

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ISABELA DE CARVALHO CONTESOTO

EFEITOS DO L-TRIPTOFANO E SEUS DERIVADOS  
5-HIDROXITRIPTOFANO, TRIPTAMINA E MELATONINA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ESPÉCIES DE CULTIVO E DE PLANTAS  
DANINHAS

MARINGÁ  
2020

ISABELA DE CARVALHO CONTESOTO

EFEITOS DO L-TRIPTOFANO E SEUS DERIVADOS  
5-HIDROXITRIPTOFANO, TRIPTAMINA E MELATONINA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ESPÉCIES DE CULTIVO E DE PLANTAS  
DANINHAS

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas (área de concentração –  
Biologia Celular e Molecular) da  
Universidade Estadual de Maringá para  
a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biológicas

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Emy Luiza  
Ishii-Iwamoto

Maringá  
2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

C761e

Contesoto, Isabela de Carvalho

Efeitos do L-triptofano e seus derivados 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre o desenvolvimento inicial de espécies de cultivo e de plantas daninhas / Isabela de Carvalho Contesoto. -- Maringá, PR, 2020.

91 f.color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Emy Luiza Ishii-Iwamoto.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2020.

1. Plantas daninhas. 2. Fitormônios. 3. Bioestimulantes. I. Ishii-Iwamoto, Emy Luiza, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 571.975.2

ISABELA DE CARVALHO CONTESOTO

EFEITOS DO L-TRIPTOFANO E SEUS DERIVADOS  
5-HIDROXITRIPTOFANO, TRIPTAMINA E MELATONINA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ESPÉCIES DE CULTIVO E DE PLANTAS  
DANINHAS

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas (área de concentração –  
Biologia Celular e Molecular) da  
Universidade Estadual de Maringá para  
a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biológicas

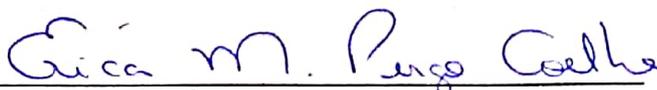
Aprovado em: 21/02/2020

Banca Examinadora



---

Profª Draª Emy Luiza Ishii Iwamoto (Presidente)  
Universidade Estadual de Maringá



---

Profª Dra. Érica Marusa Pergo Coelho  
Departamento de Ciências Agrônomicas  
Universidade Estadual de Maringá – Câmpus Umuarama



---

Prof. Dr. Rodrigo Polimeni Constantin  
Departamento de Bioquímica  
Universidade Estadual de Maringá

## BIOGRAFIA

ISABELA DE CARVALHO CONTESOTO nasceu em Maringá/PR, em 26 de março de 1996. Possui graduação em Bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá (2018). Em março de 2018 iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Celular e Molecular na Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, PR.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Deoclides e Cristina, e à minha irmã Paula por acreditarem em mim e na minha capacidade e darem todo suporte necessário para que fosse possível concluir mais essa etapa.

Ao Lucas, por toda paciência, compreensão e companheirismo durante esta jornada.

À minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup> Emy Luiza Ishii-Iwamoto, pela oportunidade, pela confiança e por todo conhecimento compartilhado desde a iniciação científica.

À Gislaine e ao Márcio, pela disponibilidade e esforço em fazer com que os experimentos deste trabalho fossem possíveis, a ajuda deles foi essencial.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Bioquímica de Plantas Daninhas (BPD), Paulo, Ana Luíza, Gabriel, Erika e Júlio pela ajuda e pela parceria diária durante os experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Esteatose Experimental, pela convivência diária.

À minha amiga Larissa, parceira desde a graduação, pelo apoio incondicional e mútuo, com quem pude compartilhar dos melhores e dos mais desafiadores momentos durante o curso de mestrado.

À Gabriela, pelo incentivo, pelas palavras de apoio e pela amizade de sempre.

Ao CNPq, bela bolsa de mestrado concedida.

## APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido ao periódico Plant Physiology and Biochemistry

Isabela de Carvalho Contesoto, Gislaine Cristiane Mantovanelli, Márcio Shigueaki Mito, Paulo Vinicius Moreira da Costa Menezes, Gabriel Felipe Stulp, Julio Salomão, Emy Luiza Ishii-Iwamoto. EFEITOS DO L-TRIPTOFANO E SEUS DERIVADOS 5 HIDROXITRIPTOFANO, TRIPTAMINA E MELATONINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ESPÉCIES DE CULTIVO E DE PLANTAS DANINHAS

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS** – Atualmente, existe uma forte demanda por novos agroquímicos baseados em substâncias naturais, que protejam as culturas de perdas de produtividade decorrentes de condições de estresse a que são submetidas no campo e que, também, possam reduzir o uso de herbicidas e pesticidas sintéticos. Entre essas substâncias estão os bioestimuladores, definidos como substâncias não tóxicas de origem natural capazes de melhorar e estimular processos vegetais. Sua influência nas plantas não é consequência da regulação metabólica direta de processos particulares, como agem os fitormônios, mas sua ação pode ser multidirecional, influenciando geralmente o metabolismo celular. O L-triptofano é um dos precursores da auxina, ácido indolacético (AIA) e também da melatonina. Tanto o L-triptofano quanto a melatonina são considerados bioestimuladores. Entretanto, a maior parte dos relatos dos efeitos bioestimuladores de ambos os compostos resultou de estudos realizados em espécies de cultivo. Não há relatos de suas ações em plantas daninhas. No campo as plantas daninhas competem com as culturas por recursos como nutrientes, água e luz causando perdas de rendimento das mesmas. Um aumento na competitividade das culturas em relação às plantas daninhas tem o potencial de reduzir as perdas de rendimento das mesmas. Desta forma é essencial que se avalie os efeitos de um eventual bioestimulador não somente sobre as culturas de interesse, mas também sobre as espécies de plantas daninhas que comumente infestam as áreas cultivadas. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da aplicação exógena de melatonina e também de seu precursor inicial o aminoácido L-triptofano sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de várias espécies, dentre elas duas culturas de interesse, *Glicine max* (soja) e *Zea mays* (milho) e seis plantas daninhas, *Amaranthus hybridus* L. (caruru-roxo), *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Digitaria insularis* L. Fedde (capim-amargoso), *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo), *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donnel (corda-de-viola) e *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (capim-braquiária). Foram testados também os efeitos da aplicação exógena de dois intermediários da síntese de melatonina, o 5-hidroxitriptofano e a triptamina. A triptamina é um intermediário da síntese de auxinas a partir do L-triptofano. Para identificar os possíveis mecanismos de ação dos quatro compostos foram avaliados vários parâmetros bioquímicos essenciais para a germinação e o desenvolvimento inicial de uma cultura, a *Z. mays* e de uma planta daninha, a *E. heterophylla*, espécies nas quais os tratamentos tiveram maiores efeitos. Foram avaliados parâmetros do metabolismo energético, atividade do sistema antioxidante, atividade de enzimas chaves do metabolismo de açúcares e de compostos nitrogenados. A captação de melatonina em *E. heterophylla* crescida em meio de hidroponia foi também avaliada.

**MATERIAIS E MÉTODOS** – As sementes de *G. max*, *Z. mays*, *A. hybridus*, *B. pilosa*, *D. insularis*, *E. heterophylla*, *I. grandifolia* e *U. decumbens* foram distribuídas em gerboxes contendo papel germitest embebidas com água (controle) ou soluções de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina ou melatonina, em concentrações variando de 5 a 500 µM. As gerboxes com as sementes foram expostas à luz UV, envoltas com plástico filme e distribuídas em uma câmara de germinação com fotoperíodo e temperatura específicos para cada espécie. As sementes germinadas foram contadas a cada 24 horas para a

determinação do tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e velocidade de germinação acumulada (VGA). Ao final do período de crescimento de cada espécie, o comprimento e o peso (fresco e seco) das raízes e partes aéreas das plântulas foram determinados. Em raízes de *Z. mays* e *E. heterophylla* foram avaliadas: a atividade respiratória dos ápices das raízes por polarografia; o conteúdo total de espécies reativas de oxigênio (EROs) usando o 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCF) e o nível de peroxidação lipídica pela quantificação de malondialdeído (MDA) e dienos conjugados. Nos homogenatos das raízes de *Z. mays* e *E. heterophylla* foram avaliadas por métodos espectrofotométricos as atividades das seguintes enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), glutatona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APx), glicocinase (GK), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), piruvato-cinase (PK), malato desidrogenase (MDH) e glutamina sintetase (GS). Características morfológicas das raízes de *E. heterophylla* foram examinadas por microscopia estereoscópica. A captação de melatonina por *E. heterophylla* foi avaliada por medidas da depleção da melatonina no meio de incubação num sistema de hidroponia. A melatonina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

**RESULTADOS** – Os principais resultados obtidos neste estudo foram os seguintes:

1) A comparação dos efeitos L-triptofano e da melatonina sobre os índices de germinação das cinco espécies eudicotiledôneas e três monocotiledôneas testadas revelou que: o L-triptofano estimulou ao menos um índice de germinação de *G. max* e *B. pilosa*, mas reduziu o IVG e a VGA de *E. heterophylla*; os índices de germinação das outras espécies não foram alterados pelo L-triptofano; a melatonina foi mais ativa do que o L-triptofano, pois com exceção da *U. decumbens* e a *Z. mays* todas as outras tiveram algum índice de germinação modificado, com estímulo em *A. hybridus*, *D. insularis* e *I. grandifolia* e redução em *B. pilosa* e *E. heterophylla*; a melatonina aumentou o TMG de *G. max*.

2) Os efeitos do L-triptofano e da melatonina sobre o desenvolvimento inicial das plântulas das oito espécies revelou que no tratamento em eudicotiledôneas, o L-triptofano foi mais ativo do que a melatonina, modificando o crescimento de algumas espécies em baixas concentrações (5 a 20  $\mu\text{M}$ ). O L-triptofano estimulou o crescimento de *A. hybridus*, mas inibiu o crescimento de *B. pilosa*, *E. heterophylla* e *I. grandifolia*. A melatonina em concentrações maiores inibiu apenas o crescimento de *E. heterophylla*. O crescimento das três espécies de monocotiledôneas (*D. insularis*, *U. decumbens* e *Z. mays*) não foi alterado pela melatonina e o L-triptofano inibiu apenas o crescimento de *D. insularis*.

3) A comparação dos efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre as duas espécies selecionadas, a *E. heterophylla* e a *Z. mays* revelou que o 5-hidroxitriptofano e a triptamina não afetaram a germinação de *Z. mays*, mas a triptamina reduziu o crescimento das raízes e estimulou o crescimento da parte aérea de *Z. mays*. Em *E. heterophylla* todos os quatro compostos inibiram o desenvolvimento das plântulas. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para a redução no comprimento das raízes pelo 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina foram de 350,4  $\mu\text{M}$ ; 244,24  $\mu\text{M}$  e 85,09  $\mu\text{M}$  respectivamente. O L-triptofano foi o menos ativo.

4) A atividade respiratória dos ápices radiculares de *Z. mays* e de *E. heterophylla* foi pouco afetada pelos quatro compostos testados. Somente a melatonina

exercer uma inibição de cerca de 35 % sobre a respiração via citocromo-oxidase (COX, KCN-sensível) tanto em *E. heterophylla* quanto em *Z. mays*. O 5-hidroxitriptofano estimulou a respiração KCN-insensível em raízes de *Z. mays*. 5) O 5-hidroxitriptofano, a triptamina e a melatonina estimularam a produção de EROs tanto em raízes de *Z. mays* como de *E. heterophylla*. Entretanto, o conteúdo de MDA e de dienos conjugados aumentou apenas nas raízes de plântulas de *E. heterophylla* tratadas com melatonina.

6) Em raízes de *E. heterophylla* a atividade da CAT foi inibida pelo 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina. A POD foi estimulada pelo 5-hidroxitriptofano. Em raízes de *Z. mays*, a triptamina estimulou a CAT a POD e a GR. A melatonina inibiu a CAT e a POD. As atividades da SOD, GR e APx de raízes de *Z. mays* e de *E. heterophylla* não foram modificadas por nenhum dos quatro compostos testados.

7) Em *E. heterophylla* foi observado um estímulo da GK pelo L-triptofano e pela triptamina. Por outro lado, a melatonina inibiu a GK. A triptamina ativou também a G6PD. A PK, MDH e GS não foram modificadas. Nenhuma dessas enzimas das raízes de *Z. mays* foram alteradas pelos quatro compostos.

8) As imagens de microscopia das raízes de *E. heterophylla* revelaram que os quatro compostos alteraram a morfologia das raízes. Além de mais curtas, as raízes ficaram mais grossas e com muitos pelos radiculares em toda a extensão da raiz. Além disso, efeitos distintos foram observados: as raízes das plântulas tratadas com 5-hidroxitriptofano apresentaram regiões morfológicamente distintas mais finas e sem pelos, as tratadas com melatonina apresentaram crescimento assimétrico e o tratamento com triptamina gerou raízes retorcidas.

9) As plântulas de *E. heterophylla* crescidas na presença de melatonina em sistema de hidroponia apresentaram redução no comprimento da raiz principal e também no número de raízes laterais. A dosagem por CLAE da melatonina remanescente no meio de incubação revelou um rápido desaparecimento da melatonina, que foi acompanhado do aparecimento de dois metabólitos denominados de MI e MII. A efetiva captação da melatonina iniciou no tempo de 36 horas e, após 72 horas, toda a melatonina foi captada. Uma fração sofreu degradação espontânea. No tempo de 96 horas a quantidade captada foi de 1,82  $\mu$ moles por cada plântula.

DISCUSSÃO: Este estudo revelou que o L-triptofano e a melatonina, na faixa de concentração de 5 a 500  $\mu$ M, não exerceram efeito bioestimulante significativo em duas culturas, *G. max* e *Z. mays* e em seis plantas daninhas, *A. hybridus*, *B. pilosa*, *I. grandifolia*, *E. heterophylla*, *U. decumbens* e *D. insularis*. Ao contrário, ambos exerceram efeitos negativos no desenvolvimento de algumas plantas daninhas. A comparação dos efeitos do L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina em *E. heterophylla* e *Z. mays* revelou ações distintas da triptamina e da melatonina nas duas espécies. Em *Z. mays* os derivados indólicos foram pouco ativos e os efeitos da triptamina e a melatonina foram, em geral, de natureza benéfica. A triptamina, mas não a melatonina, estimulou o crescimento da parte aérea de *Z. mays*, sugerindo ações independentes dos dois compostos. É possível que a metabolização da triptamina em auxinas tenha contribuído para as suas ações em *Z. mays*. Esta interpretação não se aplica aos efeitos verificados em *E. heterophylla*, já que a triptamina, tal como o L-triptofano, 5-hidroxitriptofano e melatonina inibiram tanto o desenvolvimento das raízes como da parte aérea. As medidas de atividade respiratória das raízes e da atividade de algumas enzimas chaves do metabolismo de carboidratos e de

compostos nitrogenados revelaram que uma interferência no metabolismo energético não foi o principal fator que levou à redução no desenvolvimento das plântulas de *E. heterophylla*, embora possa ter contribuído, em parte ao menos, para o efeito da melatonina. Nos tratamentos com o 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina, um aumento significativo na quantidade de EROs foi encontrado nas raízes tanto de *Z. mays* como de *E. heterophylla*. Normalmente, quando há um excesso de EROs, o sistema de defesa antioxidante é estimulado com aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Entretanto, não foram observadas alterações significativas nas atividades da SOD, GR e APx em nenhum dos tratamentos, seja em *Z. mays* ou em *E. heterophylla*. As análises morfológicas das raízes de *E. heterophylla* revelou que em todos os tratamentos no qual o conteúdo de EROs encontrava-se aumentado, foram visualizados um aumento significativo de pelos radiculares. O aumento de EROs na região crescente da célula ciliada das raízes faz parte do mecanismo que estabelece a polaridade dos pelos radiculares. As auxinas e o etileno são os principais promotores da morfogênese dos pelos radiculares. O etileno estimula o desenvolvimento dos pelos por uma via independente de auxina, visto que níveis elevados de etileno, mas não de auxinas, induzem a formação ectópica de células ciliadas na raiz primária. Esse fenômeno foi evidenciado nas raízes especialmente no tratamento com melatonina. Além de compartilhar algumas ações sobre o desenvolvimento radicular, cada derivado indólico exerceu alterações morfológicas distintas e que estariam também associadas às interferências no equilíbrio dos fitormônios. A comparação dos efeitos dos quatro derivados indólicos testados permite concluir que, embora alguns efeitos, como a redução no crescimento radicular em *E. heterophylla* tenha sido compartilhada por todos os derivados, a maior parte das ações do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano e da triptamina não podem ser creditados à geração intracelular de melatonina.

**CONCLUSÃO:** Nosso estudo revelou que L-triptofano e seus derivados 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina exercem um fraco efeito bioestimulante em *Z. mays*, mas são tóxicas para a planta daninha *E. heterophylla*, especialmente a triptamina e a melatonina. A inibição no desenvolvimento das plântulas de *E. heterophylla* parece ser causada, em parte, por interferências na ação dos fitormônios, levando a um predomínio das ações do etileno. A melatonina exerce efeitos citotóxicos adicionais, indicada pela inibição na atividade respiratória mitocondrial e por danos oxidativos nas raízes. No contexto de uma agricultura ecológica sustentável, nosso estudo corroborou o potencial de aplicação dos derivados do L-triptofano, especialmente da triptamina e da melatonina na proteção de cultivos, ao reduzirem a capacidade competitiva das plantas daninhas.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES:** Currently, there is a strong demand for new agrochemicals based on natural substances, which protect crops from loss of productivity resulting from stress conditions which they are subjected in the field, and which can also reduce the use of synthetic herbicides and pesticides. Among these substances are the biostimulators, defined as non-toxic substances of natural origin capable of improving and stimulating plant processes. Their influence on plants are not a consequence of direct metabolic regulation of particular processes, as the phytohormones act, but their action can be multidirectional, generally influencing cellular metabolism. L-tryptophan is one of the precursors of auxin indolacetic acid (AIA) and also of melatonin. Both L-tryptophan and melatonin are considered biostimulators. However, most reports of the biostimulatory effects of both compounds resulted from studies carried out on crop species. There are no reports of their actions on weeds. In the field, weeds compete with crops for resources such as nutrients, water and light causing loss of yield. An increase in the competitiveness of crops in relation to weeds has the potential to reduce losses in crop yield. Thus, it is essential to evaluate the effects of a possible biostimulator not only on the crops of interest, but also on the species of weeds that commonly infest the cultivated areas. Thus, the objective of this study was to compare the effects of the exogenous application of melatonin and also of its initial precursor the amino acid L-tryptophan on the germination and the initial development of several species, among them two crops of interest, *Glicine max* (soy) and *Zea mays* (corn) and six weeds, *Amaranthus hybridus* L. (caruru-roxo), *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Digitaria insularis* L. Fedde (capim-amargoso), *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo), *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donnel (corda-de-viola) e *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (capim-braquiária). The effects of the exogenous application of two melatonin synthesis intermediates, 5-hydroxytryptophan and tryptamine, were also tested. Tryptamine is an intermediate in the synthesis of auxins from L-tryptophan. To identify the possible mechanisms of action of the four compounds, several biochemical parameters essential for germination and the initial development of a culture, *Z. mays* and a weed, *E. heterophylla*, were evaluated. Energy metabolism parameters, antioxidant system activity, activity of key enzymes in the metabolism of sugars and nitrogen compounds were evaluated. The uptake of melatonin in *E. heterophylla* grown in hydroponic system was also evaluated.

**MATERIALS AND METHODS** - The seeds of *G. max*, *Z. mays*, *A. hybridus*, *B. pilosa*, *D. insularis*, *E. heterophylla*, *I. grandifolia* and *U. decumbens* were distributed in gerboxes containing germitest paper soaked with water (control) or solutions of L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan, tryptamine or melatonin, in a concentration range of 5 to 500  $\mu\text{M}$ . The gerboxes with the seeds were exposed to UV light, wrapped with plastic wrap and distributed in a germination chamber with specific photoperiod and temperature for each species. The germinated seeds were counted every 24 hours to determine the average germination time (AGT), germination speed index (GSI) and accumulated germination speed (AGS). At the end of the growth period of each species, the length and weight (fresh and dry) of the roots and aerial parts of the seedlings were determined. In the roots of *Z. mays* and *E. heterophylla* were evaluated: the respiratory activity of the root apexes by polarography; the content of reactive oxygen species (ROS)

using dichlorofluorescein 2',7'-diacetate (DCF); the level of lipid peroxidation by the quantification of malondialdehyde (MDA) and conjugated dienes. In the homogenates of the roots of *Z. mays* and *E. heterophylla*, the activities of the following enzymes were evaluated by spectrophotometric methods: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), glutathione reductase (GR), ascorbate peroxidase (APx), glycokinase (GK), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), pyruvate kinase (PK), malate dehydrogenase (MDH) and glutamine synthetase (GS). Morphological characteristics of *E. heterophylla* roots were examined by stereoscopic microscopy. The uptake of melatonin by *E. heterophylla* was evaluated by measurements of melatonin depletion in the incubation medium in a hydroponic system. Melatonin was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC).

RESULTS - The main results obtained in this study were as follows:

1) The comparison of the L-tryptophan and melatonin effects on the germination rates of the five eudicotyledon and three monocotyledon species tested revealed that: L-tryptophan stimulated at least one germination index of *G. max* and *B. pilosa*, but reduced the GSI and AGS of *E. heterophylla*; the germination rates of other species were not altered by L-tryptophan; melatonin was more active than L-tryptophan, because except for *U. decumbens* and *Z. mays*, all others species had modified some germination index, with stimulus in *A. hybridus*, *D. insularis* and *I. grandifolia* and reduction in *B. pilosa* and *E. heterophylla*; melatonin increased the AGT of *G. max*.

2) The effects of L-tryptophan and melatonin on the initial seedling development of the eight species revealed that in eudicotyledons, L-tryptophan was more active than melatonin, modifying the growth of some species at low concentrations (5 at 20  $\mu\text{M}$ ). L-tryptophan stimulated the growth of *A. hybridus*, but inhibited the growth of *B. pilosa*, *E. heterophylla* and *I. grandifolia*. Melatonin in higher concentrations only inhibited the growth of *E. heterophylla*. The growth of the three monocot species (*D. insularis*, *U. decumbens* and *Z. mays*) was not affected by melatonin and L-tryptophan inhibited only the growth of *D. insularis*.

3) Comparison of the effects of L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan, tryptamine and melatonin on the two selected species, *E. heterophylla* and *Z. mays* revealed that 5-hydroxytryptophan and tryptamine did not affect the germination of *Z. mays*, but tryptamine reduced root growth and stimulated the growth of the aerial part of *Z. mays*. In *E. heterophylla*, all four compounds inhibited seedling development. The  $\text{IC}_{50}$  values for the reduction in root length by 5-hydroxytryptophan, tryptamine and melatonin were 350.4  $\mu\text{M}$ ; 244.24  $\mu\text{M}$  and 85.09  $\mu\text{M}$  respectively. Tryptophan was the least active.

4) The respiratory activity of the root apices of *Z. mays* and *E. heterophylla* was little affected by the four compounds tested. Only melatonin exerted a 35 % inhibition of respiration via cytochrome oxidase (COX, KCN-sensitive) in both *E. heterophylla* and *Z. mays*. 5-hydroxytryptophan stimulated KCN-insensitive respiration in *Z. mays* roots.

5) 5-Hydroxytryptophan, tryptamine and melatonin stimulated the production of ROS in both *Z. mays* and *E. heterophylla* roots. However, the content of MDA and conjugated dienes increased only in the roots of *E. heterophylla* seedlings treated with melatonin.

6) In *E. heterophylla* roots, CAT activity was inhibited by 5-hydroxytryptophan, tryptamine and melatonin. POD was stimulated by 5-hydroxytryptophan. In *Z. mays* roots, tryptamine stimulated CAT, POD and GR. Melatonin inhibited CAT

and POD. The activities of SOD, GR and APx from roots of *Z. mays* and *E. heterophylla* were not modified by any of the four compounds tested.

7) In *E. heterophylla*, L-tryptophan and tryptamine stimulated GK activity. On the other hand, melatonin inhibited GK. Tryptamine also activated G6PDH. PK, MDH and GS were not modified. None of these enzymes were altered by the four compounds in the roots of *Z. mays*.

8) Microscopy images revealed that the four compounds altered the root morphology of *E. heterophylla*. In addition to being shorter, the roots became thicker and with many root hairs along the entire length of the root. Moreover, distinct effects were observed: the roots of the seedlings treated with 5-hydroxytryptophan showed thinner and hairless morphologically distinct regions, those treated with melatonin showed asymmetric growth and treatment with tryptamine generated twisted roots.

9) *E. heterophylla* seedlings grown in the presence of melatonin, in a hydroponic system, exhibited a reduction in the primary root length and also in the number of lateral roots. HPLC measurement of the remaining melatonin in the incubation medium revealed a rapid disappearance of melatonin, which was accompanied by the appearance of two metabolites called MI and MII. Effective melatonin uptake, started at 36 hours and, after 72 hours, all melatonin was depleted. A fraction suffered spontaneous degradation. In 96 hours, the amount captured was 1.82  $\mu$ moles for each seedling.

DISCUSSION: This study revealed that L-tryptophan and melatonin, in the concentration range of 5 to 500  $\mu$ M, did not exert a significant biostimulant effect in two cultures, soy (*G. max*) and corn (*Z. mays*) and in six weeds, *A. hybridus*, *B. pilosa*, *I. grandifolia*, *E. heterophylla*, *U. decumbens* and *D. insularis*. On the contrary, both had negative effects on the development of some weeds. The comparison of the effects of L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan, tryptamine and melatonin in *E. heterophylla* and *Z. mays* revealed different actions of tryptamine and melatonin in the two species. In *Z. mays*, the indole derivatives were not very active and the effects of tryptamine and melatonin were, in general, of a beneficial nature. Tryptamine, but not melatonin, stimulated the growth of the aerial part of *Z. mays*, suggesting independent actions by the two compounds. It is possible that the metabolization of tryptamine in auxins contributed to its actions in *Z. mays*. This interpretation does not apply to the effects seen in *E. heterophylla*, since tryptamine, like L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan and melatonin inhibited both root and shoot development. The measurement of respiratory activity of the roots, and of the activity of some key enzymes of the metabolism of carbohydrate and nitrogen compound, revealed that an interference in the energy metabolism was not the main factor that led to the reduction in the development of *E. heterophylla* seedlings, although it may have contributed, at least in part, to the effect of melatonin. In treatments with 5-hydroxytryptophan, tryptamine and melatonin, a significant increase in the amount of ROS was found in the roots of both *Z. mays* and *E. heterophylla*. Normally, when there is an excess of ROS, the antioxidant defense system is stimulated increasing the activity of antioxidant enzymes. However, no significant changes were observed in the activities of SOD, GR and APx in any of the treatments, either in *Z. mays* or in *E. heterophylla*. Morphological analyzes of the roots of *E. heterophylla* revealed that in all treatments in which the ROS content was increased, a significant increase in root hairs was seen. The increase in ROS in the growing region of the root hair cell is part of the mechanism that establishes the polarity of the root hairs. Auxins and

ethylene are the main promoters of root hair morphogenesis. Ethylene stimulates hair development via an auxin-independent pathway, since high levels of ethylene, but not auxins, induce ectopic hair cell formation in the primary root. This phenomenon was evidenced in the roots, especially in the treatment with melatonin. In addition to sharing some actions on root development, each indole derivative had distinct morphological changes that would also be associated with interferences in the phytohormone balance. The comparison of the effects of the four indole derivatives tested allows us to conclude that, although some effects, such as the reduction in root growth in *E. heterophylla* have been shared by all derivatives, most of the action of L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan and tryptamine cannot be credited to the intracellular generation of melatonin.

**CONCLUSION:** Our study revealed that L-tryptophan and its 5-hydroxytryptophan derivatives, tryptamine and melatonin have a weak biostimulating effect on *Z. mays*, but are toxic to the weed *E. heterophylla*, especially tryptamine and melatonin. The inhibition in the development of *E. heterophylla* seedlings seems to be caused, in part, by interferences in the action of phytohormones, leading to a predominance of ethylene actions. Melatonin has additional cytotoxic effects, indicated by inhibition of mitochondrial respiratory activity and oxidative damage to the roots. In the context of sustainable ecological agriculture, our study corroborated the potential application of L-tryptophan derivatives, especially tryptamine and melatonin to protect crops, by reducing the competitive ability of weeds.

