa	24,522 ± 0,630 Aa	7,520 ± 2,147 Bb

Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas simples comparam genótipos sob diferentes horários do fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo horário de fotoperíodo.

Tabela suplementar S4: Análise estatística de expressão gênica dos genes *ATGs* no tipo selvagem (WT) em rosetas em resposta a variações no fotoperíodo (Figura 7).

	Dias curtos		Dias longos	
	Horas			
ATG2	00h	1,813 ± 0,960 A		0,372 ± 0,025 B
	04h	0,826 ± 0,033 A		-
	08h	0,923 ± 0,054 A		9,059 ± 0,306 A
	16h	0,673 ± 0,224 A		10,222 ± 2,893 A
	20h	-		0,471 ± 0,104 B
	24h	0,802 ± 0,203 A		0,564 ± 0,085 B
	ATG5	00h	0,461 ± 0,325 B	
04h		0,617 ± 0,251 AB		-
08h		1,384 ± 0,218 AB		1,384 ± 0,518 A
16h		1,818 ± 0,606 A		1,691 ± 0,348 A
20h		-		0,173 ± 0,000 B
24h		0,985 ± 0,298 AB		0,000 ± 0,000 B
ATG7		00h	0,904 ± 0,904 A	
	04h	0,982 ± 0,553 A		-
	08h	0,701 ± 0,589 A		0,896 ± 0,029 B
	16h	1,310 ± 0,437 A		0,942 ± 0,547 B
	20h	-		1,023 ± 0,194 A
	24h	1,260 ± 0,630 A		2,460 ± 0,019 A
	ATG8h	00h	1,664 ± 0,184 A	
04h		0,766 ± 0,436 AB		-
08h		0,308 ± 0,141 B		0,965 ± 0,347 AB
16h		1,463 ± 0,398 AB		0,672 ± 0,019 AB
20h		-		0,884 ± 0,063 AB
24h		0,926 ± 0,531 AB		0,414 ± 0,187 B
ATG18a		00h	1,319 ± 0,201 A	
	04h	0,983 ± 0,111 AB		-
	08h	1,046 ± 0,029 AB		1,438 ± 0,132 A
	16h	0,629 ± 0,209 B		0,610 ± 0,297 A
	20h	-		0,379 ± 0,088 A
	24h	0,844 ± 0,170 AB		1,904 ± 0,831 A

Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas simples comparam genótipos sob diferentes horários do fotoperíodo.

Tabela suplementar S5: Análise estatística de expressão gênica dos genes relacionados ao ciclo circadiano em *Arabidopsis thaliana* em resposta a variações no fotoperíodo (Figura 8).

	Horas	Dias curtos		Dias longos		
		WT	<i>atg5-1</i>	WT	<i>atg5-1</i>	<i>atg7-2</i>
SOG1	00h	1,330 ± 0,233 Aa	0,460 ± 0,121 Bb	0,240 ± 0,0004 Ba	0,060 ± 0,0003 Aa	0,200 ± 0,051 Aa
	08h	1,730 ± 0,199 Aa	1,620 ± 0,149 Aa	-	-	-
	16h	-	-	10,420 ± 0,873 Aa	0,330 ± 0,058 Ab	0,200 ± 0,037 Ab
	24h	0,650 ± 0,010 Ba	0,660 ± 0,0002 Ba	0,220 ± 0,019 Ba	0,050 ± 0,0006 Aa	0,200 ± 0,040 Aa
TOC1	00h	0,440 ± 0,123 Ba	0,640 ± 0,076 ABa	0,140 ± 0,0007 Ca	0,020 ± 0,0002 Aa	0,050 ± 0,0007 Aa
	08h	1,550 ± 0,156 Aa	1,330 ± 0,033 Aa	-	-	-
	16h	-	-	1,600 ± 0,204 Ba	0,00004 ± 0,00001 Ab	0,060 ± 0,011 Ab
	24h	2,000 ± 0,474 Aa	0,080 ± 0,0002 Bb	2,940 ± 0,390 Aa	0,150 ± 0,024 Ab	0,040 ± 0,0007 Ab
LHY	00h	1,480 ± 0,163 Ba	0,510 ± 0,049 Ab	3,380 ± 0,470 Aa	0,340 ± 0,050 Ab	0,730 ± 0,030 Ab
	08h	0,600 ± 0,068 Ca	0,520 ± 0,051 Aa	-	-	-
	16h	-	-	0,790 ± 0,098 Ca	0,860 ± 0,015 Aa	0,710 ± 0,060 Aa
	24h	2,730 ± 0,361 Aa	0,470 ± 0,0002 Ab	2,220 ± 0,567 Ba	0,360 ± 0,135 Ab	0,040 ± 0,011 Ab
CCA1	00h	1,230 ± 0,069 a	0,880 ± 0,058 a	4,760 ± 0,123 Aa	0,130 ± 0,105 Ab	0,500 ± 0,109 Ab
	08h	0,800 ± 0,069 a	0,830 ± 0,026 a	-	-	-
	16h	-	-	0,130 ± 0,0002 Ca	0,080 ± 0,0003 Aa	0,480 ± 0,082 Aa
	24h	1,100 ± 0,191 a	1,070 ± 0,038 a	2,700 ± 0,511 Ba	0,569 ± 0,175 Ab	0,280 ± 0,098 Ab

Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas simples comparam genótipos sob diferentes horários do fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo horário de fotoperíodo.