EFEITOS DO L-TRIPTOFANO E SEUS DERIVADOS  
5-HIDROXITRIPTOFANO, TRIPTAMINA E MELATONINA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ESPÉCIES DE CULTIVO E DE PLANTAS  
DANINHAS

ISABELA DE CARVALHO CONTESOTO<sup>1</sup>, GISLAINE CRISTIANE  
MANTOVANELLI<sup>1</sup>, MÁRCIO SHIGUEAKI MITO<sup>1</sup>, PAULO VINICIUS MOREIRA  
DA COSTA MENEZES<sup>1</sup>, GABRIEL FELIPE STULP<sup>1</sup>, JULIO SALOMÃO<sup>1</sup>, EMY  
LUIZA ISHII-IWAMOTO<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de  
Maringá, 87020900 Maringá, Brasil.*

\*Autor para correspondência

*Filiação: Laboratório de Oxidações Biológicas*

*Departamento de Bioquímica,*

*Universidade Estadual de Maringá, 87020900 Maringá, Brasil.*

*E-mail: eliiwamoto@uem.br*

*Fax: 55-44-3011-4896*

## Resumo

O L-triptofano e a melatonina são bioestimulantes das plantas de cultivo, mas pouco se sabe sobre seus efeitos nas plantas daninhas. Este trabalho foi planejado para comparar os efeitos do L-triptofano e da melatonina, bem como do 5-hidroxitriptofano e da triptamina, nas espécies *Glycine max* e *Zea mays* e nas plantas daninhas *Amaranthus hybridus*, *Bidens pilosa*, *Digitaria insularis*, *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia* e *Urochloa decumbens*. Em *Z. mays* e *E. heterophylla*, foram medidos parâmetros do metabolismo energético, do sistema de defesa antioxidante e do metabolismo de açúcares e compostos nitrogenados. Os quatro derivados indólicos não exerceram efeitos significativos no desenvolvimento de *Z. mays*, mas em *E. heterophylla* os quatro compostos inibiram o crescimento da raiz e da parte aérea. Com exceção do L-triptofano, os outros derivados aumentaram o conteúdo de espécies reativas de oxigênio em *Z. mays* e *E. heterophylla*. Em *E. heterophylla*, houve também uma redução na atividade da catalase, distorções na arquitetura das raízes primárias e um aumento acentuado dos pelos radiculares. A atividade respiratória, as atividades das enzimas da glicólise e a atividade da glutamina sintetase não foram alteradas. Somente a melatonina inibiu a respiração via citocromo oxidase e causou danos oxidativos nas raízes de *E. heterophylla*. Uma interferência no equilíbrio das ações dos fitormônios, com predomínio das ações do etileno, parece ter contribuído para a toxicidade dos compostos indólicos em *E. heterophylla*. Nosso estudo corroborou o potencial de aplicação de derivados do L-triptofano, especialmente da triptamina e da melatonina na proteção de *Z. mays*, reduzindo a capacidade competitiva de *E. heterophylla*.

Palavras-chave: derivados indólicos; fitormônios; bioestimulantes

## Abstract

Tryptophan and melatonin are biostimulants of crop plants, but little is known about their effects on weeds. This work was planned to compare the effects of L-tryptophan and melatonin, as well as 5-hydroxytryptophan and tryptamine, on the crop species *Glycine max* and *Zea mays*, and on the weeds *Amaranthus hybridus*, *Bidens pilosa*, *Digitaria insularis*, *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia* and *Urochloa decumbens*. In *Z. mays* and *E. heterophylla*, parameters of energy metabolism, antioxidant defense system and metabolism of sugars and nitrogen compounds were measured. The four indole derivatives did not exert significant effects on the development of *Z. mays*, but in *E. heterophylla* the four compounds inhibited the root and aerial parts growth. With the exception of L-tryptophan, the other derivatives increased the content of reactive oxygen species in both *Z. mays* and *E. heterophylla*. In *E. heterophylla*, there was also a reduction in the activity of catalase, distortions in the architecture of the primary roots and a marked increase of root hairs. The respiratory activity, the activities of enzymes of glycolysis and the glutamine synthetase activity were not altered. Only melatonin inhibited respiration via cytochrome oxidase and caused oxidative damage in *E. heterophylla* roots. An interference in the balance of phytohormone actions, with a predominance of ethylene actions, seems to have contributed to the toxicity of the indole compounds in *E. heterophylla*. Our study corroborated the potential application of L-tryptophan derivatives, especially tryptamine and melatonin in the crop protection, by reducing the competitive ability of the weeds.

Key-words: indole derivatives; phytohormones; biostimulants

## 1. Introdução

Atualmente, existe uma forte demanda por novos agroquímicos baseados em substâncias naturais, que protejam as culturas de perdas de produtividade decorrentes de estresses bióticos e abióticos a que são submetidas no campo e que, também, possam reduzir o uso de herbicidas e pesticidas sintéticos. Entre essas substâncias estão os reguladores de crescimento e os bioestimuladores de plantas. Os reguladores de crescimento são substâncias geradas pelas plantas como moléculas de sinalização (fitormônios), biologicamente ativos em uma concentração muito baixa e crítica no controle de processos fisiológicos específicos das plantas (Rademacher, 2015). A aplicação exógena desses fitormônios e/ou seus precursores melhoram o crescimento e rendimento da planta, alterando o nível de hormônios endógenos. Os principais reguladores de crescimento são as auxinas, giberelinas (GA), citocininas, etileno, ácido abscísico (ABA), brassinosteroides (BR) e jasmonatos (JA) (Rademacher, 2015). Os bioestimuladores ou fitoestimuladores são vários tipos de substâncias não tóxicas de origem natural capazes de melhorar e estimular processos vegetais. Sua influência nas plantas não é consequência da regulação metabólica direta de processos particulares, mas sua ação pode ser multidirecional, influenciando geralmente o metabolismo sem modificar seu caminho natural (Kołodziejczyk e Posmyk, 2016).

As estrobilurinas podem ser consideradas fitoestimuladores típicos. Além de atuarem como fungicidas, elas melhoram o desenvolvimento das culturas por atuarem em várias vias metabólicas: aumentam a fotossíntese líquida por reduzir temporariamente a respiração das plantas, levando a menor perda de dióxido de carbono; aumentam a atividade das enzimas antioxidantes provocando maior tolerância ao estresse; aumentam a atividade da nitrato redutase; melhoram o equilíbrio hormonal, aumentando a síntese de ácido indolacético (AIA) e ABA; reduzem a produção de etileno e com isso retardam a senescência (Amaro et al., 2020). Em nosso estudo prévio foi revelado o efeito bioestimulante do resveratrol sobre o desenvolvimento inicial de *Zea mays* L. (Mantovanelli et al., 2020), um efeito que é decorrente, em parte, da ação antioxidante do resveratrol. A caracterização de uma substância natural biologicamente ativa como um regulador de crescimento ou um bioestimulante nem sempre é fácil, pois muitas

substâncias podem agir mimetizando as ações dos fitormônios típicos ou são precursores dos fitormônios.

Dentre os reguladores de crescimento destacam-se as auxinas, incluindo o AIA. As auxinas exercem uma forte atividade biológica em concentrações muito baixas, tanto *in vivo* quanto sistemas *in vitro* e são essenciais para a manutenção de processos fisiológicos e morfogenéticos, incluindo o gravitropismo e fototropismo, desenvolvimento de pelos radiculares e raiz lateral, desenvolvimento de raízes adventícias e formação de brotos (Woodward e Bartel, 2005).

O AIA pode ser sintetizado através de várias vias a partir do L-triptofano, (Palego et al., 2016) conforme mostra a Figura 1. As possíveis vias dependentes de L-triptofano em plantas superiores são a via ácido indol-3-pirúvico (IPyA) (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008) a via da triptamina (YUCCA) (Zhao et al., 2001), a via indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Bartel et al., 2001) e a via da indoleacetamida (Pollmann et al., 2002).

A aplicação exógena do L-triptofano aumenta o nível de auxina nos tecidos vegetais (Ahemad e Kibret, 2014; Frankenberger et al., 1990; Mustafa et al., 2016) e, com esta finalidade, o aminoácido tem sido aplicado nas plantas de várias maneiras, incluindo a aplicação no solo (Chen et al., 1997; Muneer et al., 2009), pulverização foliar (El-Awadi et al., 2017; Yassen et al., 2010) e por condicionamento osmótico de sementes (Abbas et al., 2013; Parvez et al., 2000).

A quantidade de auxina liberada pelo L-triptofano varia intra e interespecificamente (Abbas et al., 2013). Respostas positivas da aplicação de L-triptofano na melhoria do crescimento das culturas e produtividade foram documentadas em grão de bico (*Cicer arietinum*) (Abbas et al., 2013), tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) (Parvez et al., 2000), milho (*Z. mays*) (Herrera-Jiménez et al., 2018; Zahir et al., 2000) e rabanete (*Raphanus sativus*) (Frankenberger et al., 1990).



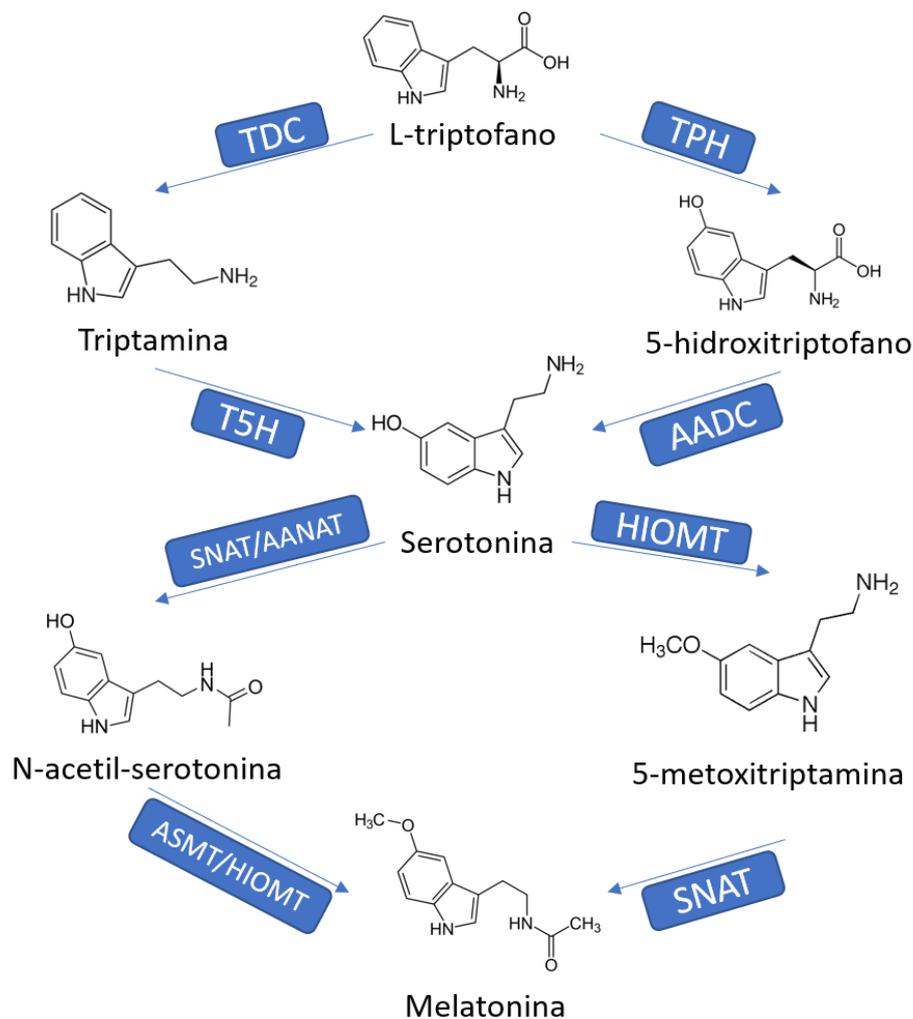


Figura 2. Via de biossíntese da melatonina. (TDC) Triptofano descarboxilase; (TPH) triptofano hidroxilase; (T5H) triptamina 5-hidroxilase; (AADC) aminoácido L-aromático descarboxilase; (SNAT) serotonina N-acetiltransferase; (AANAT) aralquilamina N-acetiltransferase; (HIOMT) N-acetilserotonina O-metiltransferase; (ASMT) N-acetilserotonina metiltransferase.

A melatonina, por sua vez, é encontrada em folhas, raízes, caules, frutas e sementes de várias espécies vegetais, incluindo culturas (arroz, trigo, cevada, milho, tabaco, grama, cenoura e aveia) e frutas (cereja, uva, pepino e maçã), bem como produtos vegetais usados para fabricação de bebidas populares (chá, café, cerveja e vinho) (Arnao, 2014; Huang e Mazza, 2011; Kolář e Macháčková, 2005; Manchester et al., 2000; Stürtz et al., 2011). As concentrações de melatonina diferem não apenas entre as espécies, mas também entre variedades da mesma espécie (Tan et al., 2012). Em 2007 foram listadas 39 espécies de dicotiledôneas ou monocotiledôneas que contêm mais de 100 ng de melatonina  $g^{-1}$  de peso seco, dentre elas 22 espécies com níveis relatados como superiores a 1000 ng  $g^{-1}$  (Hardeland et al., 2007). Inúmeras outras espécies de

plantas, entretanto, possuem níveis de melatonina em intervalos de 1 ng g<sup>-1</sup> ou mesmo abaixo. As diferenças detectadas não são explicadas em uma base taxonômica e a faixa extremamente ampla de concentrações de melatonina detectada nas várias espécies vegetais, leva à conclusão que a melatonina tem funções diversas e variáveis entre as espécies. Foi demonstrado que a melatonina está envolvida na floração, ritmos circadianos, fotossíntese (Byeon et al., 2012; Lee et al., 2014; Shi et al., 2015; L. Y. Wang et al., 2016; Wang et al., 2014), arquitetura de sistema radicular (Arnao e Hernández-Ruiz, 2017; N. Zhang et al., 2014), germinação de sementes (Posmyk et al., 2009), e nas respostas a várias condições de estresses ambientais e, também, ao ataque de patógenos (Arnao e Hernández-Ruiz, 2014; Lee e Back, 2016; Reiter et al., 2015; Wei et al., 2015).

Desde a sua descoberta em plantas em 1995 (Dubbels et al., 1995; Hattori et al., 1995), os efeitos da adição exógena da melatonina tem sido extensivamente estudados em virtude de algumas vantagens: é de origem natural, mas pode ser facilmente sintetizada em laboratórios; não é tóxica; não é cara; dissolve em diferentes solventes: água, álcoois, mas também lipídios; pode ser absorvido ativamente pelas plantas; é uma pequena molécula que penetra facilmente nos compartimentos celulares, e possui forte propriedade antioxidante (Kołodziejczyk e Posmyk, 2016).

Testes de campo demonstraram que sementes de várias espécies tratadas com melatonina apresentam melhor crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como aumento de rendimento. Dentre as espécies estudadas destacam-se o milho, feijão mungo, pepino (Janas e Posmyk, 2013; Posmyk e Janas, 2009), soja (Wei et al., 2015) e tremoço (Hernández-Ruiz et al., 2005).

A melatonina promove o crescimento radicular e vegetativo em várias espécies de plantas (Arnao e Hernández-Ruiz, 2015, 2014; Arnao e Hernández-Ruiz, 2007; Erland et al., 2015; Hernández-Ruiz et al., 2005; Nawaz et al., 2016). A literatura mostra que os efeitos da melatonina variam muito dependendo da espécie e da concentração aplicada. Em geral os efeitos de estímulo ocorre em concentrações abaixo de 100 µM e, particularmente na parte aérea (Arnao e Hernández-Ruiz, 2017; Hernández-Ruiz et al., 2005). As espécies com maior estímulo na parte aérea são *Lupinus albus*, *Phalaris canariensis*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana* e *Cucumis sativus*, segundo a

revisão publicada por Arnao e Hernández-Ruiz (2017). Em geral, os efeitos da melatonina no crescimento radicular são de redução (Arnao e Hernández-Ruiz, 2017). Efeitos negativos foram relatados em *Arabidopsis*, soja, tomate e mostarda (Chen et al., 2009; Wei et al., 2015). Nas raízes de plantas de tomate e de mostarda foi observado efeito estimulador sobre o crescimento radicular em baixas concentrações, enquanto um efeito inibitório foi encontrado com altas concentrações (Chen et al., 2009). Em *A. thaliana* foi demonstrado que a melatonina modula a arquitetura do sistema radicular, estimulando a formação de raízes adventícias, mas afeta minimamente o crescimento da raiz primária ou o desenvolvimento dos pelos (Koyama et al., 2013; Pelagio-Flores et al., 2012). Muitos genes afetados pela melatonina estão envolvidos em diferentes vias de sinalização hormonal, como de auxinas, ABA, ácido salicílico (AS), etileno e JA, indicando possível interferência entre a melatonina e outros fitormônios (Weeda et al., 2014).

Tem sido amplamente observado em estudos *in vitro* que o tratamento com melatonina é capaz de evitar várias formas de estresse abiótico, incluindo a decorrente de frio, seca, excesso de metais pesados e sal (Shi et al., 2016; H. Zhang et al., 2014). H. Zhang et al. (2014) demonstraram que a melatonina exógena diminui o dano oxidativo induzido pelo estresse com NaCl por melhorar a expressão gênica de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). A melatonina modifica também a biossíntese de ABA e GA.

A despeito dos inúmeros relatos das ações benéficas da aplicação exógena da melatonina, é evidente que ainda há muito a ser investigado visando a sua utilização efetiva como um bioestimulador. A maior parte dos relatos dos efeitos da melatonina exógena bem como do L-triptofano, seja em ensaios no campo ou *in vitro*, foi decorrente de estudos realizados com espécies de cultivos. Poucos estudos foram realizados em espécies de plantas daninhas.

No campo as plantas daninhas competem com as culturas por recursos como nutrientes, água e luz. Um aumento na competitividade das culturas em relação às plantas daninhas tem o potencial de reduzir as perdas de rendimento das culturas. Desta forma é essencial que se avalie os efeitos de um eventual regulador de crescimento ou bioestimulador não somente sobre as culturas de interesse, mas também sobre as espécies de plantas daninhas que comumente

infestam as áreas cultivadas. Idealmente um bioestimulador deve favorecer o desenvolvimento da cultura, mas não o das plantas daninhas, tal como foi observado em nosso estudo prévio (Mantovanelli et al., 2020). Na mesma faixa de concentração na qual o resveratrol estimula o desenvolvimento de plântulas de *Z. mays*, o desenvolvimento da planta daninha *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donnel foi inibida (Mantovanelli et al., 2020).

Assim, este estudo foi planejado para investigar os efeitos da aplicação exógena de melatonina e também de seu precursor inicial o aminoácido L-triptofano sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de várias espécies, dentre elas duas culturas de interesse, *Glicine max* (soja) e *mays* (milho) e seis plantas daninhas, *Amaranthus hybridus* L. (caruru-roxo), *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Digitaria insularis* L. Fedde (capim-amargoso), *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo), *I. grandifolia* (corda-de-viola) e *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (capim-braquiária). Além do L-triptofano, foram testados também os efeitos da aplicação exógena de dois intermediários da síntese de melatonina, o 5-hidroxitriptofano e a triptamina. A triptamina é também um intermediário da síntese de auxinas a partir de L-triptofano. Além da germinação e crescimento inicial das diferentes espécies, foram avaliados vários parâmetros bioquímicos essenciais para a germinação e o desenvolvimento inicial de uma cultura, a *Z. mays*, e uma planta daninha a *E. heterophylla*. Foram avaliados parâmetros do metabolismo energético, atividade do sistema antioxidante, atividade de enzimas chaves do metabolismo de açúcares e de nitrogênio. A captação de melatonina em *E. heterophylla* crescida em meio de hidroponia foi também avaliada.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material

As enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), lactato desidrogenase (LDH), e NADH, ADP, ATP, NADPH, NADP<sup>+</sup>, KCN, L-triptofano, triptamina e serotonina foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). A melatonina e o 5-hidroxitriptofano foram comprados da Bulk Supplements (Nevada, USA).

## 2.2. Germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas

As sementes das plantas daninhas (*A. hybridus*, *B. pilosa*, *I. grandifolia*, *E. heterophylla*, *U. decumbens* e *D. insularis*) foram adquiridas da empresa Cosmos Agrícola Produtos e Serviços Rurais Ltda. (São Paulo, Brasil), enquanto que as plantas de cultivo (*G. max* e *Z. mays*) foram gentilmente doadas ao laboratório pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR, Paraná, Brasil).

As sementes foram selecionadas quanto o tamanho e a forma, e passaram por procedimentos de quebra de dormência específicos para cada espécie. Sementes de *A. hybridus* e de *B. pilosa* foram desinfectadas em hipoclorito de sódio por 5 minutos, as de *G. max* e *Z. mays* foram desinfectadas em hipoclorito de sódio por 15 minutos, as de *I. grandifolia* foram escarificadas em ácido sulfúrico concentrado por 45 minutos, as de *U. decumbens* foram escarificadas em ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos e as de *D. insularis* e *E. heterophylla* foram lavadas abundantemente em água. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições. Nos testes com as plantas daninhas foram utilizadas 50 sementes por gerbox, já nos testes com *G. max* e *Z. mays*, apenas 20 sementes por gerbox. As sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel germitest, umedecidas com 10 mL de água destilada (controle) ou com os derivados indólicos: L-triptofano ou melatonina nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 100 e 500  $\mu\text{M}$ . Nos experimentos em que foram incluídos o 5-hidroxitriptofano e triptamina, foram incluídas também as concentrações de 250 e 400  $\mu\text{M}$ . As placas foram colocadas em câmaras de germinação com condições de temperatura e fotoperíodo e tempo específicos para cada espécie. *A. hybridus*, *D. insularis* e *U. decumbens* foram mantidas em fotoperíodo de 8 horas de luz, na temperatura de 30 °C, e 16 horas no escuro, na temperatura de 20 °C, por 168 horas. *B. pilosa* foi mantida em fotoperíodo de 8 horas de luz, na temperatura de 30 °C, e 16 horas escuro, na temperatura de 20 °C, por 120 horas. *E. heterophylla*, *Z. mays* e *G. max* foram mantidas em fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C por 96 horas. *I. grandifolia* foi mantida em fotoperíodo de 12 horas, 30 °C, por 120 horas. Após o tempo determinado de crescimento, as raízes e as partes aéreas foram removidas, seus comprimentos medidos e imediatamente pesados para

obtenção da biomassa fresca. Para determinação da biomassa seca o material foi levado à estufa, com temperatura de 60 °C, por 48 horas.

Diariamente as sementes que germinaram foram contadas para determinação dos índices de germinação: tempo médio de germinação (TMG) (Labouriau e Osborn, 1984); índice de velocidade de germinação (IVG); e a velocidade de germinação acumulada (Chiapusio et al., 1997).

Após a determinação os efeitos no desenvolvimento inicial das plântulas, foram selecionadas a planta daninha que os tratamentos apresentaram mais efeitos, a *E. heterophylla*, e em uma planta de cultivo, a *Z. mays*. O L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina foram testados nas concentrações de 20, 100 e 250 µM nos experimentos posteriores.

### 2.3. Análise da morfologia das raízes primárias de *E. heterophylla*

Para a análise morfológica, as raízes primárias de *E. heterophylla* crescidas na presença de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina, foram selecionadas randomicamente, observadas e fotografadas em microscópio estereoscópico Leica EZ4D com câmera digital acoplada em aumento de 40 vezes.

### 2.4. Análises bioquímicas

#### 2.4.1. Determinação da atividade respiratória de ápices radiculares de *E. heterophylla* e *Z. mays*

A respiração de ápices radiculares das plântulas foi medida, a 25 °C, com o auxílio de um eletrodo de oxigênio tipo Clark, inserido em uma câmara de acrílico e conectado a um polarógrafo (Bracht et al., 2003). As amostras dos tecidos foram removidas das plântulas crescidas, por 96 horas, na ausência ou na presença de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina ou melatonina (20, 100 e 250 µM). Aproximadamente 20 mg de ápices radiculares foram retirados, pesados e imediatamente transferidos para uma câmara de acrílico contendo 2 mL do meio de incubação, composto de solução nutritiva: Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 mM, KNO<sub>3</sub> 2 mM, NH<sub>4</sub>Cl 0,43 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,75 mM e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 µM (Larkin, 1987),

com pH ajustado para 5,8. A velocidade de consumo de oxigênio foi expressa em nmoles de oxigênio consumidos por minuto por mg de biomassa fresca ( $\text{nmol O}_2 \text{ consumido} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{mg biomassa fresca}^{-1}$ ). Considerou-se a concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido no meio de incubação, a 25 °C, de 240 mM (Estabrook, 1967). Para discriminar a respiração via citocromo-oxidase (COX) da respiração via oxidase alternativa e da respiração devida às oxidases extramitocondriais, o cianeto de potássio (KCN) (250  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado cerca de 5 min após a adição dos ápices (Millar et al., 2011). Nesta condição, o consumo de oxigênio é definido como respiração KCN-insensível.

#### 2.4.2. Determinação do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) totais de raízes de *E. heterophylla* e *Z. mays*

O conteúdo de EROs totais foi determinado das raízes de plântulas de *E. heterophylla* e *Z. mays* de acordo com Jambunathan (2010). Aproximadamente 100 mg dessas raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, utilizando-se graal e pistilo. Em seguida, o material foi transferido para um tubo de plástico, misturado com 2 mL de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) e centrifugado a 12.000 g, por 20 min, a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para tubos de vidro e diluído em 1:10 com tampão Tris-HCl 10 mM. Para iniciar a reação de fluorescência, 10  $\mu\text{L}$  de 2',7'-dihidroacetato de diclorofluoresceína (DCFHDA) (1 mM preparado em dimetilsulfóxido (DMSO)) foram pipetados em cada tubo para reagir com as EROs. O tubo foi rapidamente homogeneizado em vórtex e mantido no escuro. Aos 10 min de reação, foi feita a leitura em espectrofluorofotômetro Shimadzu® RF-5301PC. Os comprimentos de onda utilizados foram de 504 nm e 526 nm para excitação e emissão, respectivamente. Os conteúdos de EROs totais foram expressos em unidades de fluorescência por mg de massa fresca<sup>-1</sup> (unidade de fluorescência.mg massa fresca<sup>-1</sup>)

#### 2.4.3. Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) e dienos conjugados de raízes de *E. heterophylla* e *Z. mays*

Para a determinação dos níveis de MDA, aproximadamente 200 mg de raiz foram maceradas em 2 mL de etanol 96 %, a 4 °C. Uma alíquota de 0,75 µL foi transferida para um tubo tipo Falcon. Ao tubo foi adicionado o mesmo volume de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), dissolvido em 10 % de ácido tricloroacético (TCA), e em seguida foi incubado, em banho-maria, a 95 °C, por 30 min. A reação foi paralisada em banho de gelo. A amostra foi centrifugada a 15.000 g, por 20 min. Após ter o volume aferido, o sobrenadante foi utilizado para medir a absorvância específica e inespecífica a 532 nm e 600 nm, respectivamente. A diferença entre as absorvâncias foi utilizada para o cálculo do conteúdo de MDA ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Heath e Packer, 1968). Os resultados foram expressos em nmol de MDA formado por mg de biomassa fresca (nmol.mg de biomassa fresca<sup>-1</sup>).

Para determinar o conteúdo de dienos conjugados, uma alíquota de 500 µL do homogeneizado inicial foi adicionada a 1000 µL de etanol 96 %, em tubo plástico com tampa e, em seguida, o tubo foi centrifugado, a 20.000 g, por 20 min. A absorvância do sobrenadante foi registrada em espectrofotômetro a 234 nm e 500 nm, para absorvância específica e inespecífica, respectivamente. A diferença entre as absorvâncias foi utilizada para o cálculo do conteúdo dos dienos conjugados ( $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Boveris et al., 1980). Os resultados foram expressos em nmol de dienos conjugados formados por mg de biomassa fresca (nmol.mg biomassa fresca<sup>-1</sup>).

#### 2.4.4. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes nas raízes de *E. heterophylla* e *Z. mays*

Foram avaliadas as atividades das enzimas SOD, CAT, POD, glutathione redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APx). Aproximadamente 200 mg de raízes foram excisadas das plântulas, transferidas para um gral e trituradas com 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), contendo 0,1 % de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 7.400 g, a 4 °C durante 30 min. O sobrenadante foi usado como fonte de enzimas.

Atividade da SOD foi avaliada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação foi composto de tampão fosfato 50 mM (pH 6,8), metionina 13 mM, nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,07 mM, riboflavina 2 µM e extrato da

enzima (0,05 mg de proteína). A reação foi iniciada com a exposição à luz intensa durante 45 min, a 25 °C. Para cada amostra foram preparados tubos que foram mantidos no escuro pelo mesmo período de tempo, correspondentes aos brancos. Para este método, uma unidade de atividade de SOD (U) é definida como a atividade de enzima necessária para inibir em 50 % a oxidação do NBT. A fotoredução do NBT foi lida em espectrofotômetro a 560 nm, e os resultados foram expressos como U de SOD por mg de proteína<sup>-1</sup> (U de SOD.mg proteína<sup>-1</sup>)

A atividade da CAT foi medida em um meio contendo tampão fosfato 50 mM (pH 6,8), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5,8 mM e do extrato da enzima (0,05 mg de proteína). O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado em espectrofotômetro por 60 segundos a 240 nm ( $\epsilon = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto por mg de proteína ( $\mu\text{mol}.\text{minuto}^{-1}.\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>) (Aebi, 1984).

A atividade da POD foi medida em meio contendo tampão fosfato 50 mM (pH 6,8), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 mM, pirogallol 0,15 mM e extrato da enzima (0,025-0,05 mg de proteína). Foi acompanhada a formação purpurogalina em espectrofotômetro, a 420 nm, por 90 segundos ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina formada por minuto por mg de proteína ( $\mu\text{mol}.\text{minuto}^{-1}.\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>) (Sharma et al., 2014).

A atividade da GR foi medida em meio contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,5), glutathiona oxidada (GSSG) 0,3 mM, NADPH 0,1 mM e extrato da enzima (0,05 mg de proteína). O consumo de NADPH foi monitorado em espectrofotômetro a 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de NADPH consumido por minuto por mg de proteína ( $\mu\text{mol}.\text{minuto}^{-1}.\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>) (Carlberg e Mannervik, 1985).

A atividade da APx foi medida em um meio contendo tampão fosfato 50 mM (pH 6,8), ascorbato 0,16 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM e do extrato da enzima (0,05 mg de proteína). A oxidação do ascorbato foi medida em espectrofotômetro a 290 nm ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de ascorbato oxidado por minuto por mg de proteína ( $\mu\text{mol}.\text{minuto}^{-1}.\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>) (Nakano e Asada, 1981).

2.4.5. Determinação da atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos nas raízes de *E. heterophylla* e *Z. mays*

Foram determinadas as atividades das enzimas glicocinase (GK), glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), piruvato-cinase (PK) e malato-desidrogenase (MDH) em extratos das raízes das plântulas. Aproximadamente 300 mg de raízes foram maceradas em 1,4 mL de tampão HEPES-KOH 50 mM (pH 7,4) contendo sacarose 0,25 M, KCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 10 mM e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 105 µg ml<sup>-1</sup>. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, a 4 °C, durante 20 min, e o sobrenadante foi utilizado com fonte de enzimas.

A atividade de GK foi determinada, a 25 °C, de acordo com Espen et al. (1995), com modificações. O meio de reação foi composto de tampão de trietanolamina (TEA) 42 mM (pH 7,6), glicose 2,22 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,7 mM, ATP 0,54 mM, NADP<sup>+</sup> 0,73 mM, 0,28 U de G6PD e do extrato (0,045-0,08 mg proteína). A reação de redução do NADP<sup>+</sup> foi acompanhada, durante 120 segundos, a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de glicose-6-fosfato formada por minuto por mg de proteína (nmol.minuto<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>).

A atividade da G6PD foi determinada de acordo com Pirovano et al. (1996), com modificações. O meio de reação foi composto de tampão TEA 86 mM (pH 7,6), MgCl<sub>2</sub> 6,7 mM, NADP<sup>+</sup> 1,5 mM, glicose-6-fosfato 0,73 mM e extrato (0,045-0,06 mg proteína). A reação foi monitorada, a 25 °C, pelo aumento de absorvância a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de 6-fosfogliconato formado por minuto por mg de proteína (nmol.minuto<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>).

A atividade da PK foi avaliada de acordo com Pirovano et al. (1996), com modificações. A reação foi realizada a 25 °C pelo acompanhamento da oxidação de NADH a 340 nm. O meio de reação foi composto de tampão TEA 86 mM (pH 7,6), NADH 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,7 mM, KCl 10 mM, ADP 4,7 mM, 22 U de LDH, fosfoenolpiruvato (PEP) 0,5 mM e extrato (0,015-0,045 mg proteína). A atividade enzimática foi expressa em nmol de lactato formado por minuto por mg de proteína (nmol.minuto<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>).

A atividade da MDH foi determinada de acordo com Pirovano et al. (1996), com modificações. A reação foi feita a 25 °C monitorando a oxidação de NADH em 340 nm. O meio de reação foi composto de tampão TEA 86 mM (pH 7,5), NADH 0,2 mM, ácido oxaloacético 0,5 mM e extrato (0,0015-0,003 mg proteína).

A atividade enzimática foi expressa em nmol de malato formado por minuto por mg de proteína (nmol.minuto<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>.)

#### 2.4.6. Determinação da atividade da glutamina sintetase (GS)

Para avaliar um parâmetro do metabolismo do nitrogênio das plântulas, foi avaliada a atividade da enzima GS de acordo com Sodek et al. (1980) com modificações. Para cada 350 mg de tecido foi adicionado 1,0 mL do meio de extração. A extração foi realizada em tampão imidazol-HCl 50 mM (pH 7,2), ditioneitol (DTT) 1 mM, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 0,1 % e mercaptoetanol 5 mM. O homogeneizado foi centrifugado por 30 min a 10.000 g, na temperatura de 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima. O meio de reação foi constituído de tampão Imidazol-HCl 40 mM (pH 7,2), MgCl<sub>2</sub> 45 mM, hidroxilamina 5 mM, glutamato 75 mM e ATP 5 mM e extrato enzimático (0,15 mg proteína). A reação foi incubada a 37 °C, por 60 min, e paralisada com a adição de 250 µL de solução composta por ClFe<sub>3</sub> 10 %, TCA 24 % p/v e HCl 50 % v/v (1/1/1). Transferiu-se a reação para tubos plásticos com tampa de 1,5 ml e foram centrifugados por 5 min, a 10.000 g. Em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro, a 540 nm. A quantidade de γ-glutamilhidroxamato formado foi determinada pela análise da curva padrão do composto. A atividade da enzima foi expressa pela produção de γ-glutamilhidroxamato em µmol por minuto por mg de proteína (µmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>).

#### 2.5. Avaliação dos efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento de plântulas de *E. heterophylla* crescidas em sistema de hidroponia

A captação da melatonina pelas plântulas foi avaliada pela depleção da melatonina no meio de cultivo num sistema de hidroponia (Shann e Blum, 1987). As sementes de *E. heterophylla* foram inicialmente semeadas em papel germitest e organizadas em rolos, acondicionados verticalmente em câmara de germinação. Após 48 horas, as plântulas viáveis com pelo menos 30 mm de raiz foram medidas e transferidas para o sistema de cultivo em hidroponia (contendo 20 plântulas por vaso). Os vasos continham solução nutritiva de Dong, Wu e Zhang (2006) ¼ de força (controle), ou solução acrescida de melatonina (20, 100

ou 250  $\mu\text{M}$ ). Os vasos foram mantidos, por 96 horas, em câmara de germinação, a 25 °C, sob aeração constante. Vasos sem plantas, com e sem acréscimo de melatonina, foram colocados nas mesmas condições como controles. Durante esse período, foram feitas coletas da solução de cada vaso nos tempos 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, para futura análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, do inglês HPLC). Após as 96 horas, as plântulas foram medidas e pesadas para obtenção da biomassa fresca. Para determinação da biomassa seca o material foi levado à estufa com temperatura de 60 °C, por 48 horas.

## 2.6. Avaliação dos derivados indólicos por CLAE

Para as análises em CLAE foi utilizado o aparelho Shimadzu (Mod. Proeminência) com duas bombas LC-20AR, degaseificador DGU-20ASR, detector com arranjos de diodo SPD-M20A e sistema de injeção automático SIL-10AF, a detecção foi feita em coluna C18ec Nucleodur® Macherey-Nagel (250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 5  $\mu\text{m}$ ) com uma pré-coluna correspondente. Para análise das amostras coletadas, alíquotas foram diluídas 5x, filtradas com filtro de membrana de poro 0,45  $\mu\text{m}$  e acondicionados em *vials* para injeção automática programada.

O protocolo utilizado foi o descrito por Hosseinian, Li e Beta (2008), com modificações. As fases móveis foram A: 0,1 % ácido acético em água ultrapura e B: 0,1 % ácido acético em acetonitrila, em gradiente crescente. Cada corrida durou 55 min, com vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. O volume de amostra injetada foi de 10  $\mu\text{L}$ . O gradiente foi iniciado em 10 % de solvente B e 90 % do solvente A, com acréscimo constante em rampa do solvente B até 50 % nos 30 min e retorno a 10 % de solvente B até 55 min. A detecção foi feita em comprimento de onda de 280 nm. Para a obtenção das curvas padrões de serotonina, 5-hidroxitriptofano, L-triptofano, triptamina e melatonina foram preparadas soluções nas concentrações de 1, 5, 20, 75 e 250  $\mu\text{M}$  em água ultrapura. A equação de reta e o coeficiente de linearidade foram calculados com o software LabSolutions.

Com base na curva padrão, a melatonina foi quantificada nas alíquotas coletadas nas séries contendo ou não as plantas, e as diferenças encontradas

em cada tempo foram utilizadas para o cálculo da quantidade captada por cada planta existente dos vasos ( $\mu\text{mol.planta}^{-1}$ ).

## 2.7. Determinação de proteínas

A concentração de proteínas dos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Bradford (1976), tendo sido utilizada a albumina bovina como padrão.

## 2.8. Análise estatística

Os dados apresentados nos gráficos são expressos como médias  $\pm$  erros padrão (EP), os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), com diferenças significativas entre as médias identificadas pelo teste de *Duncan*. As comparações são apresentadas no texto como valores de probabilidade ( $p$ ) e  $p \leq 0,05$  foi adotado como critério mínimo de significância. As análises foram realizadas utilizando software GraphPad Prisma e o pacote de software Statistica™.

## 3. Resultados

### 3.1. Efeitos do L-triptofano e da melatonina sobre a germinação de *A. hybridus*, *B. pilosa*, *D. insularis*, *E. heterophylla*, *G. max*, *I. grandifolia*, *U. decumbens* e *Z. mays*

Nas Tabelas 1 e 2 estão mostrados os efeitos do L-triptofano e da melatonina, sobre os índices de germinação das cinco espécies eudicotiledôneas e três monocotiledôneas selecionadas para o estudo. Estão mostrados apenas os valores dos controles e das médias dos tratamentos que diferiram significativamente em relação às médias dos respectivos controles.

O tratamento com L-triptofano (Tab. 1) alterou ao menos um índice de germinação de três espécies: *B. pilosa*, *G. max* e *E. heterophylla*. Em *B. pilosa* a porcentagem de sementes germinadas ao final do período experimental foi aumentada em 74,2 e 50,0 % pelas concentrações de 20 e 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente, e também houve estímulo dos índices que levam em conta a

Tabela 1. Efeitos do L-triptofano sobre os índices de germinação das plântulas *A. hybridus*, *B. pilosa*, *D. insularis*, *G. max*, *I. grandifolia*, *U. decumbens*, *E. heterophylla* e *Z. mays*.

	[ ] (µM)	<i>A. hybridus</i>	<i>B. pilosa</i>	<i>D. insularis</i>	<i>G. max</i>	<i>I. grandifolia</i>	<i>U. decumbens</i>	<i>E. heterophylla</i>	<i>Z. mays</i>
% germinação	0	69,20±3,90	26,4±3,90	54,00±6,80	89,00±1,87	96,40±0,75	37,6±3,19	59,6±2,5	89,00±2,45
	5	-	-	-	97,00±2,00	-	-	-	-
	10	-	-	-	97,00±1,23	-	-	-	-
	20	-	46,00±5,20	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	97,00±2,00	-	-	-	-
	500	-	39,60±1,20	-	97,00±1,23	-	-	-	-
IVG	0	0,13±0,02	0,06±0,01	0,08±0,01	0,27±0,2	1,02±0,01	0,06±0,01	0,35±0,02	0,10±0,01
	5	-	-	-	-	-	-	0,26±0,02	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	0,12±0,01	-	-	-	-	0,26±0,02	-
	100	-	-	-	-	-	-	0,26±0,03	-
	500	-	-	-	-	-	-	0,24±0,02	-
VGA	0	1,51±0,23	0,44±0,07	0,80±0,06	1,20±0,04	4,21±0,05	0,62±0,07	1,68±0,08	0,53±0,03
	5	-	-	-	-	-	-	1,38±0,06	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	0,75±0,10	-	-	-	-	1,40±0,06	-
	100	-	-	-	-	-	-	1,40±0,12	-
	500	-	-	-	-	-	-	1,24±0,07	-
TMG (h)	0	83,78±7,73	76,51±2,56	106,9±3,11	37,04±2,32	25,17±0,83	101,60±4,33	44,14±1,02	67,17±1,64
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	50,85±1,58	-
	100	-	84,74±2,17	-	-	-	-	51,39±0,80	-
	500	-	-	-	-	-	-	50,56±1,85	-

Os valores são as médias ± EP (n = 5). Estão mostradas as médias dos controles e dos tratamentos que resultaram em diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ). (-) valores não mostrados.

Tabela 2. Efeitos da melatonina sobre os índices de germinação das plântulas *A. hybridus*, *B. pilosa*, *D. insularis*, *G. max*, *I. grandifolia*, *U. decumbens*, *E. heterophylla* e *Z. mays*.

	[ ] (µM)	<i>A. hybridus</i>	<i>B. pilosa</i>	<i>D. insularis</i>	<i>G. max</i>	<i>I. grandifolia</i>	<i>U. decumbens</i>	<i>E. heterophylla</i>	<i>Z. mays</i>
% germinação	0	64,40±6,6	53,2±4,70	54,80±4,80	92,00±4,10	91,60±3,40	40,00±4,43	60,00±2,27	96,00±1,00
	5	82,00±4,0	-	-	-	98,00±0,90	-	-	-
	10	-	-	-	-	99,20±0,50	-	-	-
	20	-	-	-	-	96,40±1,30	-	-	-
	100	-	-	-	-	96,80±0,50	-	-	-
	500	-	-	-	-	97,20±1,00	-	-	-
IVG	0	0,13±0,02	0,13±0,02	0,08±0,01	0,29±0,03	1,01±0,01	0,07±0,01	0,29±0,03	0,09±0,00
	5	0,18±0,01	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	0,21±0,01	-
	100	-	-	-	-	-	-	0,22±0,02	-
	500	-	-	-	-	-	-	-	-
VGA	0	1,51±0,17	0,90±0,11	0,84±0,09	1,28±0,11	4,20±0,06	0,61±0,09	1,49±0,09	0,51±0,01
	5	2,05±0,12	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	0,55±0,08	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	1,10±0,02	-	-	-	-	-
	500	-	0,61±0,09	-	-	-	-	-	-
TMG (h)	0	78,18±2,18	75,15±2,48	102,90±2,01	35,83±3,06	24,29±0,19	108,30±6,30	48,65±2,30	70,24±0,86
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	46,77±5,40	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	25,48±0,52	-	-	-

Os valores são as médias ± EP (n = 5). Estão mostradas as médias dos controles e dos tratamentos que resultaram em diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ). (-) valores não mostrados

velocidade de germinação. Na concentração de 20  $\mu\text{M}$  houve aumento no IVG (+74,8 %) e na VGA (+71,0 %). O TMG de *B. pilosa* foi aumentado em 10,8 % pela concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

O L-triptofano estimulou também a porcentagem de germinação de *G. max* em cerca de 9,0 % em praticamente todas as concentrações ensaiadas. Entretanto, os índices IVG, VGA e TMG não foram modificados.

Em *E. heterophylla*, os efeitos do L-triptofano foram opostos aos observados em *B. pilosa* e *G. max*. Embora o percentual de sementes germinadas não tenha sido alterado, o IVG e a VGA foram reduzidas e o TMG foi aumentado, indicando alterações na velocidade com que as sementes germinaram. Na maior concentração testada de 500  $\mu\text{M}$ , o IVG foi reduzido em 31,4 % e a VGA em 26,2 % quando comparado com os respectivos controles. O TMG aumentou em 14,5 % na mesma concentração.

Os índices de germinação das outras espécies, *A. hybridus*, *D. insularis*, *I. grandifolia*, *U. decumbens* e *Z. mays* não foram alterados pelo tratamento com L-triptofano.

O tratamento com melatonina (Tab. 2) alterou os índices de germinação de um número maior de espécies se comparado com o tratamento com L-triptofano. Somente a *U. decumbens* e a *Z. mays* não tiveram algum índice de germinação alterado pelas diferentes concentrações de melatonina.

A melatonina causou um estímulo na porcentagem de sementes germinadas em *A. hybridus* na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (+27,3 %), que foi acompanhado de aumento no IVG (+34,3 %) e na VGA (+35,5 %).

Em *B. pilosa* a melatonina alterou apenas a VGA que foi reduzida em 38,0 e 31,2 % pelas concentrações de 20 e 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Em *D. insularis* foi observado um aumento de 30,6 % na VGA na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

Em *G. max* a melatonina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  aumentou o TMG em 30,53 % quando comparado com o controle.

Em *I. grandifolia*, a porcentagem de germinação foi estimulada entre 5,2 e 8,3 % por todas as concentrações testadas, mas a maior concentração de 500  $\mu\text{M}$  aumentou o TMG em 4,9 %.

A melatonina não alterou a porcentagem de sementes germinadas em *E. heterophylla*, mas reduziu o IVG nas concentrações de 20 (-27,6 %) e 100  $\mu\text{M}$  (-24,1 %).

3.2. Efeitos do L-triptofano e da melatonina sobre o crescimento inicial de *A. hybridus*, *B. pilosa*, *D. insularis*, *E. heterophylla*, *G. max*, *I. grandifolia*, *U. decumbens* e *Z. mays*

Os efeitos do L-triptofano e da melatonina sobre o comprimento total das plântulas das oito espécies selecionadas, estão mostrados nas Figuras 3 e 4. No tratamento em dicotiledôneas (Fig. 3), o L-triptofano foi mais ativo do que a melatonina, modificando o crescimento de algumas espécies em baixas concentrações (5 a 20  $\mu\text{M}$ ), enquanto que a melatonina nessa faixa de concentração foi inativa. Em *A. hybridus* o L-triptofano 10  $\mu\text{M}$  aumentou em 27,43 % o crescimento das plântulas (Fig. 3A), mas em *B. pilosa* um efeito inibidor de natureza transitória de cerca de 33 % foi observado no tratamento com as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 3C).

O crescimento de *E. heterophylla* foi também reduzido pelo L-triptofano a partir do tratamento com as concentrações de 20  $\mu\text{M}$  e concentrações maiores (100 e 500  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3E). A inibição foi de 11,6, 20,5 e 41,9 % nas concentrações de 20, 100 e 500  $\mu\text{M}$  de L-triptofano, respectivamente. O crescimento de *I. grandifolia* foi também inibido pelo tratamento com L-triptofano em toda a faixa de concentração testada (Fig. 3I), embora a inibição máxima na concentração de 500  $\mu\text{M}$  de 22,9 % tenha sido menor do que a causada no crescimento de *E. heterophylla*.

A melatonina em concentrações maiores causou alterações apenas em *E. heterophylla* (Fig. 3F). Os efeitos foram similares aos causados pelo L-triptofano com redução de 39,6 e 45,1 % no comprimento das plântulas nos tratamentos com 100 e 500  $\mu\text{M}$  de melatonina, respectivamente. O crescimento de *G. max* não foi modificado por nenhum dos tratamentos (Fig. 3G e H).

Nas três espécies de monocotiledôneas avaliadas (Fig. 4), *D. insularis*, *U. decumbens* e *Z. mays*, somente o tratamento com L-triptofano exerceu uma alteração significativa. A melatonina foi inativa em toda a faixa de concentração testada (Fig. 4B, D e F). O L-triptofano reduziu o comprimento total de plântulas de *D. insularis* em 20,2 % na concentração de 500  $\mu\text{M}$  (Fig. 4A). As plântulas de *U. decumbens* e *Z. mays* não foram alteradas por nenhum dos tratamentos (Fig. 4C e E).

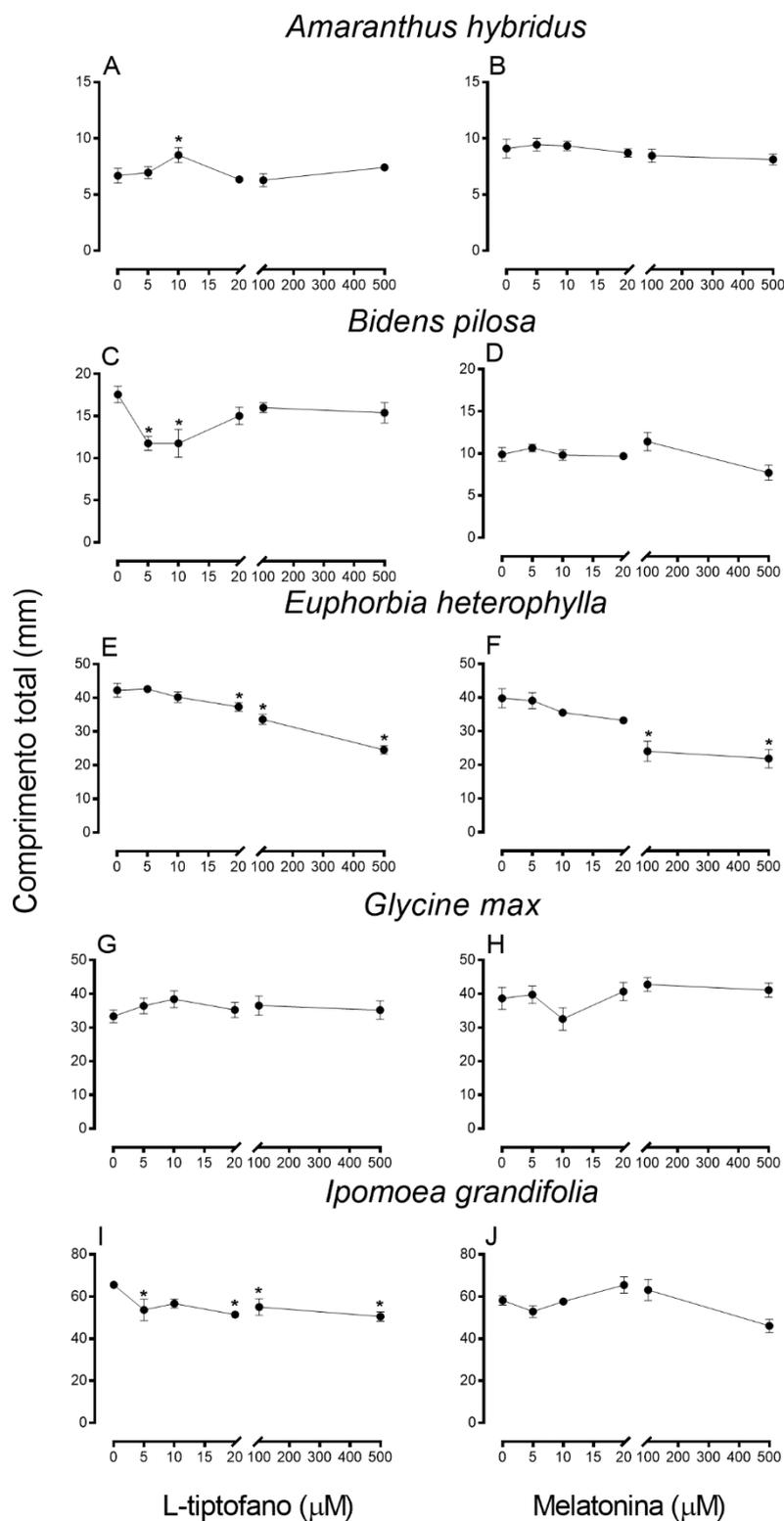


Figura 3. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano e melatonina sobre o comprimento total de: (A) e (B) *A. hybridus* crescidas por 168 horas; (C) e (D) *B. pilosa* crescidas por 120 horas; (E) e (F) *E. heterophylla* crescidas por 96 horas; (G) e (H) *G. max* crescidas por 96 horas e; (I) e (J) *I. grandifolia* crescidas por 96 horas. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

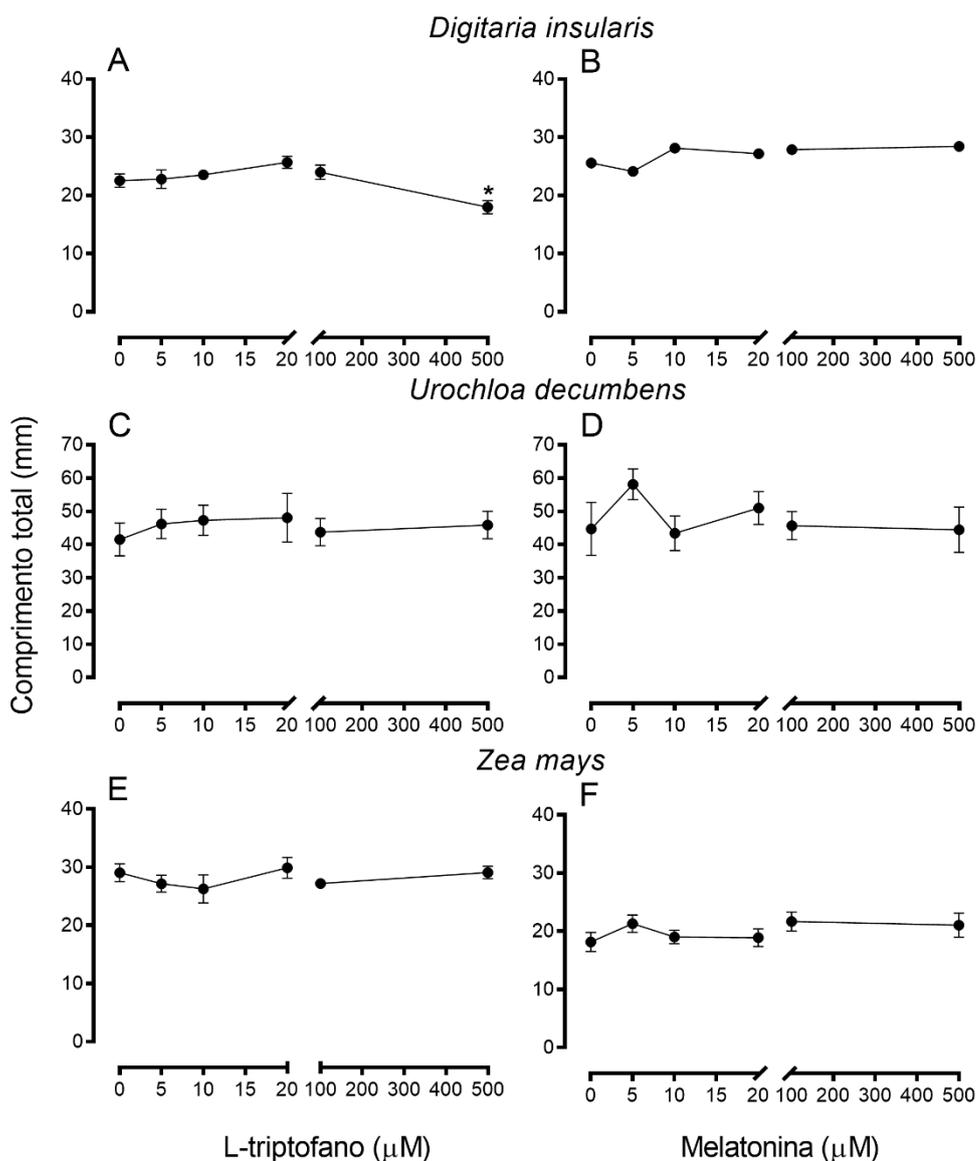


Figura 4. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano e melatonina sobre o comprimento total de: (A) e (B) *D. insularis* crescidas por 168 horas, (C) e (D) *U. decumbens* crescidas por 168 horas, (E) e (F) *Z. mays* crescidas por 96 horas. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados revelaram que não há uma clara correlação entre os efeitos de L-triptofano e de melatonina e a categoria das espécies (eudicotiledôneas ou monocotiledôneas). Para um estudo mais detalhado do modo de ação do L-triptofano e da melatonina foi selecionada a planta daninha que foi mais fortemente alterada por ambos os compostos, a *E. heterophylla* e uma espécie de cultivo, a *Z. mays*.

### 3.3. Efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre a germinação de *E. heterophylla* e *Z. mays*

O 5-hidroxitriptofano e a triptamina são sintetizados a partir do L-triptofano e esses geram, por vias independentes, a serotonina que posteriormente pode ser convertido à melatonina (Fig. 2). Um estudo comparativo das ações dos quatro compostos, L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina foi realizado em *Z. mays* e *E. heterophylla*. Para este estudo foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 20, 100, 250, 400 e 500  $\mu\text{M}$ . A Tabela 3 mostra os efeitos dos quatro tratamentos sobre a germinação de *E. heterophylla* e *Z. mays*.

O percentual máximo de sementes que germinaram em cada tratamento ao final do período experimental de *E. heterophylla* foi pouco alterado. Houve uma redução de 19,5 % no tratamento com 400  $\mu\text{M}$  de L-triptofano e 17,3 % no tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de 5-hidroxitriptofano, quando comparados com os respectivos controles. A triptamina 20  $\mu\text{M}$  reduziu a porcentagem final de germinação em 17,9 %. A melatonina não alterou esse índice.

A velocidade com que as sementes germinaram no período experimental foi significativamente modificada, conforme revelam os índices de germinação IVG e VGA. Em termos gerais, observou-se uma redução no IVG e na VGA que foi mais intensa nos tratamentos com L-triptofano e triptamina e que foram evidenciados a partir das concentrações de 5  $\mu\text{M}$ .

Na maior concentração, de 500  $\mu\text{M}$ , a triptamina inibiu o IVG em 54,1 % enquanto que o L-triptofano foi relativamente menos potente (inibição de 31,4 %). O 5-hidroxitriptofano e a melatonina alteraram o IVG em menor proporção. O L-triptofano e a triptamina foram também os que mais modificaram o índice VGA. Na maior concentração de 500  $\mu\text{M}$  a triptamina inibiu a VGA em 46,1 % e o L-triptofano em 26,2 %. O índice VGA foi também reduzido pelo 5-hidroxitriptofano 100  $\mu\text{M}$  (-22,65 %), mas esse índice não foi alterado pela melatonina.

Houve aumento significativo no TMG no tratamento com o L-triptofano e triptamina. Na maior dose, de 500  $\mu\text{M}$ , o L-triptofano aumentou o TMG em 14,5 % e a triptamina em 48,7 %. A melatonina por outro lado, reduziu o TMG nas concentrações de 250  $\mu\text{M}$  (-18,2 %) e 400  $\mu\text{M}$  (-15,6 %). Nenhum dos tratamentos alterou significativamente os índices de germinação de *Z. mays* (Tab. 03).

Tabela 3. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano (T), 5-hidroxitriptofano (H), triptamina (Tm) e melatonina (M) sobre a germinação das plântulas de *E. heterophylla* e *Z. mays* crescidas por 96 horas.

	<i>E. heterophylla</i>				<i>Z. mays</i>				
	[ ] ( $\mu$ M)	Germinação (%)	IVG	VGA	TMG	Germinação (%)	IVG	VGA	TMG
T	0	59,6 $\pm$ 2,5	0,350,02	1,68 $\pm$ 0,08	44,14 $\pm$ 1,02	89,00 $\pm$ 2,45	0,10 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,03	67,17 $\pm$ 1,64
	5	56,4 $\pm$ 2,6	<b>0,26<math>\pm</math>0,02*</b>	<b>1,38<math>\pm</math>0,06*</b>	48,74 $\pm$ 1,25	90,00 $\pm$ 2,24	0,10 $\pm$ 0,00	0,48 $\pm$ 0,02	70,50 $\pm$ 2,04
	10	60,8 $\pm$ 3,1	0,29 $\pm$ 0,01	1,54 $\pm$ 0,08	46,66 $\pm$ 2,35	91,00 $\pm$ 2,92	0,10 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	71,23 $\pm$ 2,07
	20	61,6 $\pm$ 3,4	<b>0,26<math>\pm</math>0,02*</b>	<b>1,40<math>\pm</math>0,06*</b>	<b>50,85<math>\pm</math>1,58*</b>	92,00 $\pm$ 2,00	0,11 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 0,03	67,32 $\pm$ 1,73
	100	61,2 $\pm$ 3,5	<b>0,26<math>\pm</math>0,03*</b>	<b>1,40<math>\pm</math>0,12*</b>	<b>51,39<math>\pm</math>0,80*</b>	87,00 $\pm$ 2,55	0,10 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,03	66,84 $\pm$ 1,07
	250	64,0 $\pm$ 2,3	0,32 $\pm$ 0,02	1,63 $\pm$ 0,10	46,82 $\pm$ 0,75	89,00 $\pm$ 1,87	0,11 $\pm$ 0,00	0,53 $\pm$ 0,01	67,34 $\pm$ 0,98
	400	<b>48,0<math>\pm</math>1,4*</b>	<b>0,27<math>\pm</math>0,02*</b>	<b>1,34<math>\pm</math>0,08*</b>	46,86 $\pm$ 1,67	87,00 $\pm$ 3,74	0,10 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,04	66,33 $\pm$ 1,9
	500	52,8 $\pm$ 2,5	<b>0,24<math>\pm</math>0,02*</b>	<b>1,24<math>\pm</math>0,07*</b>	<b>50,56<math>\pm</math>1,85*</b>	93,00 $\pm$ 2,55	0,10 $\pm$ 0,00	0,59 $\pm$ 0,03	64,53 $\pm$ 2,07
H	0	61,40 $\pm$ 2,92	0,38 $\pm$ 0,02	1,81 $\pm$ 0,09	42,77 $\pm$ 0,97	93,00 $\pm$ 1,23	0,10 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,03	72,21 $\pm$ 2,23
	5	61,60 $\pm$ 5,31	0,37 $\pm$ 0,05	1,79 $\pm$ 0,20	43,04 $\pm$ 1,71	98,00 $\pm$ 1,23	0,08 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01	70,77 $\pm$ 0,38
	10	65,60 $\pm$ 2,23	0,39 $\pm$ 0,02	1,86 $\pm$ 0,09	44,13 $\pm$ 1,20	97,00 $\pm$ 2,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,02	71,47 $\pm$ 1,46
	20	61,60 $\pm$ 1,60	0,36 $\pm$ 0,02	1,74 $\pm$ 0,06	43,85 $\pm$ 0,79	99,00 $\pm$ 1,00	0,09 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,02	69,55 $\pm$ 1,17
	100	<b>50,80<math>\pm</math>4,84*</b>	<b>0,28<math>\pm</math>0,03*</b>	<b>1,40<math>\pm</math>0,13*</b>	44,49 $\pm$ 1,08	99,00 $\pm$ 1,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,01	71,76 $\pm$ 0,70
	250	61,20 $\pm$ 2,73	0,38 $\pm$ 0,02	1,82 $\pm$ 0,05	41,98 $\pm$ 1,26	95,00 $\pm$ 2,24	0,09 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,03	70,59 $\pm$ 1,30
	400	58,4 $\pm$ 2,99	0,38 $\pm$ 0,03	1,74 $\pm$ 0,11	43,11 $\pm$ 2,38	93,00 $\pm$ 1,23	0,10 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,04	73,41 $\pm$ 2,43
	500	53,6 $\pm$ 1,45	0,34 $\pm$ 0,02	1,63 $\pm$ 0,07	41,63 $\pm$ 0,72	99,00 $\pm$ 1,00	0,10 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01	66,39 $\pm$ 0,89
Tm	0	61,20 $\pm$ 3,01	0,37 $\pm$ 0,04	1,78 $\pm$ 0,16	43,35 $\pm$ 2,26	91,00 $\pm$ 1,87	0,11 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,05	55,33 $\pm$ 3,02
	5	60,00 $\pm$ 2,61	<b>0,22<math>\pm</math>0,02*</b>	<b>1,26<math>\pm</math>0,06*</b>	<b>54,13<math>\pm</math>1,70*</b>	94,00 $\pm$ 2,92	0,11 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,03	59,43 $\pm$ 1,81
	10	68,40 $\pm$ 2,99	<b>0,24<math>\pm</math>0,02*</b>	<b>1,38<math>\pm</math>0,10*</b>	<b>56,55<math>\pm</math>2,15*</b>	94,00 $\pm$ 1,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,04	59,28 $\pm$ 2,25
	20	<b>50,40<math>\pm</math>4,58*</b>	<b>0,17<math>\pm</math>0,02*</b>	<b>1,00<math>\pm</math>0,09*</b>	<b>56,23<math>\pm</math>1,48*</b>	89,00 $\pm$ 4,85	0,11 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,03	58,67 $\pm$ 0,99
	100	60,50 $\pm$ 0,96	<b>0,18<math>\pm</math>0,01*</b>	<b>1,14<math>\pm</math>0,09*</b>	<b>58,23<math>\pm</math>2,64*</b>	96,00 $\pm$ 1,87	0,11 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,03	65,99 $\pm$ 1,94
	250	54,80 $\pm$ 3,26	<b>0,15<math>\pm</math>0,01*</b>	<b>0,83<math>\pm</math>0,04*</b>	<b>66,29<math>\pm</math>1,49*</b>	90,00 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,05	61,87 $\pm$ 3,14
	400	59,20 $\pm$ 2,87	<b>0,17<math>\pm</math>0,01*</b>	<b>0,91<math>\pm</math>0,06*</b>	<b>65,53<math>\pm</math>1,57*</b>	91,00 $\pm$ 1,87	0,10 $\pm$ 0,00	0,60 $\pm$ 0,03	58,95 $\pm$ 2,34
	500	60,40 $\pm$ 2,93	<b>0,17<math>\pm</math>0,01*</b>	<b>0,96<math>\pm</math>0,07*</b>	<b>64,45<math>\pm</math>1,32*</b>	87,00 $\pm$ 4,06	0,09 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,05	59,81 $\pm$ 2,98
M	0	60,00 $\pm$ 2,27	0,29 $\pm$ 0,03	1,49 $\pm$ 0,09	48,65 $\pm$ 2,30	96,00 $\pm$ 1,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,51 $\pm$ 0,01	70,24 $\pm$ 0,86
	5	63,20 $\pm$ 3,93	0,23 $\pm$ 0,02	1,37 $\pm$ 0,11	51,86 $\pm$ 0,72	96,00 $\pm$ 2,45	0,09 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,03	69,04 $\pm$ 1,25
	10	62,40 $\pm$ 2,99	0,25 $\pm$ 0,05	1,44 $\pm$ 0,12	49,75 $\pm$ 1,58	97,00 $\pm$ 2,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,03	67,12 $\pm$ 1,28
	20	58,40 $\pm$ 2,56	<b>0,21<math>\pm</math>0,01</b>	1,22 $\pm$ 0,08	53,99 $\pm$ 1,52	95,00 $\pm$ 1,58	0,09 $\pm$ 0,00	0,48 $\pm$ 0,02	71,80 $\pm$ 1,66
	100	59,20 $\pm$ 4,76	<b>0,22<math>\pm</math>0,02</b>	1,21 $\pm$ 0,16	55,30 $\pm$ 2,68	98,00 $\pm$ 2,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,55 $\pm$ 0,03	68,19 $\pm$ 1,46
	250	51,20 $\pm$ 4,03	0,32 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,06	<b>39,77<math>\pm</math>2,64*</b>	99,00 $\pm$ 1,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,57 $\pm$ 0,03	67,41 $\pm$ 1,62
	400	51,60 $\pm$ 2,04	0,36 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,08	<b>41,06<math>\pm</math>2,02*</b>	96,00 $\pm$ 1,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,57 $\pm$ 0,02	66,85 $\pm$ 1,51
	500	58,20 $\pm$ 3,00	0,26 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,05	50,29 $\pm$ 1,53	98,00 $\pm$ 1,23	0,09 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,0	67,57 $\pm$ 1,82

Os valores são as médias  $\pm$  EP (n = 5). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4. Efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre o desenvolvimento inicial das plântulas de *E. heterophylla* e *Z. mays*

A Figura 5 mostra os valores do comprimento das raízes e das partes aéreas de plântulas de *E. heterophylla*, bem como as suas biomassas fresca total e seca total. A raiz foi a parte da plântula mais sensível a todos os tratamentos (Fig. 5A-D). Embora o 5-hidroxitriptofano e a melatonina não tenham exercidos fortes efeitos sobre os índices de germinação de *E. heterophylla*, se comparados com os efeitos do L-triptofano e da triptamina, o desenvolvimento das plântulas resultantes foi igualmente inibido. Os valores de IC<sub>50</sub> para o 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina foram de 350,4 µM; 244,2 µM e 85,1 µM respectivamente. O IC<sub>50</sub> para o L-triptofano não pode ser calculado pois na máxima concentração testada de 500 µM a inibição foi menor que 50 %, ou seja, foi de 46,1 %.

A parte aérea de *E. heterophylla* também foi reduzida pelos tratamentos (Fig. 5E-H), porém em menor proporção se comparada com o crescimento das raízes. O L-triptofano, a triptamina e a melatonina foram ativas somente nas concentrações acima de 250 µM. A inibição na maior concentração de 500 µM quando comparados com os respectivos controles foi de 27,9 %, 32,9 % e 19,8 %, pelo L-triptofano, triptamina e melatonina, respectivamente. O 5-hidroxitriptofano não alterou o comprimento das partes aéreas (Fig. 5F). As biomassas frescas das plântulas foram reduzidas por todos os tratamentos, pelas concentrações maiores do que 250 µM. Na maior concentração de 500 µM de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina, a redução foi respectivamente de 22,6 %, 27,6 %, 31,4 % e 26,5 % quando comparado com os respectivos controles (Fig. 5I-L). As biomassas secas das plântulas não foram significativamente alteradas por nenhum dos tratamentos (Fig. 5M-P), com exceção de uma redução de 34,4 % pelo tratamento com triptamina 250 µM (Fig. 5O). Nota-se que a triptamina foi, em geral, mais ativa do que os outros compostos.

Na Figura 6 estão mostrados os parâmetros de crescimento de *Z. mays*. As biomassas das partes aéreas e das raízes foram mostradas separadamente. Confirmando os dados mostrados anteriormente (Fig. 4) o L-triptofano não alterou nenhum parâmetro indicador de desenvolvimento de *Z. mays*. O

5-hidroxitriptofano igualmente não alterou nenhum parâmetro avaliado. A triptamina exerceu diversas alterações: redução de 18,2 % no comprimento da raiz na concentração de 500  $\mu\text{M}$  (Fig. 6C); estímulo no comprimento da parte aérea nas concentrações de 250 (+44,2 %) e 500  $\mu\text{M}$  (+53,4 %) (Fig. 6G); aumento da biomassa fresca da parte aérea no tratamento com 500  $\mu\text{M}$  (+56,8 %) (Fig. 6K).

A melatonina exerceu um estímulo no crescimento da parte aérea de *Z. mays* em 29,6 e 24,6 % no tratamento com as concentrações de 10  $\mu\text{M}$  (+29,6 %) e 250  $\mu\text{M}$  (+24,6 %) (Fig. 6H).

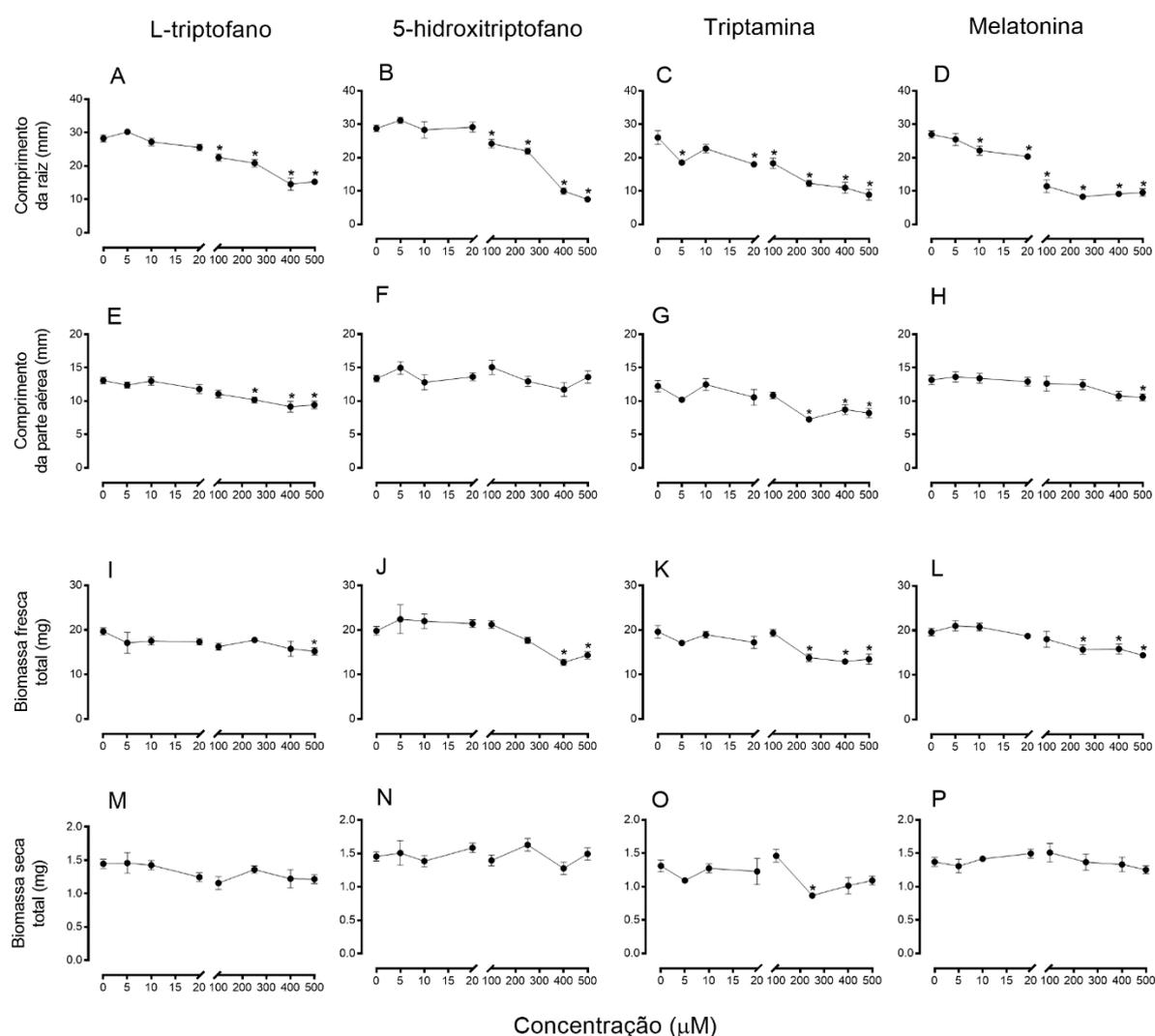


Figura 5. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre o (A-D) comprimento das raízes, (E-H) comprimento das partes aéreas, (I-L) biomassa fresca total e (M-P) biomassa seca total em plântulas de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

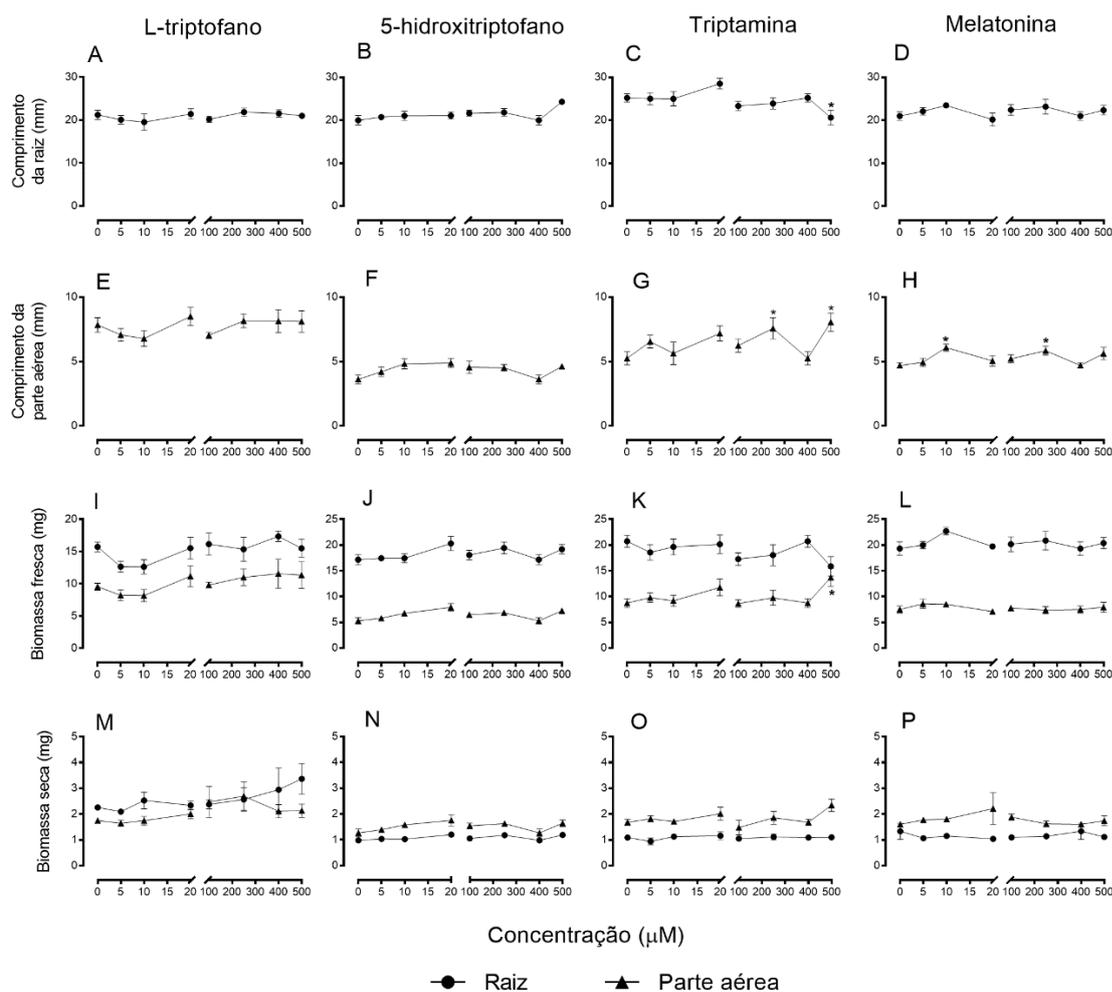


Figura 6. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre o (A-D) comprimento das raízes, (E-H) comprimento das partes aéreas, (I-L) biomassa fresca e (M-P) biomassa seca em plântulas de *Z. mays* crescidas por 96 horas. (●) Raízes das plântulas, (▲) Parte aérea das plântulas. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.5. Efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre a atividade respiratória dos ápices das raízes de plântulas de *E. heterophylla* e *Z. mays*

Para avaliar se as alterações no desenvolvimento das raízes foram decorrentes de perturbações no metabolismo energético mitocondrial foram medidas a atividade respiratória de ápices radiculares de plântulas de *E. heterophylla* e *Z. mays* crescidas na ausência (controle) e presença de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina ou melatonina nas concentrações de 25, 100 e 250  $\mu\text{M}$ . Os resultados estão mostrados na Figura 7.

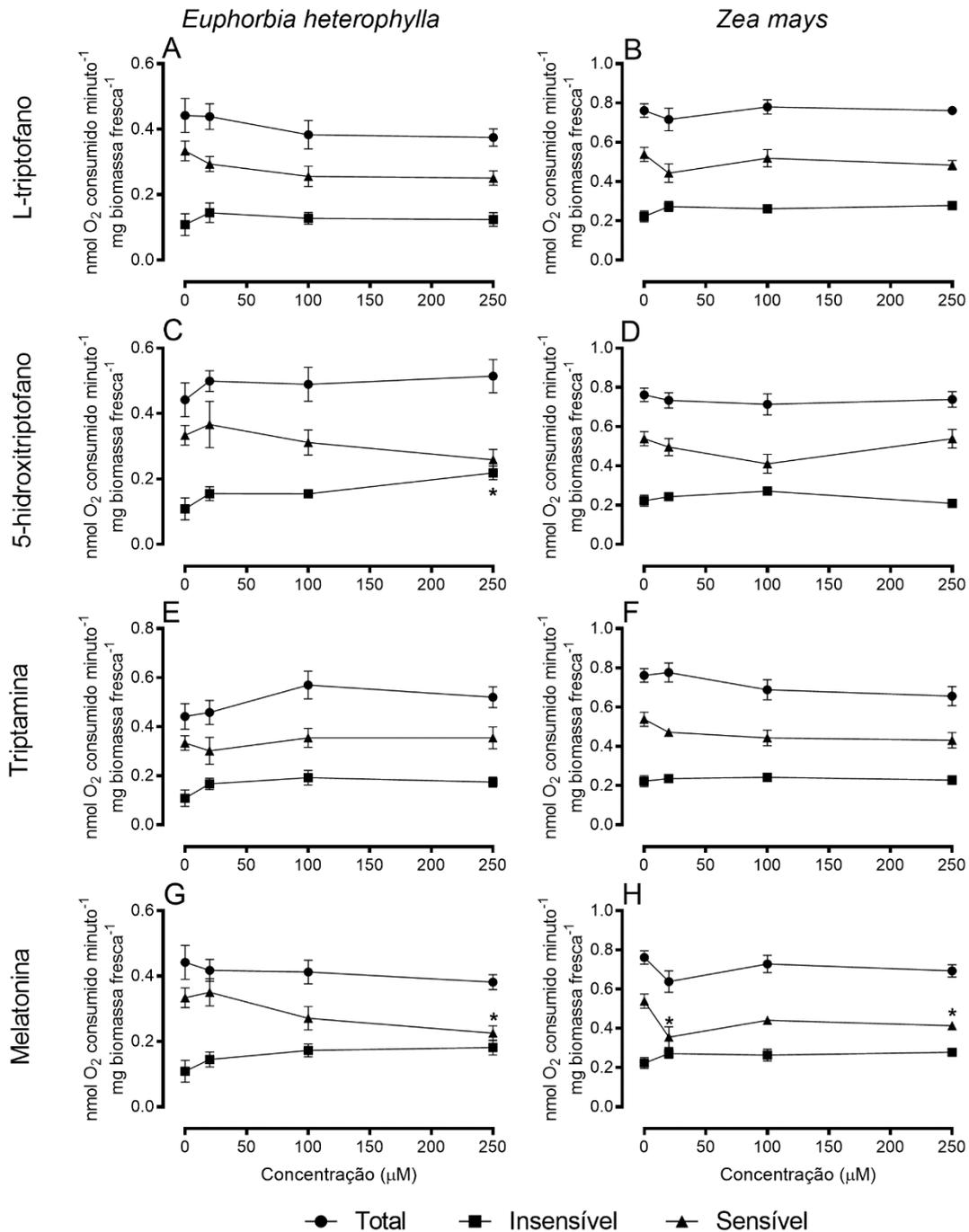


Figura 7. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre a atividade respiratória de ápices radiculares de *E. heterophylla* e *Z. mays* crescidas por 96 horas. (●) Respiração total: taxa de consumo de oxigênio na ausência de KCN, (■) KCN-insensível: respiração após adição de KCN e (▲) KCN-sensível: diferença entre o consumo de oxigênio medido na ausência e na presença de KCN. Os valores são as médias ± EP (n = 6-9). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

A respiração KCN-sensível, que indica o consumo de oxigênio devido à atividade da via citocromo-oxidase (COX) mitocondrial (Millar et al., 2011), representou em *E. heterophylla* cerca de 76 % da respiração total nas raízes das

plântulas controle. Já a respiração KCN-insensível, que representa o consumo de oxigênio devido à atividade da oxidase alternativa (AOX) mitocondrial e de oxidases extramitocondriais (Bendall e Bonner, 1971) foi cerca de 24 % da respiração total. Alterações significativas em *E. heterophylla* foram observadas nos tratamentos com 250 µM de 5-hidroxitriptofano e melatonina. O 5-hidroxitriptofano estimulou a respiração KCN-insensível em 101,3 % (Fig. 7C) quando comparado com a respiração do controle e a melatonina inibiu a respiração KCN-sensível em 34,4 % (Fig. 7G).

A respiração dos ápices radiculares de *Z. mays* foi alterada apenas pelo tratamento com melatonina. Houve uma inibição na respiração KCN-sensível em 34,0 e 23,2 % nas concentrações de 20 e 250 µM, respectivamente (Fig. 7H).

3.6. Efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre os conteúdos de EROs, de MDA, de dienos conjugados e de atividade de enzimas antioxidante em raízes de plântulas de *E. heterophylla*

Os efeitos dos quatro derivados indólicos sobre o estado redox e o sistema de defesa antioxidante das raízes das plântulas de *E. heterophylla* e de *Z. mays* foram investigados por medidas do conteúdo de EROs, de indicadores de danos oxidativos (MDA e dienos conjugados) e da atividade de enzimas antioxidantes.

Na Figura 8 estão mostrados os conteúdos de EROs das raízes das plântulas de *E. heterophylla*. O 5-hidroxitriptofano, a triptamina e a melatonina estimularam a produção de EROs em toda a faixa de concentração testada. O L-triptofano foi inativo (Fig. 8A). O aumento causado pelo 5-hidroxitriptofano foi muito similar nas três concentrações (próximo de 70 %) (Fig. 8B). O conteúdo máximo de EROs pelo tratamento com triptamina e melatonina foi alcançado na concentração de 100 µM e a melatonina foi mais ativa do que a triptamina. Na maior concentração de 250 µM o conteúdo de EROs no tratamento com a triptamina foi de 54,0 % (Fig. 8C) e com a melatonina foi de 107,0 % (Fig. 8D).

O conteúdo de MDA aumentou apenas nas raízes de plântulas de *E. heterophylla* crescidas na presença de melatonina e foi apenas na concentração de 100 µM (+51,6 %) (Fig. 8H).

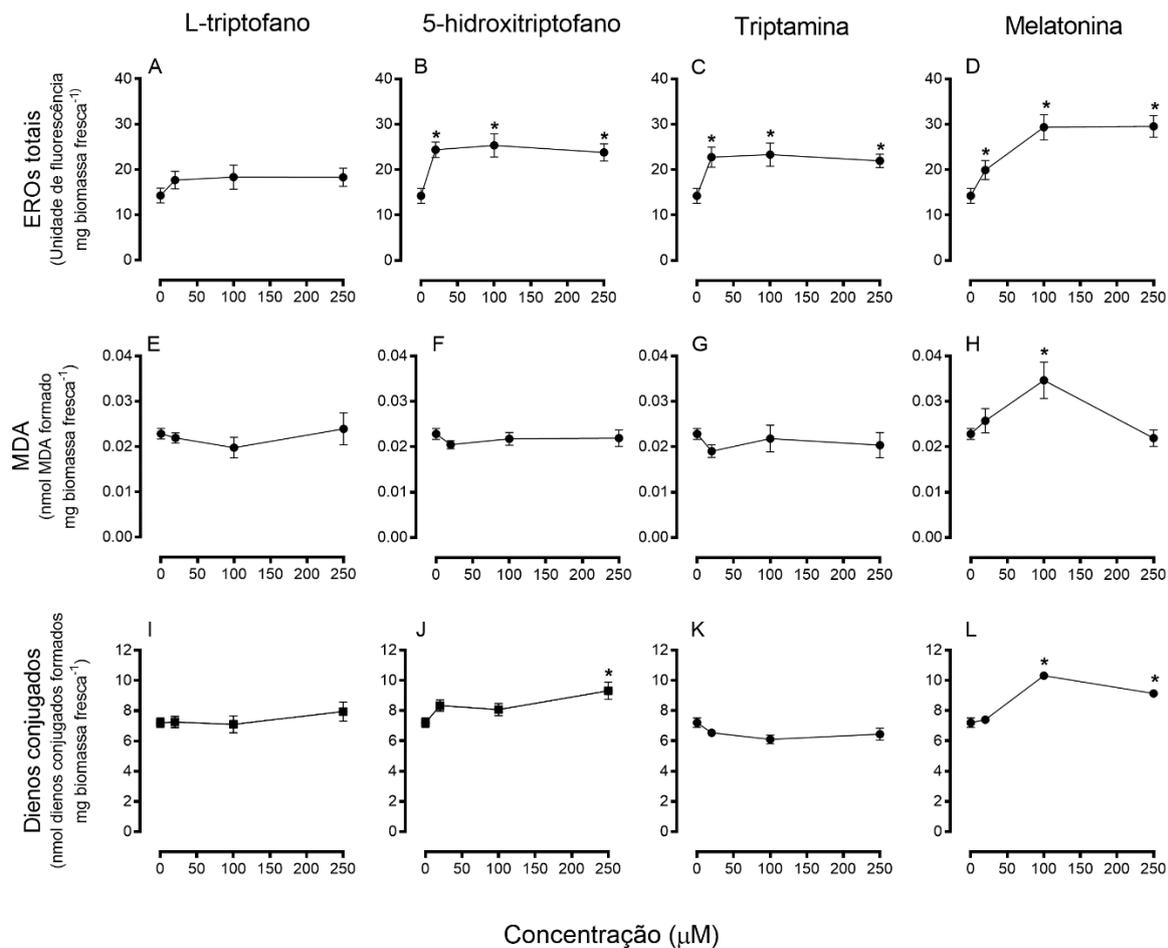


Figura 8. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre parâmetros indicadores de estresse oxidativo em raízes de plântulas de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. (A-D) EROs totais, (E-H) MDA e (I-L) dienos conjugados. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 5-10$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

O conteúdo de dienos conjugados foi alterado somente pelos tratamentos com 5-hidroxitriptofano e melatonina. O 5-hidroxitriptofano causou um incremento de 29,4 % na concentração de 250 µM (Fig. 8J). A melatonina aumentou o conteúdo de dienos conjugados em 43,3 e 27,0 % nas concentrações de 100 e 250 µM, respectivamente (Fig. 8L).

A Figura 9 mostra as atividades de enzimas do sistema antioxidante, a SOD, CAT, POD, GR e a APx, avaliadas nas raízes das plântulas crescidas na ausência (controle) e presença de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina ou melatonina, nas concentrações de 25, 100 e 250 µM.

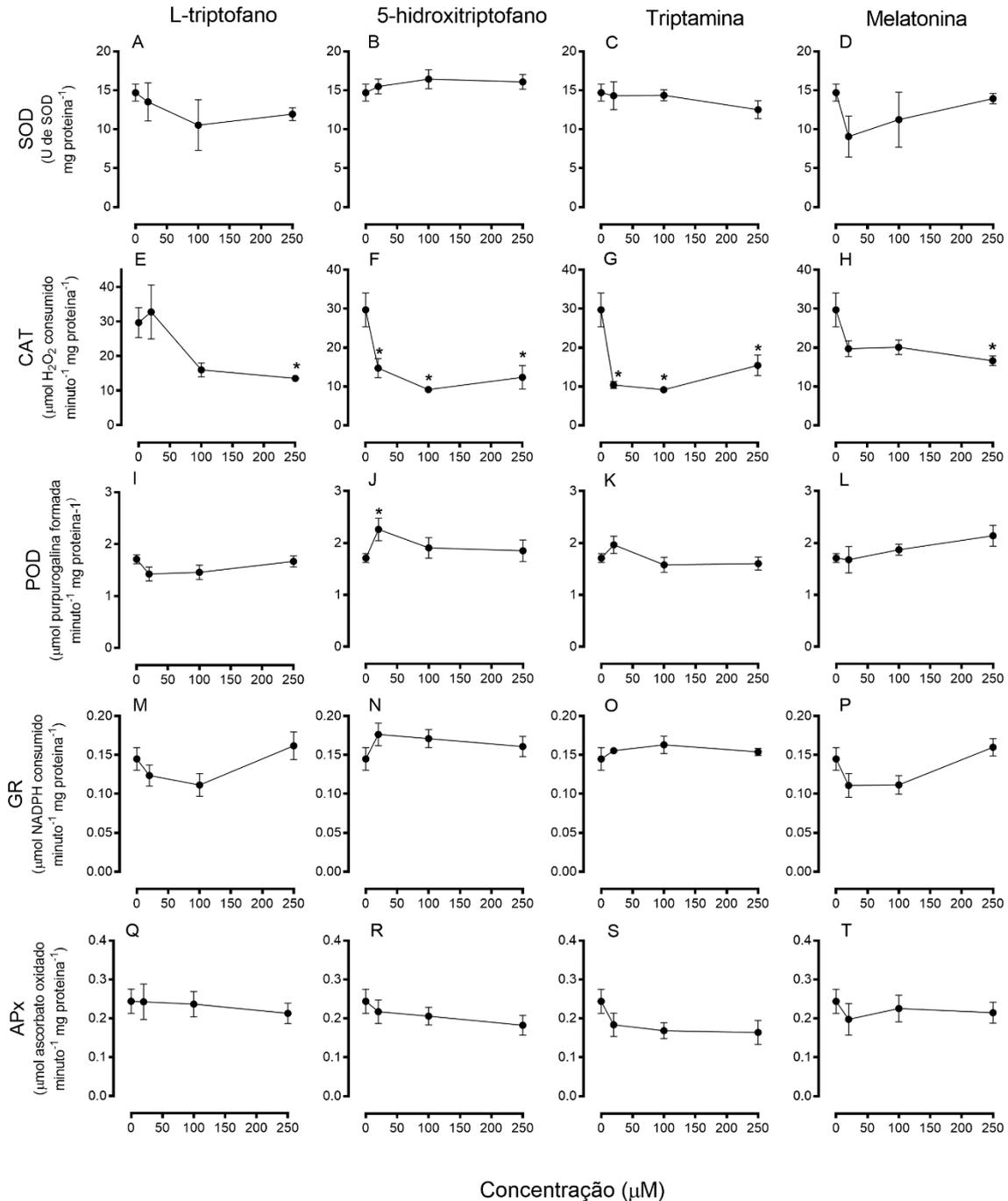


Figura 9. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre a atividade das enzimas do sistema antioxidante: (A-D) superóxido dismutase (SOD), (E-H) catalase (CAT), (I-L) peroxidase (POD), (M-P) glutatona redutase (GR) e (Q-T) ascorbato peroxidase (APx) das raízes de plântulas de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. Os valores são as médias  $\pm$  EP (n = 6-14). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

Quando comparados com os valores das atividades das plântulas controles, observou-se que: a atividade da SOD não foi alterada por nenhum dos tratamentos (Fig. 9A-D); a atividade da CAT foi reduzida pelo L-triptofano 250  $\mu\text{M}$

(-54,4 %) (Fig. 9E), pelo 5-hidroxitriptofano 20, 100 e 250  $\mu\text{M}$  (-50,6 %, -69,1 % e -58,4 %, respectivamente) (Fig. 9F), pela triptamina 20, 100 e 250  $\mu\text{M}$  (-65,1 %, -69,2 % e -48,1 %, respectivamente) e pela melatonina 250  $\mu\text{M}$  (-44,2 %) (Fig. 9G); a POD foi estimulada em 32,4 % pelo 5-hidroxitriptofano 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 9J); A atividade da APx e da GR não foram modificados por nenhum dos tratamentos (Fig. 9M-T).

3.7. Efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre os conteúdos de EROs, de MDA, de dienos conjugados e de enzimas antioxidante em raízes de plântulas de *Z. mays*.

Experimentos similares aos mostrados nas Figuras 8 e 9 foram realizados em *Z. mays* (Fig. 10 e 11).

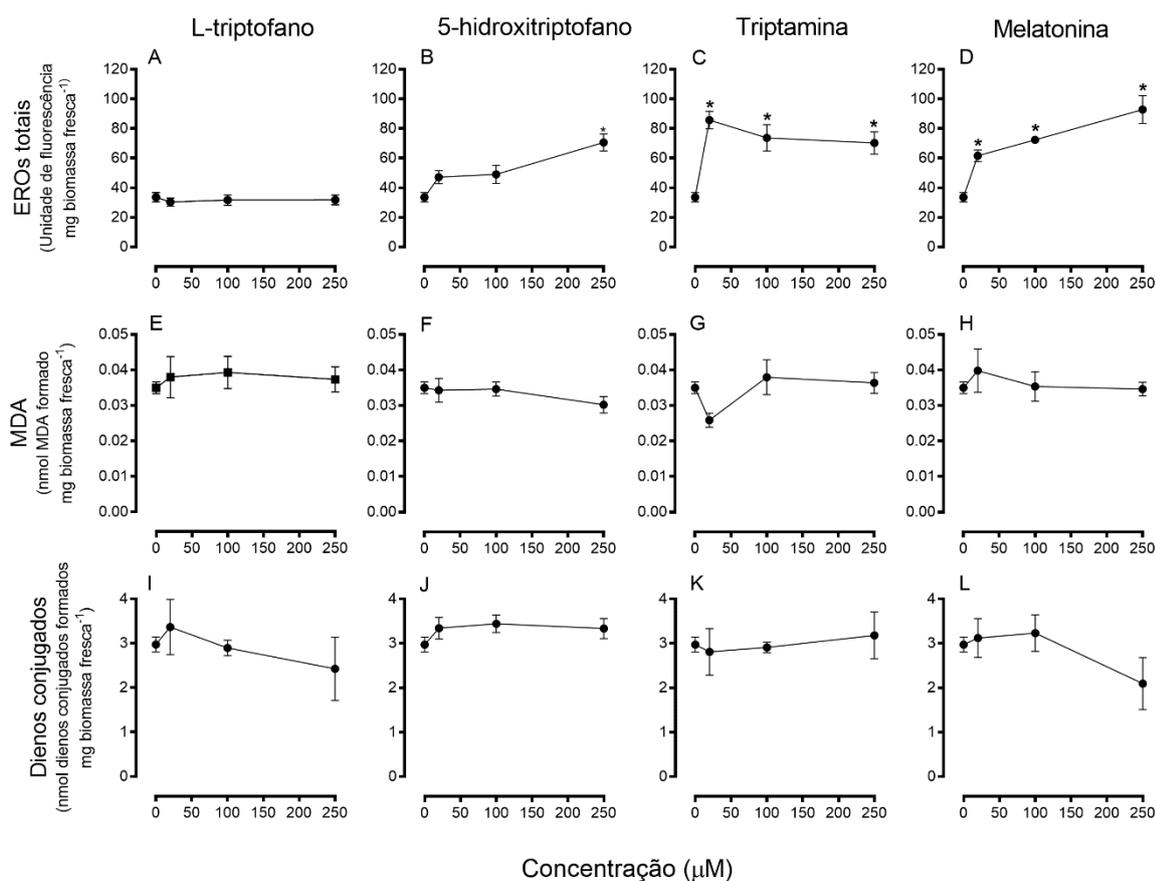


Figura 10. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre os parâmetros indicadores de estresse oxidativo de raízes de plântulas de *Z. mays* crescidas por 96 horas. (A-D) EROs totais, (E-H) MDA e (I-L) dienos conjugados. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 4-10$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

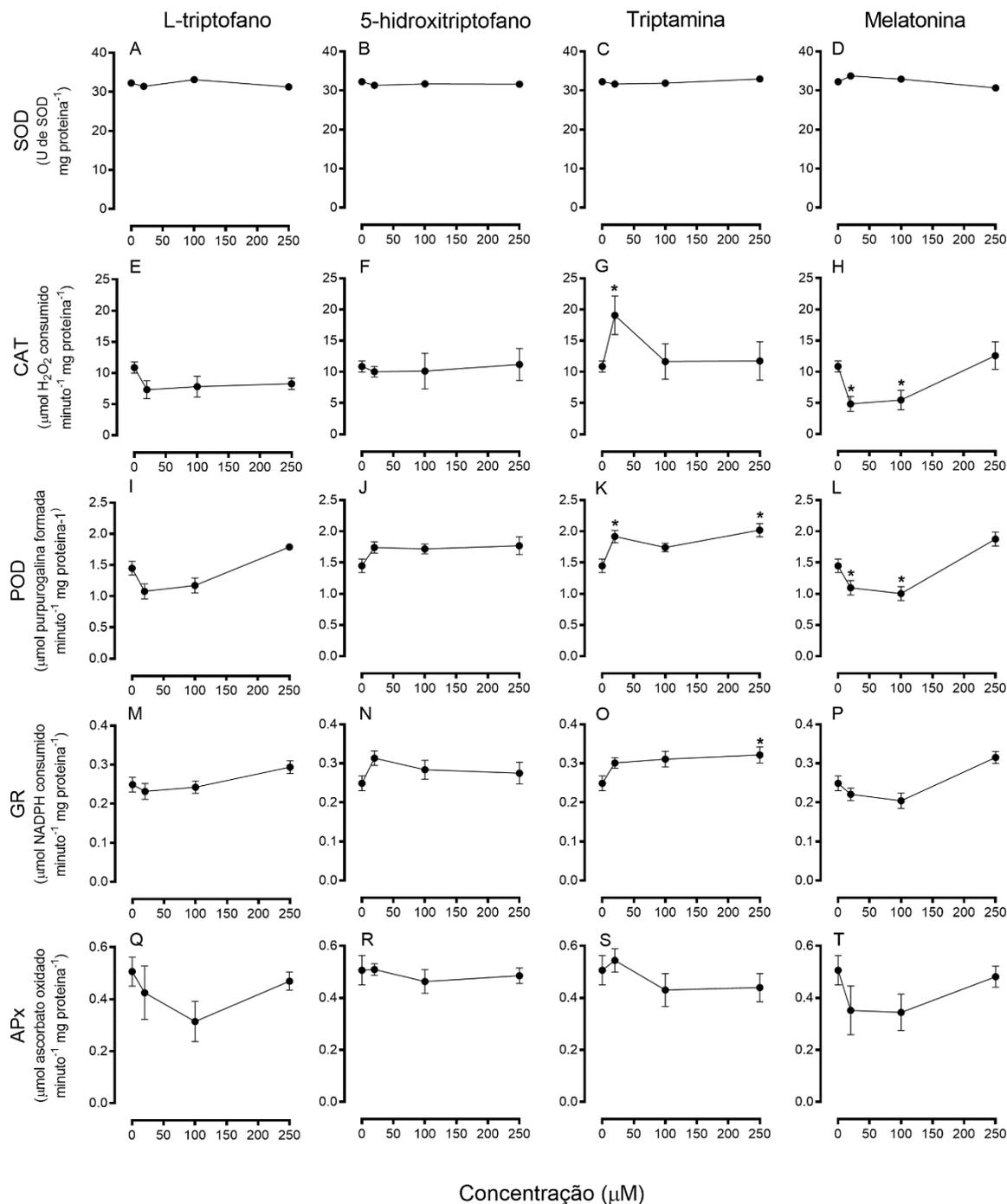


Figura 11. Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre a atividade das enzimas do sistema antioxidante: (A-D) superóxido dismutase (SOD), (E-H) catalase (CAT), (I-L) peroxidase (POD), (M-P) glutatona redutase (GR) e (Q-T) ascorbato peroxidase (APx) de raízes de plântulas de *Z. mays* crescidas por 96 horas. Os valores são expressos como média  $\pm$  EP ( $n = 6-15$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

Os efeitos dos quatro tratamentos no conteúdo de EROs foram muito semelhantes aos observados em *E. heterophylla* (Fig. 10): não foram observadas alterações no tratamento com L-triptofano (Fig. 10A), mas houve aumento no

tratamento com o 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina. O 5-hidroxitriptofano foi ativo apenas na maior concentração testada (250  $\mu\text{M}$ ), causando um aumento de 110,5 % no teor de EROs (Fig. 10B). Já a triptamina e a melatonina foram ativas nas três concentrações testadas, sendo a melatonina a mais ativa. Na maior concentração de 250  $\mu\text{M}$  o aumento causado pela triptamina foi de 109,4 % (Fig. 10C) e pela melatonina foi de 176,5 % (Fig. 10D).

Os níveis de MDA e dienos conjugados não foram alterados por nenhum dos tratamentos (Fig. 10E-L).

As atividades das enzimas antioxidantes de raízes de *Z. mays* estão mostradas na Figura 11. Tal como foi observado na *E. heterophylla*, as atividades da SOD e da APx não foram modificadas significativamente por nenhum dos tratamentos. A atividade da CAT foi modificada pela triptamina e pela melatonina. A triptamina promoveu um estímulo de 75,6 % na concentração de 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 11G) e a melatonina promoveu inibição de 55,2 % e 49,4 % nas concentrações de 20 e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A atividade da POD foi estimulada pela triptamina 20 (+32,5 %) e 250  $\mu\text{M}$  (+39,6 %) (Fig. 11K), mas foi inibida pela melatonina 20 (-24,3 %) e 100  $\mu\text{M}$  (-30,6 %) quando comparados com os respectivos controles (Fig. 11L). A atividade da GR foi estimulada em 29,2 % pela triptamina 250  $\mu\text{M}$  (Fig. 11O).

3.8. Efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre a atividade de enzimas chaves do metabolismo de carboidratos e de compostos nitrogenados em raízes de plântulas de *E. heterophylla* e de *Z. mays*.

Para investigar se os diferentes tratamentos interferiram sobre o metabolismo primário de *E. heterophylla* e de *Z. mays*, foram avaliadas nas raízes das plântulas as atividades de algumas enzimas chaves do metabolismo de carboidratos: GK, G6PD, PK e MDH; e de uma enzima chave do metabolismo de compostos nitrogenados, a GS.

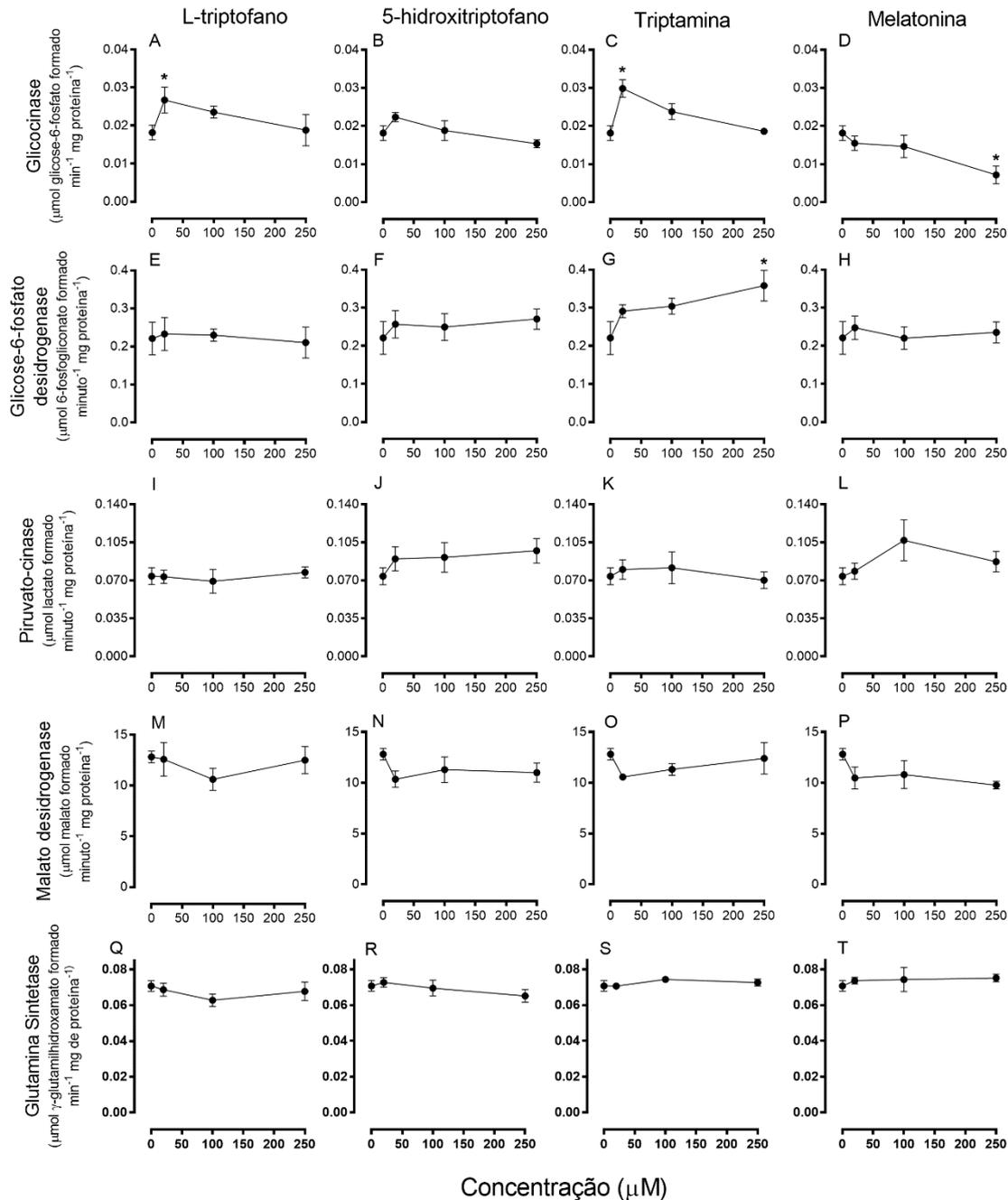


Figura. 12 Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre a atividade das enzimas: (A-D) glicocinase (GK), (E-H) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), (I-L) piruvato-cinase (PK), (M-P) malato desidrogenase (MDH) e (Q-T) glutamina sintetase (GS) de raízes de plântulas de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 4-5$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

No tratamento em *E. heterophylla* (Fig. 12), a enzima GK foi a mais alterada em relação aos respectivos controles: a atividade da enzima foi estimulada pela menor dose testada de 20  $\mu\text{M}$  tanto pelo L-triptofano (+47,2 %) (Fig. 12A) quanto pela triptamina (+65,4 %) (Fig. 12C). Um efeito de inibição foi observado no tratamento com a melatonina 250  $\mu\text{M}$  (-60,6 %). A atividade da G6PD de

*E. heterophylla* foi alterada apenas pela triptamina, que causou um estímulo somente na maior dose testada de 250  $\mu\text{M}$  (+62,3 %) (Fig. 12G). As atividades das enzimas PK, MDH, GS não foram alteradas por nenhum dos tratamentos avaliados (Fig. 12I-T).

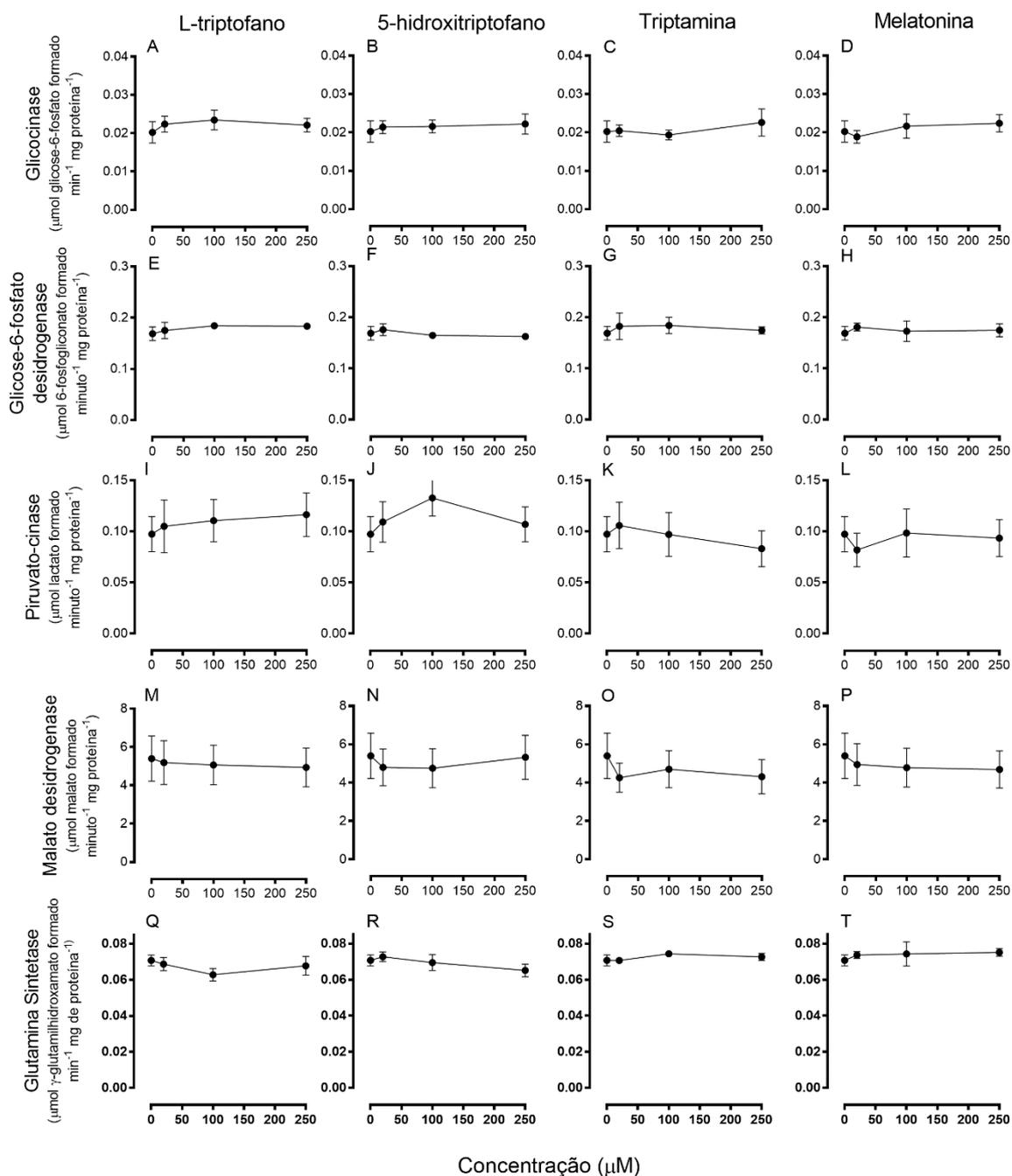


Figura. 13 Efeitos das diferentes concentrações de L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina sobre a atividade das enzimas: (A-D) glicocinase (GK), (E-H) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), (I-L) piruvato-cinase (PK), (M-P) malato desidrogenase (MDH) e (Q-T) glutamina sintetase (GS) de raízes de plântulas de *Z. mays* crescidas por 96 horas. Os valores são as médias  $\pm$  EP ( $n = 4-9$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 13 mostra os efeitos dos tratamentos sobre as atividades das mesmas enzimas em raízes de *Z. mays*. Não foram observadas alterações significativas em todas as enzimas testadas por nenhum dos tratamentos.

### 3.9. Efeitos do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano, da triptamina e da melatonina sobre a morfologia das raízes de *E. heterophylla*

As raízes das plântulas de *E. heterophylla*, crescidas em gerboxes por 96 horas na ausência ou presença de 20, 100 e 250  $\mu\text{M}$  dos derivados indólicos, foram fotografadas em um microscópio estereoscópico para avaliação anatômica das mesmas (Fig. 14, 15, 16 e 17). O tratamento com L-triptofano (Fig. 14) não causou mudanças muito drásticas nas raízes com exceção de um engrossamento na parte inicial das raízes e maior número de pelos. Esse engrossamento foi observado também no tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de 5-hidroxitriptofano (Fig. 15). No tratamento com 250  $\mu\text{M}$  de 5-hidroxitriptofano as raízes se apresentaram mais curtas e bem mais grossas com seções deformadas retorcidas e escurecidas. Um aumento na quantidade de pelos foi também evidenciado.

No tratamento com triptamina as raízes de *E. heterophylla* também apresentaram um engrossamento e aumento na quantidade de pelos em concentrações acima de 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 16). Uma alteração drástica ocorreu na concentração de 250  $\mu\text{M}$ . As raízes ficaram bem mais curtas e grossas e também bastante retorcidas. Ao mesmo tempo ficou evidente o maior número de pelos.

A melatonina também modificou a morfologia das raízes a partir do tratamento com a concentração de 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 17). As raízes ficaram mais grossas e com mais pelos tanto na concentração de 20  $\mu\text{M}$  quanto de 100  $\mu\text{M}$ . Foi evidente, também, que os pelos se localizaram mais perto dos ápices. Tal como observado no tratamento com triptamina 250  $\mu\text{M}$ , a melatonina na mesma concentração induziu alterações anatômicas pronunciadas. As raízes ficaram mais grossas, mais curtas, com diâmetros irregulares, um pouco retorcidas e com muito pelos.

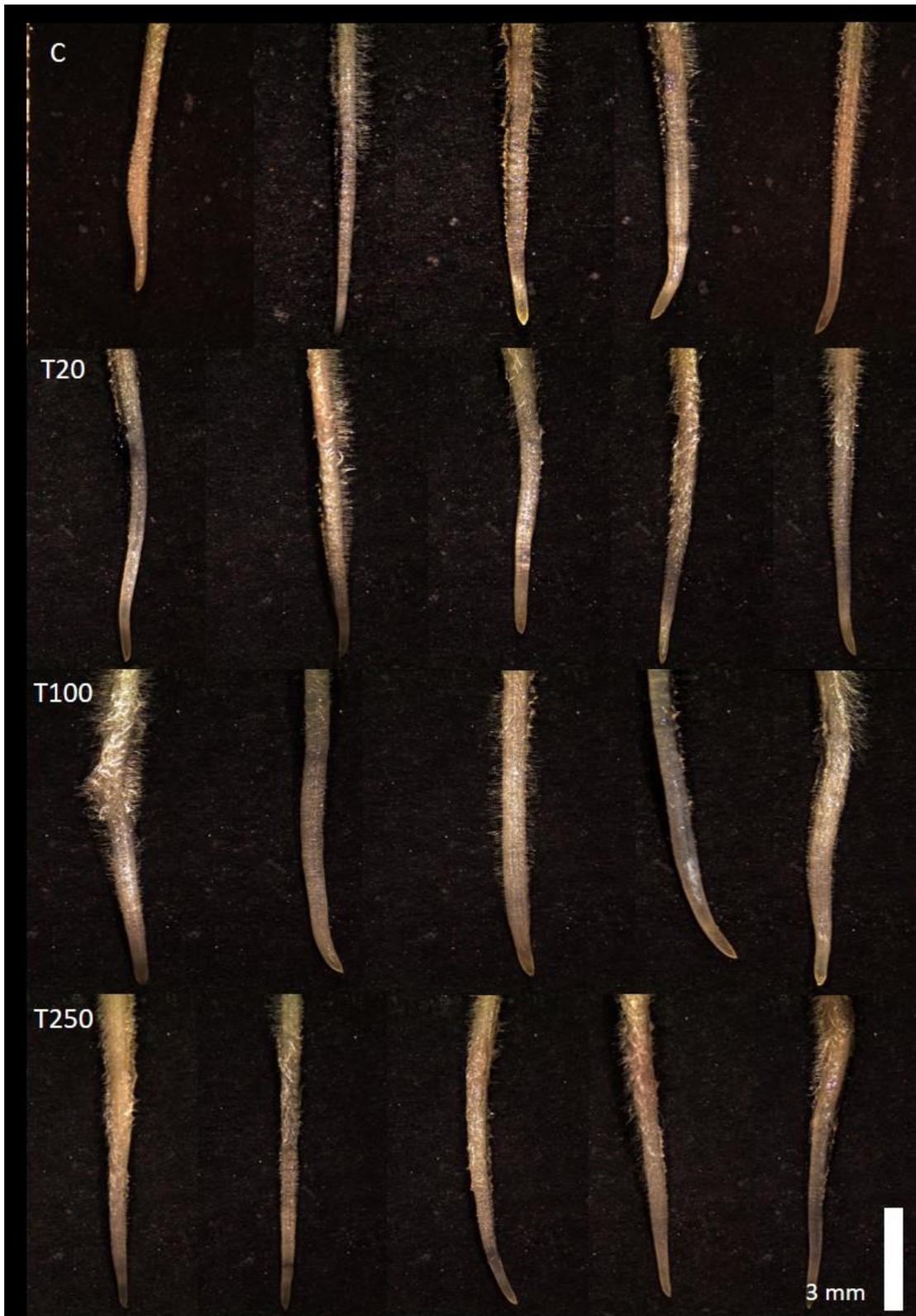


Figura 14. Efeitos do L-triptofano sobre a morfologia das extremidades das raízes de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. (C) plântulas controle, crescidas em água, (T20) plântulas crescidas com L-triptofano 20  $\mu\text{M}$ , (T100) plântulas crescidas com L-triptofano 100  $\mu\text{M}$  e (T250) plântulas crescidas com L-triptofano 250  $\mu\text{M}$ .

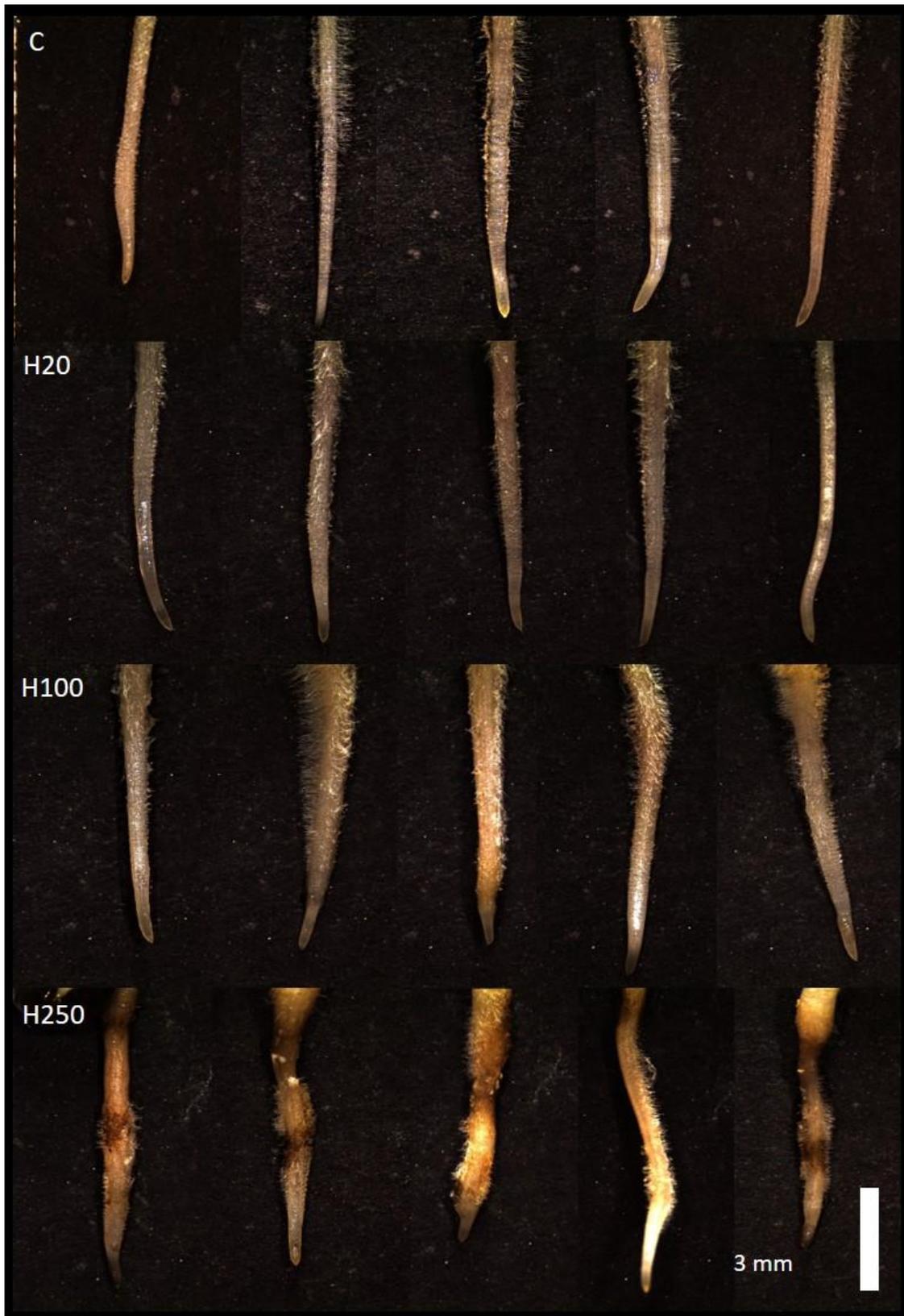


Figura 15. Efeitos do 5-hidroxitriptofano sobre a morfologia das extremidades das raízes de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. (C) plântulas controle, crescidas em água, (H20) plântulas crescidas com 5-hidroxitriptofano 20  $\mu$ M, (H100) plântulas crescidas com 5-hidroxitriptofano 100  $\mu$ M e (H250) plântulas crescidas com 5-hidroxitriptofano 250  $\mu$ M.

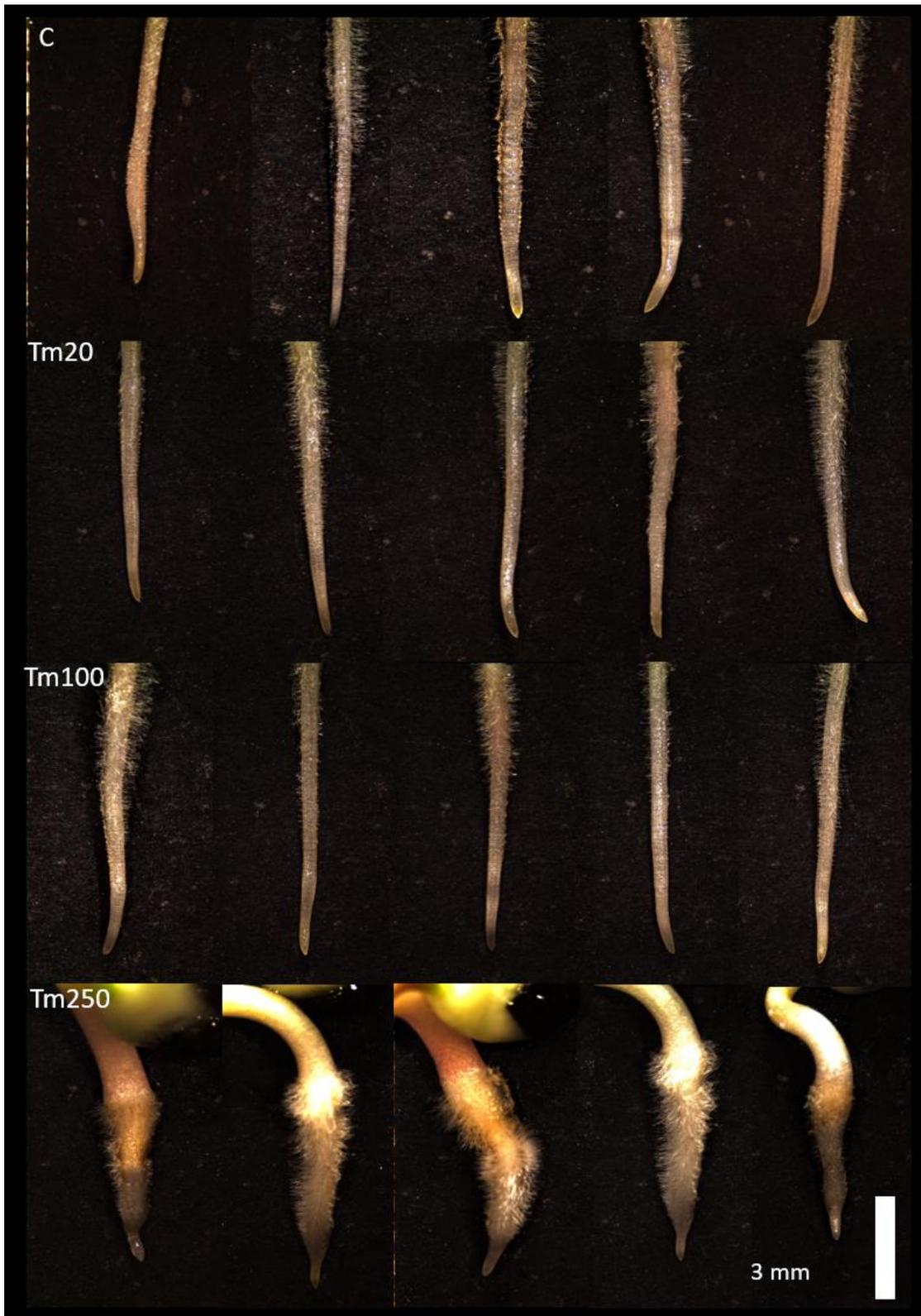


Figura 16. Efeitos da triptamina sobre a morfologia das extremidades das raízes de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. (C) plântulas controle, crescidas em água, (Tm20) plântulas crescidas com triptamina 20  $\mu\text{M}$ , (Tm100) plântulas crescidas com triptamina 100  $\mu\text{M}$  e (Tm250) plântulas crescidas com triptamina 250  $\mu\text{M}$

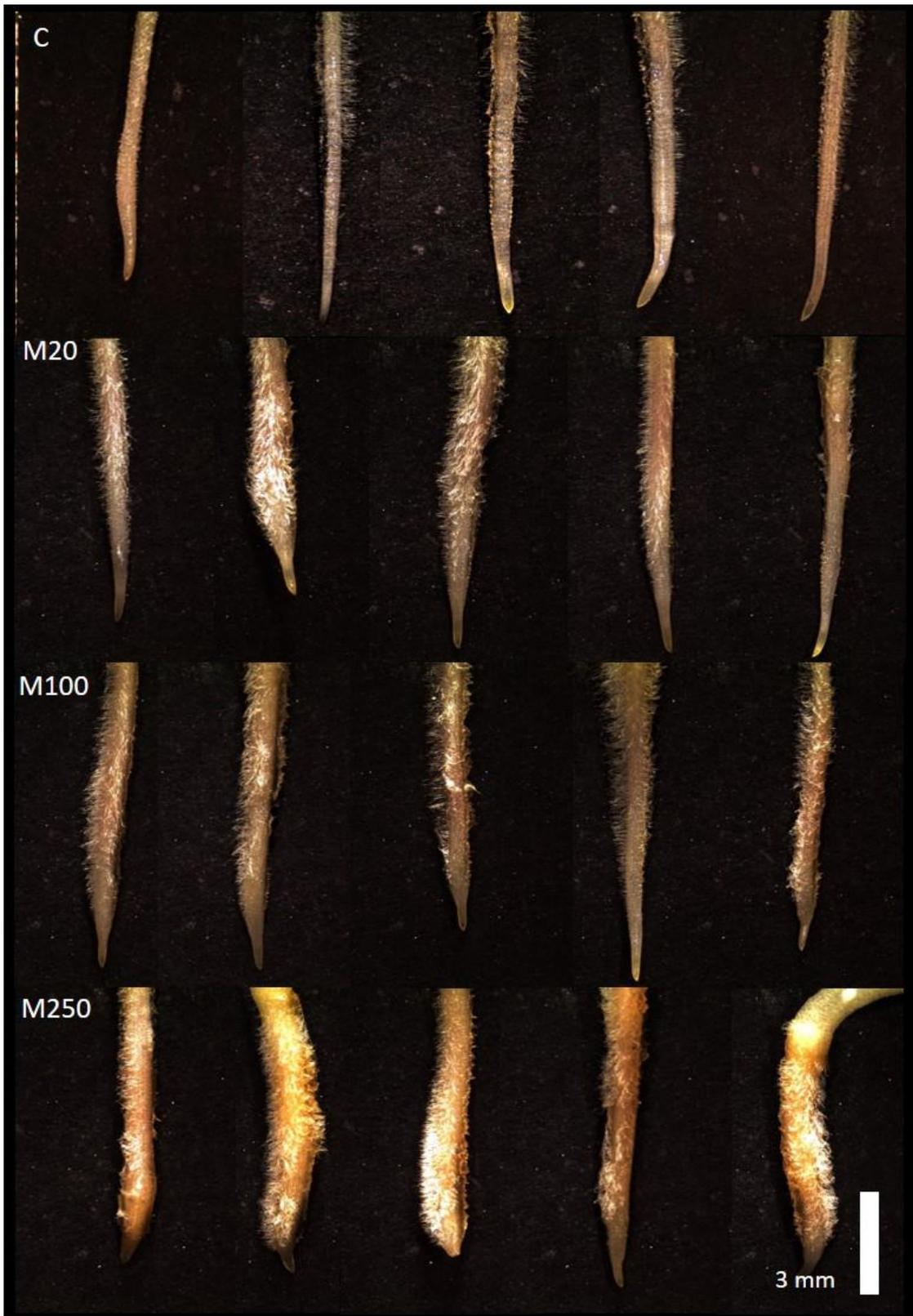


Figura 17. Efeitos da melatonina sobre a morfologia das extremidades das raízes de *E. heterophylla* crescidas por 96 horas. (C) plântulas controle, crescidas em água, (M20) plântulas crescidas com melatonina 20  $\mu\text{M}$ , (M100) plântulas crescidas com melatonina 100  $\mu\text{M}$  e (M250) plântulas crescidas com melatonina 250  $\mu\text{M}$ .

### 3.10. Medidas de captação de melatonina em plântulas de *E. heterophylla* crescidas em sistema de hidroponia.

Para a avaliação da taxa de captação de melatonina pelas plântulas de *E. heterophylla* a incubação foi realizada em hidroponia, um sistema que permite a quantificação da melatonina remanescente no meio de incubação. A Figura 18 mostra uma série representativa na qual as plântulas, que foram crescidas inicialmente por dois dias em rolos de papel germitest, foram transplantadas e mantidas em vasos no sistema de hidroponia por mais quatro dias, na ausência ou presença de melatonina (20, 100 e 250  $\mu\text{M}$ ). Nessas condições, as plântulas apresentaram desenvolvimento mais acelerado tanto na parte aérea quanto nas raízes quando comparados com as plântulas crescidas em gerboxes como indicado pelo aparecimento de inúmeras raízes laterais (Fig. 18A). Comparado com as plântulas controles, o tratamento com melatonina induziu um gradual engrossamento das raízes principais, associado com redução no comprimento das mesmas e, também no comprimento e número de raízes laterais.

Um escurecimento das raízes e do meio de incubação foi também observado nos tratamentos com melatonina 100 e 250  $\mu\text{M}$  (Fig. 18C e D). As medidas de parâmetros biométricos revelaram uma redução no comprimento das raízes de *E. heterophylla* de 49,0, 71,5 e 71,7 % pelas concentrações de 20, 100 e 250  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Fig. 18E). Nas mesmas concentrações a parte aérea foi inibida em 23,4, 52,5 e 49,2 %, respectivamente (Fig. 18H). Foi observada uma redução na biomassa fresca da parte aérea nos tratamentos com melatonina 100 (-40,0 %) e 250  $\mu\text{M}$  (-31,9 %) (Fig. 18I). As biomassas fresca e seca das raízes não foram modificadas (Fig. 18F e 18G).

Na série experimental com melatonina 250  $\mu\text{M}$ , foram coletadas alíquotas do meio de incubação para quantificação da captação e/ou metabolização da melatonina utilizando CLAE. Foram realizadas adaptações para a detecção simultânea dos compostos testados numa mesma injeção. O gradiente de solvente utilizado possibilitou uma separação bem definida dos padrões conforme mostrado na Figura 19. O tempo de eluição da serotonina foi aos 6,6 min, o do 5-hidroxitriptofano aos 8,0 min, o do L-triptofano aos 15,2 min, o da triptamina aos 16,3 min e da melatonina aos 31,1 min. Para cada uma das substâncias foi feita uma curva de calibração injetando diferentes concentrações das soluções padrão

e a análise por regressão linear das curvas obtidas resultou nas seguintes equações:  $y = 5594,08x$  para serotonina,  $y = 5293,51x$  para 5-hidroxitriptofano,  $y = 5075,11x$  para L-triptofano,  $y = 4189,51x$  para triptamina e  $y = 5682,77x$  para melatonina. O coeficiente de linearidade ( $R^2$ ) foi sempre  $> 0,998$ .

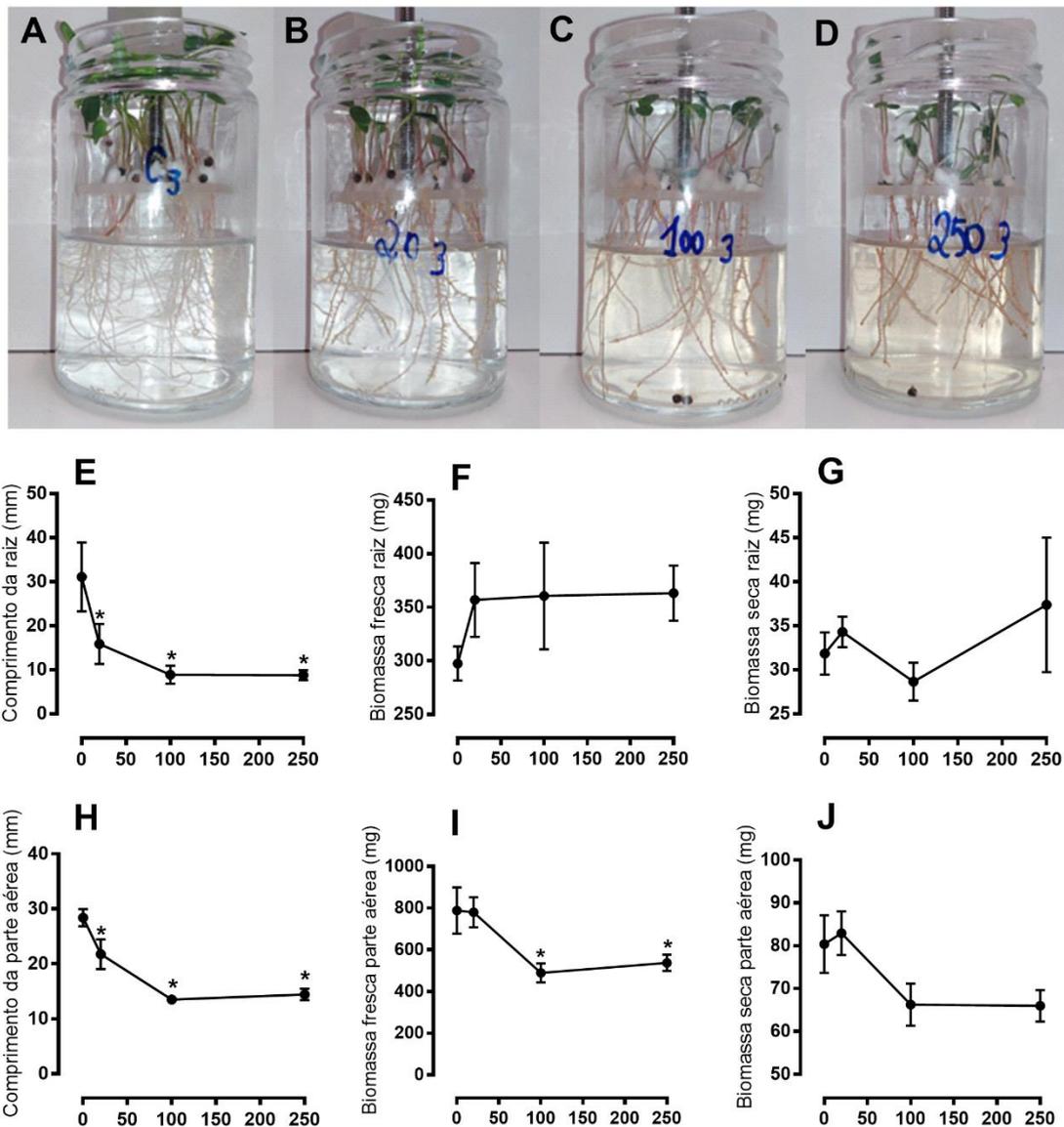


Figura 18. Efeitos das diferentes concentrações de melatonina sobre o desenvolvimento de plântulas de *E. heterophylla* em sistema de hidroponia. Foto do sistema de hidroponia: (A) plântulas crescidas em solução nutritiva, (B) plântulas crescidas em solução nutritiva + melatonina 20 μM, (C) plântulas crescidas em solução nutritiva + melatonina 100 μM, (D) plântulas crescidas em solução nutritiva + melatonina 250 μM. Desenvolvimento das plântulas: (E) comprimento da raiz, (F) comprimento da parte aérea, (G) biomassa fresca da raiz, (H) biomassa fresca da parte aérea, (I) biomassa seca da raiz e (J) biomassa seca da parte aérea. Os valores são as médias ± EP (n = 4). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $p \leq 0,05$ ).

As alíquotas foram retiradas do meio de incubação em intervalos de tempo crescentes, de 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, após o transplante. A Figura 20 mostra os cromatogramas representativos avaliados em diferentes tempos. A intensidade do pico da melatonina foi muito similar até o tempo de 48 horas de incubação e, nesse mesmo tempo, apareceu um pico de altura bem menor no tempo de eluição de 17,4 min (MI).

No tempo de incubação de 72 horas, a intensidade do pico da melatonina foi mínima e apareceu um novo pico (MII) no tempo eluição próximo ao da melatonina (32,4 min). A intensidade do pico do MI aumentou substancialmente. Os perfis cromatográficos nos tempos de incubação seguintes (72 e 96 horas) não sofreram grandes modificações.

Uma série controle foi realizada sem a adição de plantas e amostras foram coletadas nos mesmos tempos para avaliar a possibilidade de degradação espontânea da melatonina. A análise cromatográfica revelou a presença em menor intensidade da MI e MII, bem como uma redução na intensidade do pico melatonina (dados não mostrados). No tempo de 96 horas a área dos picos do MI, MII representou 31,9 % e 57,0 % respectivamente, dos valores encontrados na presença das plântulas. Neste mesmo tempo, a quantidade total de melatonina depletada nos vasos sem planta correspondeu a 37,1 % da quantidade total de melatonina depletada nos vasos com planta.

Para o cálculo da quantidade de melatonina efetivamente captada pelas plântulas nos diferentes tempos de incubação (Fig. 21), os valores de decomposição espontânea da melatonina foram descontados.

A efetiva captação da melatonina iniciou no tempo de 36 horas ( $0,25 \mu\text{moles planta}^{-1}$ ) e cresceu gradativamente até 72 horas, chegando a  $1,73 \mu\text{moles planta}^{-1}$ . Após esse tempo não houve incremento na quantidade captada, pois toda a melatonina foi depletada do meio de incubação conforme visualizado na Figura 21. No tempo de 96 horas a quantidade captada foi de ( $1,82 \mu\text{moles planta}^{-1}$ ).

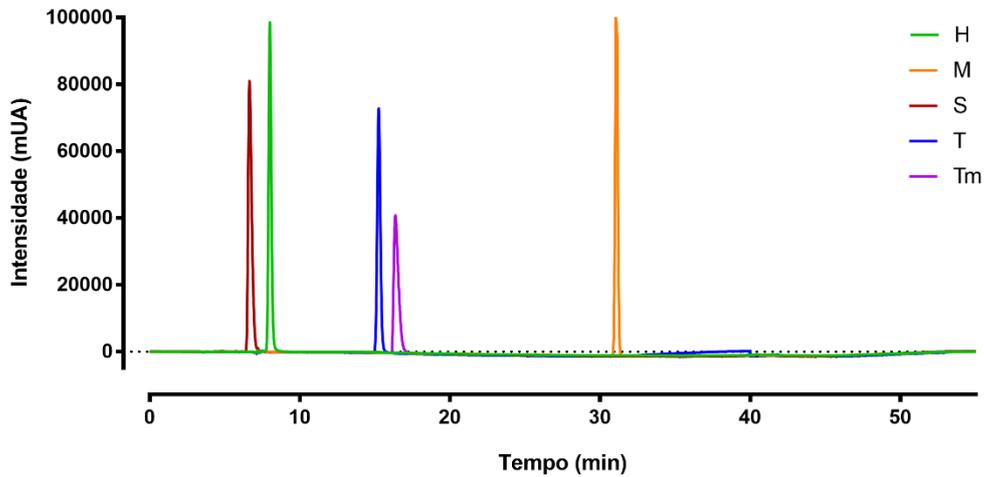


Figura 19. Perfil cromatográfico representativo obtido em CLAE de padrões de serotonina (S), L-triptofano (T), 5-hidroxitriptofano (H), triptamina (Tm) e melatonina (M). Foram injetados 10  $\mu$ L de cada solução padrão na concentração de 250  $\mu$ M. A fase estacionária foi uma coluna C18 e a fase móvel constituiu de um gradiente crescente de ácido acético e acetonitrila com vazão de 0,5 mL minuto<sup>-1</sup>. A detecção foi feita por um detector de UV em comprimento de onda de 280 nm.

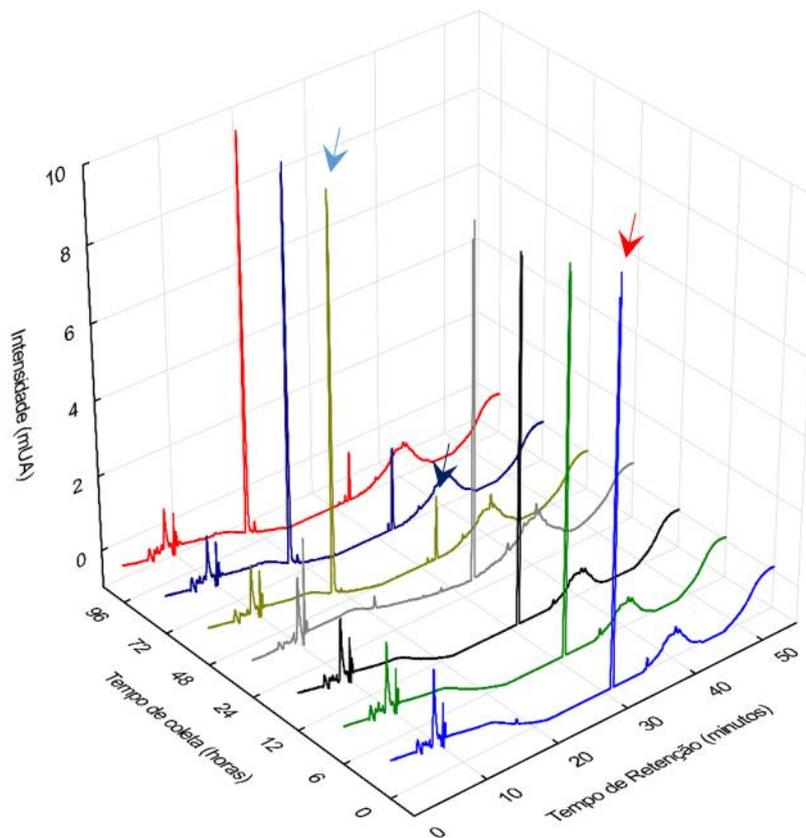


Figura 20. Perfis cromatográficos obtidos de alíquotas do meio de crescimento de plântulas de *E. heterophylla* crescidas em sistema de hidroponia na presença de melatonina 250  $\mu$ M conforme ilustrado na Figuras 18 D. Seta vermelha indica o pico representativo da melatonina, seta azul indica o pico de MI, seta preta indica o pico de MII. As cromatografias foram obtidas por CLAE como ilustrado na Figura 19.

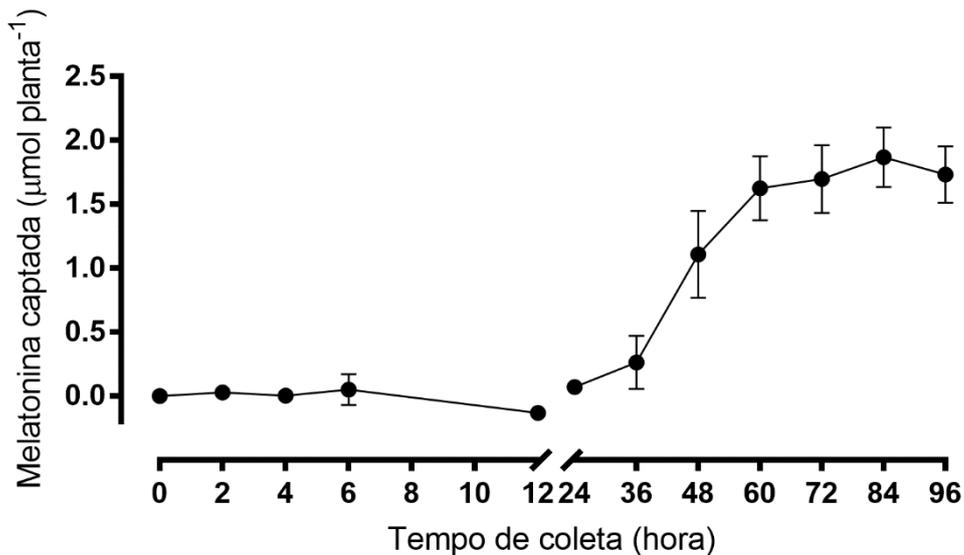


Figura 21. Captação da melatonina pelas plantas de *E. heterophylla* crescidas em sistema de hidroponia. Os valores de captação foram calculados a partir da detecção de melatonina remanescente no meio de incubação por análise em CLAE como ilustrada na Figura 20. Os valores são as médias  $\pm$  EP de (n = 6).

#### 4. Discussão

Este estudo revelou que o L-triptofano e a melatonina na faixa de concentração de 5 a 500  $\mu$ M não exerceram efeito estimulante no desenvolvimento inicial de duas culturas, *G. max* e *Z. mays* e de seis plantas daninhas, *A. hybridus*, *B. pilosa*, *I. grandifolia*, *E. heterophylla*, *U. decumbens* e *D. insularis*. Ao contrário, ambos induziram efeitos negativos em algumas espécies de plantas daninhas. O crescimento inicial de *Z. mays* e a *G. max* não foi modificado por ambos os compostos, embora o L-triptofano tenha exercido um pequeno estímulo na germinação das sementes de *G. max*. Em acordo com nosso resultado, Herrera-Jiménez et al. (2018) observaram que o L-triptofano, mesmo em concentrações acima do que foi utilizado em nosso estudo (4,8 mM) não promove estímulo no crescimento de plântulas de *Z. mays*, mas o estímulo é evidenciado na presença dos fungos endofíticos *Trichoderma tomentosum* e *T. harzianum* (Herrera-Jiménez et al., 2018). Efeito similar foi relatado por Yasmin et al. (2017) que observaram uma melhor ação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) quando essas são incubadas com L-triptofano. A produção de fitormônios como o AIA, GA e ABA pelas rizobactérias foi sugerido

como o modo de ação do L-triptofano em melhorar o desenvolvimento do *Z. mays* e superar o estresse hídrico (Herrera-Jiménez et al., 2018; Yasmin et al., 2017).

O efeito predominante do L-triptofano nas plantas daninhas estudadas foi de inibição. Um pequeno estímulo foi observado no crescimento de *A. hybridus* apenas na concentração de 10 µM e, embora tenha estimulado os índices de germinação de *B. pilosa*, as plântulas resultantes apresentaram crescimento reduzido.

A melatonina também não estimulou o crescimento das plântulas das espécies de cultivo e nem das plantas daninhas estudadas, embora tenha favorecido ao menos um índice de germinação de *A. hybridus*, *D. insularis* e *I. grandifolia*. Entretanto, o crescimento das plântulas dessas três espécies não foi alterado. A melatonina, por sua vez, reduziu tanto o IVG de *E. heterophylla* quanto o crescimento das plântulas.

Em nosso protocolo experimental as sementes das diversas espécies tiveram acesso ao L-triptofano e a melatonina desde o processo de embebição até o desenvolvimento inicial das plântulas. Aparentemente, as espécies cujos índices de germinação foram estimulados pelo L-triptofano (*B. pilosa* e *G. max*) ou pela melatonina (*A. hybridus* e *I. grandifolia*) tiveram algum processo celular requerido para completar o processo de germinação favorecido. Efeitos benéficos da melatonina na germinação de espécies como o pepino (*C. sativus*) e soja (*G. max*) após tratamento das sementes com melatonina foram relatados (Posmyk et al., 2009; Wei et al., 2015). É possível que o estímulo na germinação dessas espécies sejam decorrentes de uma modificação nos níveis de fitormônios que controlam a germinação, como citocinina e ABA (Miransari e Smith, 2014). Contrastando com estímulo no processo de germinação de algumas espécies, o desenvolvimento inicial dessas mesmas plântulas não foi beneficiado.

Além das diferenças entre as espécies, o período de desenvolvimento da planta no qual o tratamento é conduzido, muito provavelmente, influencia as respostas das plantas aos tratamentos. Nosso estudo não evidenciou estímulo significativo da melatonina no crescimento de *Z. mays* e *G. max* quando aplicada em gerboxes desde o processo de embebição até quatro dias de crescimento. Efeito estimulador foi, entretanto, observado por Zhao et al. (2015) quando a melatonina foi aplicada em plântulas de *Z. mays* em estágio de três folhas e

tratadas por seis dias. Os autores observaram estímulo em baixas concentrações (10 µM) e inibição em concentrações maiores.

A única espécie dentre as ensaiadas em nosso estudo e que teve o desenvolvimento inicial alterado por ambos, o L-triptofano e a melatonina, foi a *E. heterophylla*. Essa espécie foi então selecionada para o estudo detalhado sobre os processos celulares eventualmente modificados e que poderiam estar relacionados à redução no desenvolvimento das plântulas. Os efeitos de dois intermediários gerados na conversão do L-triptofano à melatonina foram também estudados, o 5-hidroxitriptofano e a triptamina, essa última precursora também da síntese de AIA. Considerando que uma ação inibidora sobre plantas daninhas sem efeito negativo sobre plantas de cultivo, aumenta o potencial de utilização dos derivados do L-triptofano no controle de plantas daninhas, uma espécie de cultivo foi também selecionada, a *Z. mays*.

Em relação aos efeitos sobre os índices de germinação, o 5-hidroxitriptofano e a triptamina foram, também, inativos sobre *Z. mays* tal como foi observado com o L-triptofano e a melatonina. Entretanto, as plântulas de *Z. mays* crescidas na presença de triptamina apresentaram um desenvolvimento alterado com redução das raízes e aumento da parte aérea. Essas alterações não foram evidenciadas no tratamento com concentrações equivalentes de seu precursor L-triptofano ou com 5-hidroxitriptofano.

Embora a melatonina não tenha alterado de forma significativa o crescimento total das plântulas de *Z. mays*, um pequeno aumento na parte aérea foi observado, mas o efeito foi comparativamente menor do que o induzido pela triptamina. Além disso, a melatonina não aumentou a biomassa fresca da parte aérea e nem afetou o comprimento da raiz. Estes achados indicam fortemente que em *Z. mays*, os efeitos da triptamina não foram decorrentes apenas de sua conversão à melatonina, mas sim de sua metabolização em uma via independente, possivelmente a via de síntese de auxinas. De fato, o estímulo no desenvolvimento da parte aérea com redução no crescimento das raízes são efeitos típicos de auxinas (Arnao e Hernández-Ruiz, 2017; Hu et al., 2017).

Não se pode excluir a possibilidade que o pequeno estímulo causado pela melatonina no comprimento da parte aérea de *Z. mays* também tenha uma contribuição de um efeito tipo auxínico. Estudos têm revelado que a melatonina exerce ações vinculadas à ação de auxinas, por meio de uma interação direta com

transportadores de auxina ou alterando os gradientes locais de AIA (Arnao e Hernández-Ruiz, 2017). Não há dados conclusivos de que ocorra uma interconversão metabólica entre melatonina e AIA em plantas (Arnao e Hernández-Ruiz, 2015).

Já em *E. heterophylla* os dois intermediários afetaram algum dos índices de germinação, também reproduzindo as respostas da planta ao L-triptofano e à melatonina. O 5-hidroxitriptofano foi menos ativo do que o L-triptofano e a melatonina, mas a triptamina apresentou efeitos mais pronunciados interferindo negativamente com a velocidade com que as sementes germinaram mesmo em baixas concentrações.

Os efeitos de todos os compostos indólicos sobre o desenvolvimento das plântulas de *E. heterophylla* foram muito diferentes dos efeitos observados em *Z. mays*. Não foram observados efeitos estimulatórios em nenhum dos parâmetros biométricos medidos. Todos os quatro compostos inibiram o crescimento tanto da raiz quanto da parte aérea. Os efeitos foram relativamente mais pronunciados no crescimento das raízes. A triptamina e a melatonina foram mais ativas do que o L-triptofano e o 5-hidroxitriptofano, com destaque para a triptamina que reduziu mais fortemente o crescimento da parte aérea se comparado com a melatonina e também reduziu a biomassa seca das plântulas.

Alterações nos índices de germinação e nos parâmetros biométricos de crescimento das plântulas são indícios de que algum processo metabólico ou fisiológico foi alterado pelos tratamentos. Uma interferência sobre o metabolismo energético das plântulas pode comprometer a síntese das biomoléculas necessárias para a formação dos tecidos e resultar em menor crescimento. Na fase logo após a embebição das sementes, as células dos tecidos embrionários, das radículas e dos hipocótilos são heterotróficos (Bewley et al., 2013). Nesta condição, o embrião e as plântulas dependem das reservas existentes na semente para a obtenção de energia para a síntese de macromoléculas, divisão celular e diferenciação. A fermentação e depois o metabolismo mitocondrial fornecem o ATP necessário nestas fases até que os eófilos se desenvolvam e a fotossíntese passa a gerar os nutrientes, o ATP e o potencial redutor do NADPH para as plantas (Nicholls e Ferguson, 2013).

Para investigar a hipótese das alterações no desenvolvimento causado pelos compostos indólicos serem decorrentes de uma interferência sobre o

metabolismo energético, a atividade respiratória de ápices radiculares foram avaliadas. A respiração total dos ápices radiculares representa a soma de todas as reações que consomem oxigênio dos tecidos, sendo essas de origem mitocondrial ou extra-mitocondrial. Cerca de 80 a 90 % do consumo celular de oxigênio é utilizado para atender as necessidades energéticas da célula através da fosforilação oxidativa mitocondrial via COX (Babcock, 1999). As mitocôndrias vegetais, entretanto, apresentam uma via alternativa de transferência de elétrons, que transfere os elétrons do ubiquinol diretamente ao O<sub>2</sub>, não passando pelo complexo IV. O fluxo de elétrons por esta via, através da AOX não é sensível aos inibidores clássicos do complexo IV (CN<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO, NO); e pode contribuir para o consumo de O<sub>2</sub> pela mitocôndria juntamente com a via da COX (Millar et al., 2015). Sua proporção relativa é variável dependendo do órgão ou do tecido da planta, da espécie, ou mesmo das condições metabólicas em que estas se encontram (Millar et al., 2015; Moore e Siedow, 1991; Popov et al., 1997).

Além das vias COX e AOX, uma pequena parte do oxigênio pode ser consumida pelas oxidases extra-mitocondriais, que por sua vez, são representadas por enzimas do sistema monooxigenase, lipoxigenases e NADPH oxidases, entre outras (Bendall e Bonner, 1971; Parrish e Leopold, 1978). Assim, a respiração KCN-insensível representa a contribuição da via AOX somada às oxidases extra-mitocondriais (Ishii-Iwamoto et al., 2006).

Os resultados revelaram que as atividades respiratórias dos ápices radiculares de *Z. mays* e de *E. heterophylla* foram pouco afetados pelos quatro compostos testados. Somente a melatonina exerceu uma inibição sobre a respiração via citocromo-oxidase (COX, KCN-sensível) tanto em *E. heterophylla* quanto em *Z. mays*. Em ambas as plantas a inibição máxima da respiração via citocromo-oxidase foi cerca de 35 % em relação ao controle. Aparentemente, em *Z. mays*, esta redução não comprometeu o desenvolvimento das raízes. Em *E. heterophylla*, por outro lado, essa inibição pode ter contribuído para a maior inibição observada no crescimento das raízes do que na parte aérea. Deve-se salientar, entretanto, que o L-triptofano, o 5-hidroxitriptofano e a triptamina não modificaram a atividade respiratória dos ápices radiculares de *E. heterophylla*, embora tenham reduzido o crescimento das raízes. Esses resultados indicam que uma interferência no metabolismo energético mitocondrial das raízes não foi o principal fator que levou à redução no desenvolvimento das plântulas de

*E. heterophylla*, embora possa ter contribuído em parte para o efeito inibidor da melatonina.

Uma redução na respiração via COX pode representar, também, uma adaptação a uma nova condição metabólica, com redução de algum processo dependente de energia. De qualquer forma, nenhum dos compostos comprometeu drasticamente a geração mitocondrial de ATP, já que nesse caso as raízes não se desenvolveriam normalmente, aparecendo sinais de necrose especialmente nos meristemas apicais, tal como foi evidenciado no tratamento de *Z. mays* com o monoterpeneo  $\alpha$ -pineno, um inibidor da produção mitocondrial de ATP (Ishii-Iwamoto et al., 2012).

O 5-hidroxitriptofano, por sua vez, estimulou a respiração KCN-insensível de *E. heterophylla*, um efeito de difícil interpretação já que várias oxidases independentes da COX podem ter contribuído para esse estímulo.

Outro processo importante durante a germinação e o crescimento inicial é o sistema de defesa antioxidante, que regula os níveis de EROs nas células tanto em condições normais ou em condições de estresse biótico ou abiótico (Arora et al., 2002). Embora as EROs atuem como moléculas sinalizadoras em uma variedade de processos celulares, incluindo no desenvolvimento inicial das plântulas (Gapper e Dolan, 2006), quando em excesso elas danificam as estruturas de membrana, proteínas e ácidos nucléicos (Coelho et al., 2017; Sharma et al., 2012; Shinozaki et al., 2015). As principais fontes de EROs durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas são as mitocôndrias (Sharma et al., 2012; Shinozaki et al., 2015) e as NADPH oxidases localizadas na membrana plasmática das células (Tripathy e Oelmüller, 2012). Sob condições normóxicas, aproximadamente 2-3 % do oxigênio usado pelas mitocôndrias pode ser convertido em  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Puntarulo et al., 1988). Em geral um aumento da produção de mitocondrial de EROs está associada a um aumento na respiração KCN-insensível (Ishii-Iwamoto et al., 2012).

O controle dos níveis de EROs é realizado por um eficiente sistema de defesa envolvendo antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Noctor e Foyer, 1998; Shinozaki et al., 2015). As plantas geram vários compostos naturais com propriedade de neutralizar as EROs devido à variedade de estruturas geradas: tiol (glutationa) ou fenol (catecolaminas e catequinas, tocoferol, resveratrol), flavonóides (quercetina), e estruturas heterocíclicas, incluindo os que contêm o

núcleo indol que apresentam substituições alifáticas na posição 3, como as encontradas no L-triptofano e seus derivados, incluindo os utilizados nesse estudo (Peyrot e Ducrocq, 2008). De fato, a ação da melatonina em proteger algumas espécies de plantas de estresse biótico ou abiótico tem sido creditada à sua atividade antioxidante (Shi et al., 2016; N. Zhang et al., 2014).

É possível que os efeitos benéficos do L-triptofano e da melatonina sobre os índices de germinação de algumas espécies tenha alguma relação com as suas atividades antioxidantes. No estudo de Pergo e Ishii-Iwamoto (2011), realizado na planta daninha *I. triloba* (syn *I. grandifolia*) foi demonstrado que a produção de EROs é iniciada assim que a respiração mitocondrial é retomada durante a embebição das sementes com o aparecimento de atividades expressivas de enzimas antioxidante nos embriões. Foi também demonstrado que as plantas daninhas com sistema de defesa antioxidante mais eficiente, são menos susceptíveis aos danos causados por aleloquímicos fitotóxicos (Coelho et al., 2017). Em *E. heterophylla*, entretanto, nenhum dos derivados indólicos exerceu efeitos positivos sobre os índices de germinação. Ao contrário, efeitos negativos foram encontrados.

Atualmente se conhece que as EROs desempenham um papel fundamental no desenvolvimento inicial das plântulas, sendo um sinalizador da ação de muitos fitormônios como as auxinas, GA, etileno e ABA (Carol e Dolan, 2006; Gapper e Dolan, 2006; He et al., 2017; Zhu et al., 2016). Um desequilíbrio nos níveis de EROs pode, além de interferir nas respostas dos fitormônios, causar danos oxidativos.

A avaliação dos conteúdos de EROs totais nas raízes das plântulas de *E. heterophylla* e de *Z. mays* submetidas ao tratamento com os quatro compostos indólicos revelaram que o 5-hidroxitriptofano, a triptamina e a melatonina causaram um aumento significativo na quantidade de EROs nas raízes, tanto de *E. heterophylla* como de *Z. mays*. Em ambas as plantas a melatonina foi que mais elevou a quantidade de EROS. Esse aumento, entretanto, não foi acompanhado de aumento no conteúdo de MDA e dienos conjugados nas raízes de *Z. mays*, mas na *E. heterophylla* a melatonina causou um incremento tanto de MDA quanto de dienos conjugados.

O MDA é um produto de peroxidação de lipídeos de membranas (Kappus, 1985; Maness et al., 1999) resultado de reações de EROs com as duplas ligações

dos lipídeos. Os dienos conjugados são formados pelo ataque de EROs a grupos metileno de ácidos graxos poliinsaturados, sendo, portanto, outro marcador da peroxidação lipídica (Smirnoff, 1995). Com exceção do tratamento de *E. heterophylla* com melatonina, ficou evidente que os outros derivados indólicos não induziram dano oxidativo nas membranas das células das raízes.

Normalmente quando há um excesso de EROs, o sistema de defesa antioxidante é estimulado. A SOD desempenha um papel central nesse sistema (Scandalios, 1993), sendo a primeira enzima a atuar na eliminação de EROs, dismutando o radical  $O_2^{\cdot-}$ , que é altamente reativo, em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Mittler, 2002). O  $H_2O_2$  é neutralizado subsequentemente por ação de outras enzimas, incluindo a CAT, POD, GR e APx (Navrot et al., 2007; Noctor e Foyer, 1998; Sharma et al., 2012).

A avaliação da atividade dessas enzimas nas raízes de *E. heterophylla* revelou que em todos os tratamentos não foram observadas alterações significativas nas atividades da SOD, GR e APx. Um estímulo na atividade da POD foi observado apenas no tratamento com 5-hidroxitriptofano. Por outro lado, uma redução significativa foi observada na atividade da CAT nos tratamentos com 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina. A CAT é uma das enzimas mais ativas na neutralização de  $H_2O_2$ . A inibição dessa enzima coincide com o aumento no conteúdo de EROs das raízes nos mesmos tratamentos, sugerindo que uma redução na atividade da CAT pode ter contribuído para o aumento do conteúdo de EROs.

No tratamento com melatonina é nítida a tendência de aumento nas atividades da POD e GR. Aumento do conteúdo de EROs e danos oxidativos foram observados apenas no tratamento com melatonina. Aparentemente houve uma resposta de estímulo nas atividades das enzimas POD e GR para neutralizar o excesso de EROs, mas esta resposta não foi suficiente para evitar os danos oxidativos. Vale mencionar que a melatonina foi a única dentre os quatro derivados testados que inibiu a respiração via COX das raízes de *E. heterophylla*, evidenciando ações citotóxicas.

Já no tratamento com 5-hidroxitriptofano e triptamina não houve dano oxidativo e nem respostas evidentes nas atividades das enzimas. Aparentemente, a redução da CAT e o aumento do nível de EROs não seriam indicadores de citotoxicidade.

Em raízes de *Z. mays*, as atividades da SOD e APx também não foram modificadas, tal como observada em *E. heterophylla* e, também, nenhum dos tratamentos causou danos oxidativos. Entretanto os efeitos de cada composto sobre a CAT e a POD de *Z. mays* foram diferentes se comparados com a *E. heterophylla*. O 5-hidroxitritofano não exerceu nenhuma ação sobre a CAT e a POD. A triptamina estimulou a CAT, a POD e a GR. A melatonina inibiu a CAT e a POD e, também, provocou aparente uma tendência de redução da GR. Os efeitos da triptamina são mais coerentes com uma resposta das células à maior geração de EROs na tentativa de neutralizá-las e assim evitar os danos oxidativos, como de fato foi observado. Os efeitos da melatonina, entretanto, a princípio favoreceram a formação de EROs, especialmente nas concentrações mais baixas. Como não foram observados danos oxidativos nas raízes, é possível aventar que essas alterações fazem parte de respostas metabólicas adaptativas tendo as EROs como sinalizadoras.

Outra abordagem utilizada para investigar os efeitos dos derivados indólicos sobre o desenvolvimento da plântula foi a avaliação de algumas enzimas chaves do metabolismo primário das plantas. A GK é uma enzima que existe em muitas isoformas nas plantas (hexocinases) catalisando a fosforilação de glicose em glicose-6-fosfato, a primeira reação da via glicolítica. Durante a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, a enzima é essencial para a obtenção de energia necessária para a proliferação dos meristemas e também para o fornecimento de metabólitos intermediários para a síntese da parede celular (Aguilera-Alvarado e Sánchez-Nieto, 2017).

A glicose-6-fosfato gerada pela reação das hexocinases pode ser utilizada pela via das pentoses fosfato, concomitantemente com a via glicolítica. A G6PD é a primeira enzima da via que leva à produção de NADPH e pentoses fosfato (Kruger e von Schaewen, 2003). Em condições não fotossintéticas como as das raízes, a enzima controla o fluxo de carbono e a produção de NADPH usado no metabolismo básico durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (Thom et al., 1998). A enzima também é ativada em condições de estresse oxidativo em função do aumento da utilização de NADPH para restauração da GSSG, uma reação catalizada pela enzima GR (Li et al., 2020; Yang et al., 2019).

Em *E. heterophylla* foi observado um estímulo da GK pelo L-triptofano e pela triptamina ambos na menor concentração testada de 20 µM. No tratamento

com a triptamina, a redução gradativa na atividade da GK coincidiu com aumento da G6PD, indicando um desvio de carbonos para a síntese de pentoses fosfato ou mesmo visando a maior geração de NADPH. A melatonina, por outro lado, exerceu apenas efeito inibitório sobre a GK sem estimular a G6PD.

A observação de que as atividades das enzimas PK e a MDH não terem sido alteradas por nenhum dos tratamentos corrobora a interpretação de que o metabolismo energético das plântulas não foi substancialmente comprometido. A PK catalisa a reação final reação da via glicolítica, convertendo o ADP e PEP em ATP e piruvato. O piruvato, por sua vez, pode ser posteriormente importado para as mitocôndrias e usado como substrato para a respiração ou para a síntese de ácidos graxos (Geigenberger et al., 1993). A MDH está presente tanto no citosol como na matriz mitocondrial e participa tanto em processos catabólicos como em processos biossintéticos necessários para o crescimento da plântula (Schulze et al., 2002; Ting et al., 2012). A atividade da GS, uma enzima chave na síntese de aminoácidos e outros compostos nitrogenados (Kishorekumar et al., 2020) também não foi alterada por nenhum dos tratamentos.

Uma redução nos processos biossintéticos, devido a um déficit energético e/ou uma inibição direta nas vias enzimáticas levaria a uma redução na quantidade de biomoléculas nas células, que seria indicada por uma redução nas biomassas secas das raízes. A biomassa seca das raízes de *E. heterophylla*, não foi alterada no tratamento com L-triptofano, 5-hidroxitriptofano e melatonina. Somente a triptamina causou uma redução na concentração de 250  $\mu$ M.

Em raízes de *Z. mays*, nenhuma das enzimas testadas foram alteradas, reforçando a sugestão de que nenhum dos derivados indólicos testados exerceu uma interferência direta sobre as vias do metabolismo primário nas quais as enzimas estão envolvidas como discutido acima. Ficou evidente, portanto, que o tratamento com os quatro derivados indólicos pouco alterou o desenvolvimento inicial das plântulas de *Z. mays*.

Já na *E. heterophylla* os quatro compostos indólicos exerceram efeitos negativos sobre o desenvolvimento das plântulas, reduzindo tanto o crescimento das raízes quanto da parte aérea. A constatação de que não houve redução proporcional nas biomassas secas das raízes e que, nessas estruturas, as principais vias de geração de energia metabólica, a respiração mitocondrial e via glicolítica não foram comprometidas, bem como algumas enzimas essenciais para

vias biossintéticas, sugeriram que os derivados indólicos exerceram mudanças morfológicas e/ou estruturais nos sistemas radicular de *E. heterophylla*.

Essa hipótese foi confirmada pelas imagens estereoscópicas das raízes principais das plântulas tratadas com L-triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina.

Uma característica comum nos tratamentos com 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina foi o aparecimento de grande quantidade de pelos nas raízes. O aparecimento dos pelos foi mais intenso no tratamento com a melatonina. Foi nítido também que com o aumento das concentrações 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina, os pelos passaram a ocorrer muito próximos do ápice. Na maior concentração avaliada de 250  $\mu\text{M}$ , além de encurtamento mais acentuado no comprimento das raízes, os três compostos induziram alterações distintas na anatomia das raízes. No tratamento com triptamina e com melatonina, o engrossamento foi mais acentuado do que o induzido pelo 5-hidroxitriptofano e as raízes se apresentaram retorcidas. Nas raízes tratadas com 5-hidroxitriptofano foi possível visualizar regiões anatomicamente que se alternaram em toda a extensão da raiz primária.

O conjunto de alterações morfológicas induzidas na anatomia das raízes sugeriram interferências na homeostase dos fitormônios que atuam de forma integrada no desenvolvimento e na arquitetura do sistema radicular, incluindo auxina, citocinina, ABA, etileno, GA e BR (Clouse e Sasse, 1998; Depuydt e Hardtke, 2011; Pacifici et al., 2015; Ubeda-Tomás et al., 2012).

De fato, tem sido sugerido que o efeito bioestimulador da melatonina está relacionado com as ações do AIA, pois em algumas espécies os efeitos da melatonina exógena são similares à de substâncias naturais e artificiais que agem de maneira semelhante ao AIA (Pelagio-Flores et al., 2012; L. Y. Wang et al., 2016; Weeda et al., 2014). Em geral, esses compostos auxínicos induzem o alongamento das raízes primárias em baixas concentrações e/ou inibe em concentrações maiores, promovem o crescimento dos caules e das raízes laterais/adventícias e o gravitropismo das raízes (Arnao e Hernández-Ruiz, 2017). Os compostos que agem como agonistas ou mesmo como antagonistas da ação do AIA em geral, interferem em etapas específicas da síntese, conjugação, transporte, sinalização e/ou metabolização do AIA (Cheng e Zhao, 2007; Diekmann et al., 1995; Friml et al., 2003), o que pode causar mudanças nas

concentrações do AIA em diferentes zonas da raiz primária ao longo do eixo longitudinal (zona meristemática (MZ), zona de transição (TZ), zona de alongamento (EZ) e zona de diferenciação (DZ) (Swarup et al., 2007; Verbelen et al., 2006; S. Wang et al., 2016). Em função desse gradiente, as células em distintas regiões são sensibilizadas, afetando a proliferação celular e a morfogênese das mesmas. O AIA sintetizado nos meristemas induzem a proliferação celular e são cruciais para o alongamento das raízes e o gravitropismo (Chen et al., 1999).

Em *A. thaliana* foi observado que a melatonina aumenta as raízes adventícias e as raízes laterais em até três vezes, mas sem efeito na densidade capilar das raízes (Pelagio-Flores et al., 2012). Foi sugerido que em *A. thaliana* as ações da melatonina na regulação do crescimento do meristema dependem de uma interação com os transportadores de auxina, alterando os gradientes locais da AIA (L. Y. Wang et al., 2016; Weeda et al., 2014).

Nosso estudo revelou que os efeitos da melatonina na estrutura das raízes de *E. heterophylla* não foram similares aos observados em *A. thaliana* e nem foram típicos de compostos auxínicos. Não houve aparecimento precoce de raízes laterais no período de crescimento inicial e, nas plantas crescidas em hidroponia, a melatonina, ao contrário, reduziu o número e o comprimento de raízes laterais. Esses efeitos indicam que em *E. heterophylla*, a melatonina impediu a ação promotora do AIA na formação das raízes laterais, agindo desta forma como um inibidor da ação da AIA em relação à morfogênese das raízes laterais.

Os pelos desempenham um papel fundamental na absorção de água e nutrientes minerais para a planta e estão, também, envolvidos interações endossimbióticas com uma variedade de microorganismos como simbioses bacterianas fixadoras de nitrogênio (Oldroyd e Dixon, 2014). Os pelos radiculares são gerados a partir de subconjunto de células epidérmicas especializadas chamadas tricloblastos um processo que é estimulado pela auxina e o etileno (Masucci e Schiefelbein, 1996).

A elevação dos níveis de auxina ou etileno intensificam o início dos pelos nas raízes e o alongamento (Hu et al., 2017; Masucci e Schiefelbein, 1996). Foi demonstrado que o etileno estimula o desenvolvimento dos pelos por uma via independente de auxina, visto que níveis elevados de etileno, mas não de auxina, induzem a formação ectópica de células ciliadas da raiz (Zhang et al., 2016). Esse

fenômeno foi evidenciado nas raízes tratadas com os derivados indólicos, especialmente no tratamento com melatonina. Houve aumento da densidade de pelos em quase toda a extensão da raiz.

Outra evidência experimental que foi consistente com a ação promotora da morfogênese de pelos radiculares do 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina foi o aumento que os três compostos causaram no conteúdo de EROs das raízes. Tem sido demonstrado que a regulação da produção e distribuição de EROs estimulado por auxina é crucial para desenvolvimento de pelos radiculares (Foreman et al., 2003; Foyer e Noctor, 2009; Mangano et al., 2016; Monshausen et al., 2007). Foreman et al. (2003) demonstraram um aumento de EROs na região crescente da célula ciliada de *A. thaliana*, indicando que a formação local de EROs faz parte do mecanismo que estabelece a polaridade dos pelos radiculares. Foram obtidas evidências de que a elevação endógena de EROs produzidas no apoplasma pelas NADPH oxidases alteram os fluxos de  $Ca^{2+}$  e as propriedades da parede celular durante a expansão polarizada da célula (Foreman et al., 2003; Monshausen et al., 2007). É possível aventar, portanto, a possibilidade de que o aumento do conteúdo de EROs nas raízes de *E. heterophylla* tratadas com 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina foram basicamente provenientes das extremidades dos pelos radiculares. Outra evidência experimental que apoia essa hipótese foi a redução concomitante da atividade da CAT nos mesmos tratamentos. Embora não haja relatos sobre a atividade dessa enzima na formação de pelos radiculares, diversos estudos sugerem uma ligação entre a ação das auxinas e a produção de EROs na tolerância das plantas ao estresse. As auxinas aumentam a produção de  $H_2O_2$  aumentando a expressão de enzimas que produzem superóxidos, como a NADPH oxidase e a superóxido oxidase e, também, reduzindo a expressão de enzimas antioxidantes como a CAT e a ascorbato oxidase (Iglesias et al., 2010; Krishnamurthy e Rathinasabapathi, 2013).

Tem sido demonstrado que as auxinas e o etileno exercem funções sinérgicas, aditivas ou antagônicas em várias etapas no desenvolvimento do sistema radicular. O perfil do transcriptoma radicular de *A. thaliana* em resposta à auxina e etileno, por exemplo, revelou que metade dos alvos comuns a ambos os fitormônios são desencadeados pelo etileno independentemente da auxina e 30 % são desencadeados de maneira dependente do etileno (Stepanova et al., 2007).

Além da formação dos pelos radiculares, foi demonstrado que o etileno causa supressão do alongamento radicular através do acúmulo local de auxina na ponta da raiz, aprimorando os sensores de auxina (Swarup et al., 2007).

As observações de que o 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina estimularam os pelos radiculares, reduziram o crescimento das raízes principais e não estimularam a formação das raízes laterais, sugerem que esses derivados alteraram o desenvolvimento do sistema radicular de *E. heterophylla* por meio de alterações no equilíbrio das interações entre auxina e etileno com predominância das ações do etileno.

Os mesmos derivados causaram aumento de EROs nas raízes de *Z. mays*. Não foram realizadas fotos esteroscópicas dessas raízes para examinar se houve aumento de pelos radiculares. Entretanto, o fato do aumento de EROs não estarem associados a danos oxidativos são fortes indícios que as EROs ficaram restritas a uma região específica das raízes. Estudos futuros obviamente deverão ser realizados para confirmação dessas hipóteses.

Além de compartilhar algumas ações sobre o desenvolvimento radicular, cada derivado indólico exerceu alterações morfológicas distintas e que estariam também associadas à interferências no equilíbrio dos fitormônios. As raízes das plântulas tratadas com 5-hidroxitriptofano 250  $\mu\text{M}$  apresentaram regiões morfológicamente distintas mais finas e sem pelos, o que pode indicar alterações nos movimentos da auxina ao longo da extensão da raiz, com seções nas quais as células não foram sensibilizadas. As raízes tratadas com melatonina apresentaram crescimento assimétrico. Acredita-se que o crescimento assimétrico é decorrente de mais alongamento celular ou mais divisão celular em um dos lados, possivelmente por exposição desigual aos fitormônios que regulam a diferenciação celular e o alongamento, incluindo as citocininas (Kushwah et al., 2011). O tratamento com triptamina 250  $\mu\text{M}$ , por sua vez, gerou raízes retorcidas. É possível que este efeito esteja relacionado com uma interferência nas ações da auxina que é o principal fitormônio que regula o gravitropismo (Kleine-Vehn et al., 2010), uma ação em que as EROs também atuam como sinalizadores (Mittler e Berkowitz, 2001).

A comparação dos efeitos dos quatro derivados testados permite concluir que, embora alguns efeitos, como a redução no crescimento radicular em *E. heterophylla* tenha sido compartilhada por todos os derivados, a maior parte

das ações do L-triptofano, do 5-hidroxitriptofano e da triptamina não podem ser creditados exclusivamente à geração intracelular de melatonina. Nesse caso os efeitos seriam muito similares aos induzidos pela adição de melatonina exógena, porém atenuadas em suas intensidades na dependência da concentração intracelular de melatonina possivelmente gerada. De fato, foi demonstrado nas plantas que a síntese de melatonina a jusante da serotonina tem capacidade metabólica extremamente baixa em comparação com a montante da síntese de serotonina (Back et al., 2016; Erland e Saxena, 2017). Isto leva a uma grande diferença nos níveis de serotonina e melatonina nas plantas e que são explicados pela eficiência catalítica ( $K_{cat}/K_m$ ) das enzimas envolvidas na via de síntese de melatonina. A eficiência catalítica do T5H é cerca de pelo menos cinco ordens de magnitude superiores às do SNAT e ASMT. A TDC atua na via de síntese de triptamina a partir do L-triptofano, mas pode também catalisar a transformação do 5-hidroxitriptofano em serotonina (Park et al., 2012) uma reação que também está envolvida na síntese de melatonina em plantas.

Embora não tenha sido realizado um estudo comparativo com a serotonina, estudos têm revelado que, em plantas, a serotonina exerce poucas funções se comparada com a melatonina e, que a acentuada diferença entre os níveis de serotonina e melatonina são determinantes para as ações fisiológicas da melatonina (Lee et al., 2014).

Os resultados obtidos em *E. heterophylla* foram coerentes com essas informações, pois tanto o 5-hidróxitriptofano e a triptamina que podem gerar serotonina exerceram efeitos bem distintos. A triptamina alterou diversos parâmetros avaliados se comparado com os efeitos do 5-hidroxitriptofano e, as alterações anatômicas observadas nas raízes por cada composto foram muito diferentes. Considerando que a triptamina, mas não o 5-hidroxitriptofano, pode ser convertida em AIA nas raízes (Mitchell e Davies, 1972), é possível que, ao menos para as ações da triptamina, a produção local de AIA tenha contribuído para as respostas finais da *E. heterophylla*. Obviamente, a confirmação das hipóteses sobre o modo de ação dos derivados indólicos irão requerer estudos adicionais.

Os ensaios de captação da melatonina pelas plântulas de *E. heterophylla* demonstraram a alta taxa de captação da melatonina pelas raízes em sistema de hidroponia. Houve depleção total da melatonina (250  $\mu$ M), no meio de incubação em 72 horas e, ao mesmo tempo, um derivado denominado de MI foi gerado e

liberado pelas plântulas com tempo de eluição próximo ao da triptamina. Esse derivado é também gerado, em menor proporção por decomposição espontânea e segundo a literatura, pode ser o N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) (Maharaj et al., 2002). Não se pode, portanto, descartar a hipótese de que esse derivado tenha, também, contribuído para os efeitos observados no tratamento com a melatonina. Além de ser produzido rapidamente pelas plântulas de *E. heterophylla*, o MI foi liberado em quantidades apreciáveis no meio de crescimento e, foi provavelmente o composto que levou ao escurecimento do meio e também das raízes. Essa intensa captação e metabolização da melatonina são fatores positivos numa eventual aplicação prática da melatonina exógena no controle de plantas daninhas.

## 5. Conclusão

Nosso estudo revelou que L-triptofano e seus derivados 5-hidroxitriptofano, triptamina e melatonina exercem um fraco efeito bioestimulante em *Z. mays*, mas são tóxicas para a planta daninha *E. heterophylla*, especialmente a triptamina e a melatonina. A inibição no desenvolvimento das plântulas de *E. heterophylla* parece ser causada, em parte, por interferências na ação dos fitormônios, levando a um predomínio das ações do etileno. A melatonina exerce efeitos citotóxicos adicionais, indicada pela inibição na atividade respiratória mitocondrial e por danos oxidativos nas raízes. No contexto de uma agricultura ecológica sustentável, nosso estudo corroborou o potencial de aplicação dos derivados do L-triptofano, especialmente a triptamina e a melatonina na proteção de cultivos.

## 6. Referências

- Abbas, S.H., Sohail, M., Saleem, M., Mahmood, T., Aziz, I., Qamar, M., Majeed, A., Arif, M., 2013. Effect of L-tryptophan on plant weight and pod weight in chickpea under rainfed conditions. *Sci. Tech. Dev* 32, 277–280.
- Aebi, H., 1984. [13] Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Aguilera-Alvarado, G.P., Sánchez-Nieto, S., 2017. Plant hexokinases are multifaceted proteins. *Plant Cell Physiol.* 58, 1151–1160.
- Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ.* 26, 1–20.
- Amaro, A.C.E., Baron, D., Ono, E.O., Rodrigues, J.D., 2020. Physiological effects of strobilurin and carboxamides on plants: an overview. *Acta Physiol. Plant.* 42, 1–10.
- Arnao, M.B., 2014. Phyto melatonin: Discovery, content, and role in plants. *Adv. Bot.* 2014, 1–11.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2017. Growth activity, rooting capacity, and tropism: three auxinic precepts fulfilled by melatonin. *Acta Physiol. Plant.* 39, 127.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2015. Functions of melatonin in plants: a review. *J. Pineal Res.* 59, 133–150.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2014. Melatonin: Plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends Plant Sci.* 19, 789–797.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2007. Melatonin promotes adventitious and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *J. Pineal Res.* 42, 147–152.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82, 1227–1238.
- Babcock, G.T., 1999. How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 12971–12973.
- Back, K., Tan, D., Reiter, R.J., 2016. Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. *J. Pineal Res.* 61, 426–437.
- Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., Zolman, B.K., 2001. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-

- butyric acid b-oxidation. *J. Plant Growth Regul.* 20, 198–216.
- Bendall, D.S., Bonner, W.D., 1971. Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 47, 236–245.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H., 2013. Environmental regulation of dormancy and germination, in: *Seeds*. Springer New York, pp. 299–339.
- Boveris, A., Cadenas, E., Chance, B., 1980. Low level chemiluminescence of the lipoxygenase reaction. *Photobiochem. Photobiophys.* 1, 175–182.
- Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., 2003. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal, in: *Métodos de Laboratório Em Bioquímica*. Manole São Paulo, pp. 227–247.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Byeon, Y., Park, S., Kim, Y., Park, D., Lee, S., Back, K., 2012. Light-regulated melatonin biosynthesis in rice during the senescence process in detached leaves. *J. Pineal Res.* 53, 107–111.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. [59] Glutathione reductase, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 484–490.
- Carol, R.J., Dolan, L., 2006. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J. Exp. Bot.* 57, 1829–1834.
- Chen, Q., Qi, W. bo, Reiter, R.J., Wei, W., Wang, B. min, 2009. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *J. Plant Physiol.* 166, 324–328.
- Chen, R., Rosen, E., Masson, P.H., 1999. Gravitropism in higher plants. *Plant Physiol.* 120, 343–350.
- Chen, Z., Huang, J., He, J., Cai, K., 1997. Influence of L-tryptophan applied to soil on yield and nutrient uptake of cabbage. *Acta Pedol. Sin.* 34, 200–205.
- Cheng, Y., Zhao, Y., 2007. A role for auxin in flower development. *J. Integr. Plant Biol.* 49, 99–104.
- Chiapusio, G., Sánchez, A.M., Reigosa, M.J., González, L., Pellissier, F., 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *J. Chem. Ecol.* 23, 2445–2453.

- Clouse, S.D., Sasse, J.M., 1998. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 49, 427–451.
- Coelho, É.M.P., Barbosa, M.C., Mito, M.S., Mantovanelli, G.C., Oliveira, R.S., Ishii-Iwamoto, E.L., 2017. The activity of the antioxidant defense system of the weed species *Senna obtusifolia* L. and its resistance to allelochemical Stress. *J. Chem. Ecol.* 43, 725–738.
- Depuydt, S., Hardtke, C.S., 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21, R365-R373
- Diekmann, W., Venis, M.A., Robinson, D.G., 1995. Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3425–3429.
- Dong, J., Wu, F., Zhang, G., 2006. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64, 1659–1666.
- Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W., Schloot, W., 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18, 28–31.
- El-Awadi, M.E., Dawood, M.G., Abdel-Baky, Y.R., Hassan, E.A., 2017. Physiological effect of melatonin, AIA and their precursor on quality and quantity of chickpea plants grown under sandy soil conditions. *Agric. Eng. Int. CIGR J.* 19, 35–44.
- Engström, K., Lundgren, L., Samuelsson, G., 1992. Bioassay-guided isolation of serotonin from fruits of *Solanum tuberosum* L. *Acta Pharm. Nord.* 4, 91–92.
- Erland, L.A.E., Murch, S.J., Reiter, R.J., Saxena, P.K., 2015. A new balancing act: The many roles of melatonin and serotonin in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 10. e1096469
- Erland, L.A.E., Saxena, P.K., 2017. Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in plants. *Neurotransmitter.* 4, e1538
- Espen, L., Morgutti, S., Alisi, C., Pirovano, L., Ragg, E., Cocucci, S.M., 1995. Germination and pH of intracellular compartments in seeds of *Phacelia tanacetifolia*. *Physiol. Plant.* 93, 577–583.
- Estabrook, R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP: O ratio in: *Methods in Enzymology* (Estabrook, RW

- and Pullman, ME, Eds.).
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Angel Torres, M., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., Dolan, L., 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442–446.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 861–905.
- Frankenberger, W.T., Chang, A.C., Arshad, M., 1990. Response of *Raphanus sativus* to the auxin precursor, L-tryptophan applied to soil. *Plant Soil* 129, 235–241.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jürgens, G., 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147–153.
- Gapper, C., Dolan, L., 2006. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 141, 341–345.
- Geigenberger, P., Langenberger, S., Wilke, I., Heineke, D., Heldt, H.W., Stitt, M., 1993. Sucrose is metabolised by sucrose synthase and glycolysis within the phloem complex of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* 190, 446–453.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: II. Purification and Quantitative Relationship with Water-soluble Protein in Seedlings. *Plant Physiol.* 59, 315–318.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R., Poeggeler, B., 2007. Melatonin in plants—Focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Funct. Plant Sci. Biotechnol* 1, 32–45.
- Hattori, A., Migitaka, H., Iigo, M., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T., Reiter, R.J., 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35, 627–634.
- He, H., Yan, J., Yu, X., Liang, Y., Fang, L., Scheller, H.V., Zhang, A., 2017. The NADPH-oxidase AtRboh1 plays a positive role in drought-stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491, 834–839.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*

125, 189–198.

- Hernández-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M.B., 2005. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *J. Pineal Res.* 39, 137–142.
- Herrera-Jiménez, E., Alarcón, A., Larsen, J., Ferrera-Cerrato, R., Cruz-Izquierdo, S., Ferrera-Rodríguez, M.R., 2018. Comparative effects of two indole-producing *Trichoderma* strains and two exogenous phytohormones on the growth of *Zea mays* L., with or without tryptophan. *J. soil Sci. plant Nutr.* 18, 188–201.
- Hosseinian, F.S., Li, W., Beta, T., 2008. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chem.* 109, 916–924.
- Hu, Y., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., 2017. Regulation of seedling growth by ethylene and the ethylene–auxin crosstalk. *Planta* 245, 467–489.
- Huang, X., Mazza, G., 2011. Application of LC and LC-MS to the analysis of melatonin and serotonin in edible plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 269–284.
- Iglesias, M.J., Terrile, M.C., Bartoli, C.G., D’Ippólito, S., Casalengué, C.A., 2010. Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 74, 215–222.
- Ishihara, A., Hashimoto, Y., Tanaka, C., Dubouzet, J.G., Nakao, T., Matsuda, F., Nishioka, T., Miyagawa, H., Wakasa, K., 2008. The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J.* 54, 481–495.
- Ishii-Iwamoto, E.L., Abraham, D., Sert, M.A., Bonato, C.M., Kelmer-Bracht, A.M., Bracht, A., 2006. Mitochondria as a site of allelochemical action, in: Reigosa, M.J., Pedrol, N., González, L. (Eds.), *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer Science, Netherlands, pp. 267–284.
- Ishii-Iwamoto, E.L., Pergo Coelho, E.M., Reis, B., Sebastiao Moscheta, I., Moacir Bonato, C., 2012. Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. *Curr. Bioact. Compd.* 8, 50–64.
- Jambunathan, N., 2010. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants, in: *Plant Stress Tolerance*. Springer, pp. 291–297.

- Janas, K.M., Posmyk, M.M., 2013. Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application. *Acta Physiol. Plant.* 35, 3285–3292.
- Kappus, H., 1985. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance, in: *Oxidative Stress*. pp. 273–310.
- Kishorekumar, R., Bulle, M., Wany, A., Gupta, K.J., 2020. An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants, in: *Nitrogen Metabolism in Plants*. Springer, pp. 1–13.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T., Friml, J., 2010. Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 22344–22349.
- Kolář, J., Macháčková, I., 2005. Melatonin in higher plants: Occurrence and possible functions. *J. Pineal Res.* 39, 333–341.
- Kołodziejczyk, I., Posmyk, M.M., 2016. Melatonin-a new plant biostimulator? *J. Elem.* 21, 1187–1198.
- Koyama, F.C., Carvalho, T.L.G., Alves, E., da Silva, H.B., De Azevedo, M.F., Hemerly, A.S., Garcia, C.R.S., 2013. The structurally related auxin and melatonin tryptophan-derivatives and their roles in *Arabidopsis thaliana* and in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 646–651.
- Krishnamurthy, A., Rathinasabapathi, B., 2013. Oxidative stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.* 8, e25761.
- Kruger, N.J., von Schaewen, A., 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 236–246.
- Kushwah, S., Jones, A.M., Laxmi, A., 2011. Cytokinin interplay with ethylene, auxin, and glucose signaling controls *Arabidopsis* seedling root directional growth. *Plant Physiol.* 156, 1851–1866.
- Labouriau, L.G., Osborn, J.H., 1984. Temperature dependence of the germination of tomato seeds. *J. Therm. Biol.* 9, 285–294.
- Larkin, P.J., 1987. Calmodulin levels are not responsible for aluminium tolerance in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 14, 377–385.
- Lee, H.Y., Back, K., 2016. Mitogen-activated protein kinase pathways are required for melatonin-mediated defense responses in plants. *J. Pineal Res.* 60, 327–335.

- Lee, H.Y., Byeon, Y., Back, K., 2014. Melatonin as a signal molecule triggering defense responses against pathogen attack in *Arabidopsis* and tobacco. *J. Pineal Res.* 57, 262–268.
- Li, C., Wei, M., Ge, Y., Zhao, J., Chen, Y., Hou, J., Cheng, Y., Chen, J., Li, J., 2020. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reactive oxygen species metabolism in apple exocarp induced by acibenzolar-S-methyl. *Food Chem.* 308, 1-7.
- Maharaj, D.S., Anoopkumar-Dukie, S., Glass, B.D., Antunes, E.M., Lack, B., Walker, R.B., Daya, S., 2002. The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. *J. Pineal Res.* 32, 257-261.
- Manchester, L.C., Tan, D.-X., Reiter, R.J., Park, W., Monis, K., Qi, W., 2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants. *Life Sci.* 67, 3023–3029.
- Maness, P.C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby, W.A., 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4094-4098.
- Mangano, S., Juárez, S.P.D., Estevez, J.M., 2016. ROS regulation of polar growth in plant cells. *Plant Physiol.* 171, 1593–1605.
- Mantovanelli, G.C., Mito, M.S., Menezes, P.V.M da C., Contesoto, I. de C., do Nascimento, C.R.A., Zampieri, A.L.W., Stulp, G.F., Ricardo, L.L., Constantin, R.P., Ishii-Iwamoto, E.L., 2020. Differential effects of exogenous resveratrol on the growth and energy metabolism of *Zea mays* and the weed *Ipomoea grandifolia*. *J. Agric. Food Chem.* acs.jafc.9b06304.
- Masucci, J.D., Schiefelbein, J.W., 1996. Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 8, 1505–1517.
- Millar, A.H., Siedow, J.N., Day, D., 2015. Respiration and photorespiration, in: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons., Southern Gate, pp. 610-655.
- Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., Day, D.A., 2011. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 79–104.
- Miransari, M., Smith, D.L., 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99, 110–121.

- Mitchell, E.K., Davies, P.J., 1972. Indoleacetic acid synthesis in sterile roots of *Phaseolus coccineus*. *Plant cell Physiol.* 13, 1135–1138.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mittler, R., Berkowitz, G., 2001. Hydrogen peroxide, a messenger with too many roles? *Redox Rep.* 6, 69–72.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Messerli, M.A., Shi, C., Gilroy, S., 2007. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20996–21001.
- Moore, A.L., Siedow, J.N., 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1059, 121–140.
- Muneer, M., Saleem, M., Abbas, S.H., Hussain, I., Asim, M., 2009. Using L-tryptophan to influence the crop growth of maize at different harvesting stages. *Int J Biol Biotechnol* 6, 251–255.
- Murch, S.J., Campbell, S.S.B., Saxena, P.K., 2001. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Vitr. Cell. Dev. Biol.* 37, 786–793.
- Mustafa, A., Hussain, A., Naveed, M., Ditta, A., Nazli, Z., Sattar, A., 2016. Response of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) to soil and foliar applied L-tryptophan. *Soil Environ.* 35, 76–84.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 129, 185–195.
- Nawaz, M.A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R.J., Niu, M., Hameed, S., 2016. Melatonin: current status and future perspectives in plant science. *Front. Plant Sci.* 6, 1–13.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2013. Respiratory chains, in: *Bioenergetics*. Academic Press, pp. 91–157.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.

- Oldroyd, G.E.D., Dixon, R., 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 19–24.
- Pacifici, E., Polverari, L., Sabatini, S., 2015. Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *J. Exp. Bot.* 66, 1113–1121.
- Palego, L., Betti, L., Rossi, A., Giannaccini, G., 2016. Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. *J. Amino Acids* 2016, 1-13
- Park, S., Lee, K., Kim, Y., Back, K., 2012. Tryptamine 5-hydroxylase-deficient Sekiguchi rice induces synthesis of 5-hydroxytryptophan and N-acetyltryptamine but decreases melatonin biosynthesis during senescence process of detached leaves. *J. Pineal Res.* 52, 211–216.
- Parrish, D.J., Leopold, A.C., 1978. Confounding of alternate respiration by lipoxygenase activity. *Plant Physiol.* 62, 470–472.
- Parvez, M.A., Muhammad, F., Ahmad, M., 2000. Effect of auxin precursor (L-tryptophan) on the growth and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Pak J Biol Sci* 3, 1154–1155.
- Pelagio-Flores, R., Ortíz-Castro, R., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., 2011. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52, 490-508.
- Pelagio-Flores, R., Muñoz-Parra, E., Ortiz-Castro, R., López-Bucio, J., 2012. Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *J. Pineal Res.* 53, 279–288.
- Pergo, É.M., Ishii-Iwamoto, E.L., 2011. Changes in Energy Metabolism and Antioxidant Defense Systems During Seed Germination of the Weed Species *Ipomoea triloba* L. and the Responses to Allelochemicals. *J. Chem. Ecol.* 37, 500–513.
- Peyrot, F., Ducrocq, C., 2008. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J. Pineal Res.* 45, 235–246.
- Pirovano, L., Morgutti, S., Espen, L., Cocucci, S.M., 1996. Differences in transcription products and in translation and enzymatic activities during the early stages of imbibition of *Phacelia tanacetifolia* seeds with germination inhibited by light. *Physiol. Plant.* 96, 714–721.

- Pollmann, S., Müller, A., Piotrowski, M., Weiler, E.W., 2002. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 155-161.
- Popov, V.N., Simonian, R.A., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 415, 87–90.
- Posmyk, M.M., Bałabusta, M., Wieczorek, M., Sliwinska, E., Janas, K.M., 2009. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. *J. Pineal Res.* 46, 214–223.
- Posmyk, M.M., Janas, K.M., 2009. Melatonin in plants. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1–11.
- Puntarulo, S., Sánchez, R.A., Boveris, A., 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol.* 86, 626–630.
- Rademacher, W., 2015. Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J. Plant Growth Regul.* 34, 845–872.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Zhou, Z., Cruz, M.H.C., Fuentes-Broto, L., Galano, A., 2015. Phytomelatonin: Assisting plants to survive and thrive, *Molecules.* 20, 7396-7437
- Roshchina, V.V., 2001. Neurotransmitters in plant life. Plymouth: Science Publ., 283 pp.
- Rusak, B., Bina, K.G., 1990. Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu. Rev. Neurosci.* 387–401.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101, 7–12.
- Schulze, J., Tesfaye, M., Litjens, R., Bucciarelli, B., Trepp, G., Miller, S., Samac, D., Allan, D., Vance, C.P., 2002. Malate plays a central role in plant nutrition. *Plant Soil* 247, 133–139.
- Shann, J.R., Blum, U., 1987. The uptake of ferulic and p-hydroxybenzoic acids by *Cucumis sativus*. *Phytochemistry* 26, 2959–2964.
- Sharma, P., Bhardwaj, R., Yadav, A., Sharma, R.A., 2014. Antioxidant properties of methanolic extracts of *Boerhavia diffusa*. *Res. J. Phytochem.* 8, 119–126.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26.

- Shi, H., Chen, K., Wei, Y., He, C., 2016. Fundamental issues of melatonin-mediated stress signaling in plants. *Front. Plant Sci.* 7, 1124.
- Shi, H., Reiter, R.J., Tan, D., Chan, Z., 2015. Indole-3-acetic acid inducible 17 positively modulates natural leaf senescence through melatonin-mediated pathway in *Arabidopsis*. *J. Pineal Res.* 58, 26–33.
- Shinozaki, K., Uemura, M., Bailey-Serres, J., Bray, E.A., Weretilnyk, and E., 2015. Responses to abiotic stress, in: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, Southern Gate, pp. 1051–1100.
- Smirnoff, N., 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment, in: *Environment and Plant Metabolism*. BIOS Sci. Publi., pp. 217–241.
- Sodek, L., Lea, P.J., Mifflin, B.J., 1980. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. *Plant Physiol.* 65, 22–26.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.-Y., Doležal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., Alonso, J.M., 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–191.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A. V, Alonso, J.M., 2007. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 19, 2169–2185.
- Stürtz, M., Cerezo, A.B., Cantos-Villar, E., Garcia-Parrilla, M.C., 2011. Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and strawberries (*Fragaria ananassa*). *Food Chem.* 127, 1329–1334.
- Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der Straeten, D., Beemster, G.T.S., Sandberg, G., Bhalerao, R., Ljung, K., Bennett, M.J., 2007. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19, 2186–2196.
- Tan, D.-X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R.J., 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J. Exp. Bot.* 63, 577–597.
- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., 2008. Rapid synthesis of auxin via a new

- tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133, 164–176.
- Thom, E., Möhlmann, T., Quick, W.P., Camara, B., Neuhaus, H.-E., 1998. Sweet pepper plastids: enzymic equipment, characterisation of the plastidic oxidative pentose-phosphate pathway, and transport of phosphorylated intermediates across the envelope membrane. *Planta* 204, 226–233.
- Ting, J.P., Führ, I., Curry, R., Zschoche, W., 2012. Malate dehydrogenase isozymes in plants: preparation, properties, and biological significance. *Isozymes. II. Physiol. Funct.* (CL Markert, ed.) 369–384.
- Tripathy, B.C., Oelmüller, R., 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 12, 1621-1633.
- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G.T.S., Bennett, M.J., 2012. Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* 6, 326-331.
- Verbelen, J.-P., Cnodder, T. De, Le, J., Vissenberg, K., Baluška, F., 2006. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone. *Plant Signal. Behav.* 1, 296–304.
- Wang, L.Y., Liu, J.L., Wang, W.X., Sun, Y., 2016. Exogenous melatonin improves growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress. *Photosynthetica* 54, 19–27.
- Wang, P., Sun, X., Xie, Y., Li, M., Chen, W., Zhang, S., Liang, D., Ma, F., 2014. Melatonin regulates proteomic changes during leaf senescence in *Malus hupehensis*. *J. Pineal Res.* 57, 291–307.
- Wang, S., Ren, X., Huang, B., Wang, G., Zhou, P., An, Y., 2016. Aluminium-induced reduction of plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) is mediated by interrupting auxin transport and accumulation in roots. *Sci. Rep.* 6, 1–13.
- Weeda, S., Zhang, N., Zhao, X., Ndip, G., Guo, Y., Buck, G.A., Fu, C., Ren, S., 2014. *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS One* 9, e93462.
- Wei, W., Li, Q.T., Chu, Y.N., Reiter, R.J., Yu, X.M., Zhu, D.H., Zhang, W.K., Ma, B., Lin, Q., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2015. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *J. Exp. Bot.* 66, 695–707.
- Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Ann.*

- Bot. 95, 707–735.
- Yang, L., Wang, X., Chang, N., Nan, W., Wang, S., Ruan, M., Sun, L., Li, S., Bi, Y., 2019. Cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in seed germination and root growth under salinity in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 10, 1–14.
- Yasmin, H., Nosheen, A., Naz, R., Bano, A., Keyani, R., 2017. L-tryptophan-assisted PGPR-mediated induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Interact.* 12, 567–578.
- Yassen, A.A., Mazher, A.A.M., Zaghloul, S.M., 2010. Response of anise plants to nitrogen fertilizer and foliar spray of tryptophan under agricultural drainage water. *New York Sci. J.* 3, 120–127.
- Zahir, Z.A., Malik, M.A., Arshad, M., 2000. Improving crop yields by the application of an auxin precursor L-tryptophan. *Pak. J. Biol. Sci.* 3, 133-135.
- Zhang, H., Zhang, N.A., Yang, R., Wang, L., Sun, Q., Li, D., Cao, Y., Weeda, S., Zhao, B., Ren, S., 2014. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA 4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Pineal Res.* 57, 269–279.
- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y.-D., 2014. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J. Exp. Bot.* 66, 647-656.
- Zhang, S., Huang, L., Yan, A., Liu, Y., Liu, B., Yu, C., Zhang, A., Schiefelbein, J., Gan, Y., 2016. Multiple phytohormones promote root hair elongation by regulating a similar set of genes in the root epidermis in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 67, 6363–6372.
- Zhao, H., Su, T., Huo, L., Wei, H., Jiang, Y., Xu, L., Ma, F., 2015. Unveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case. *J. Pineal Res.* 59, 255–266.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., Chory, J., 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science.* 291, 306–309.
- Zhu, C., Yang, N., Guo, Z., Qian, M., Gan, L., 2016. An ethylene and ROS-dependent pathway is involved in low ammonium-induced root hair elongation in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 105, 37–44.