

**JOSÉ VICTOR SIQUEIRA DA SILVA**

**IMPACTOS DA MELATONINA NA MORFOFISIOLOGIA E TOLERÂNCIA A  
ESTRESSES ABIÓTICOS NO CULTIVO *in vitro* DE GINSENG-BRASILEIRO  
[*Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN]**

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

Orientador: Wagner Campos Otoni

Coorientador: Evandro Alexandre Fortini

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

S586i  
2023

Silva, José Victor Siqueira da, 1997-  
Impactos da melatonina na morfofisiologia e tolerância a estresses abióticos no cultivo *in vitro* ginseng-brasileiro [*Pfaffia glomerada* (Spreng.) Pedersen] / José Victor Siqueira da Silva. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (91 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.753>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Amaranthaceae* - Fisiologia. 2. Ginseng - Propagação *in vitro*. 3. Ginseng - Resistência à seca. 4. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 5. Melatonina. I. Otoni, Wagner Campos, 1962-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 571.2353


**JOSÉ VICTOR SIQUEIRA DA SILVA**

**IMPACTOS DA MELATONINA NA MORFOFISIOLOGIA E TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS NO CULTIVO *in vitro* DE GINSENG-BRASILEIRO [Pfaffia glomerata (SPRENG.) PEDERSEN]**

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

APROVADA: 20 de setembro de 2023.


Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 JOSE VICTOR SIQUEIRA DA SILVA  
Data: 11/12/2023 15:50:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

José Victor Siqueira da Silva

Autor

Documento assinado digitalmente  
 WAGNER CAMPOS OTONI  
Data: 11/12/2023 20:42:19-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Wagner Campos Otoni

Orientador

1

## AGRADECIMENTOS

2

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar vida, saúde, proteção e bençãos para as enfrentar as batalhas de cada dia.

4

Ao meu orientador, professor Wagner Campos Otoni, que me acolheu como um filho. Agradeço todos os conselhos, ensinamentos, confiança, paciência e por todo apoio durante essa jornada acadêmica. E a todos os professores do Departamento de Biologia Vegetal, que contribuíram de forma valiosa para o meu aprendizado.

8

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal (LCT/BIOAGRO), pela acolhida, pelas experiências e conhecimentos adquiridos. Agradeço a todos que ajudaram na avaliação dos experimentos e execução das análises.

11

Ao meu coorientador, Evandro Alexandre Fortini, pela determinação no desenvolvimento desse trabalho, por todas as sugestões e pela amizade. Às minhas amigas e tutoras, Anyela Rios-Rios e Tatiane D. Silva, pelos ensinamentos, ajudas e incentivos, por estar comigo desde os primeiros dias no laboratório.

15

À minha família, por sempre apoiarem, incentivarem e acreditarem na realização de mais uma etapa na minha vida. Agradeço as orações, palavras de conforto e por nunca me abandonarem. Aos meus pais, José Wilton e Kelles, por todo trabalho exaustivo, e às minhas irmãs, Jullia e Julliele, por todo companheirismo.

19

À Letícia Freitas, que esteve ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio e incentivo incondicional. Agradeço a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

22

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso e pelo crescimento profissional.

25

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, e ao Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/Proex), pelo auxílio financeiro.

28

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro através dos convênios REDE MINEIRA - Estresse em Plantas (CRA-RED-00053-16) e APQ-00772-19.

31

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

33

35 SILVA, José Victor Siqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de  
36 2023. **Impactos da melatonina na morfofisiologia e tolerância a estresses abióticos**  
37 **no cultivo *in vitro* de ginseng-brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].**  
38 Orientador: Wagner Campos Otoni.

39

40 A *Pfaffia glomerata*, conhecida popularmente por ginseng-brasileiro, é amplamente  
41 utilizada devido a suas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória,  
42 analgésica, antioxidante e antimicrobiana, bem como no combate de problemas  
43 gástricos, perdas de memória, redução do estresse, ansiedade e depressão. Essas  
44 propriedades se devem, principalmente, ao metabólito secundário 20-hidroxiecdisona  
45 (20E), um fitoecdisteroide presente em algumas espécies vegetais e amplamente  
46 utilizado na indústria farmacêutica. De modo a elucidar a rota de biossíntese desse  
47 importante metabólito, a cultura de tecidos vegetais se apresenta como uma alternativa  
48 viável, pois permite o controle do ambiente de cultivo. Além disso, a cultura de tecidos  
49 é uma ferramenta importante para o estudo de tolerância ao estresse em plantas, bem  
50 como, a utilização de biorreguladores como alternativa de minimizar os danos causados  
51 pelo estresse. A melatonina é uma molécula multirregulatória capaz de atuar como  
52 hormônio, tem ação antioxidante, melhorando a tolerância de plantas a vários estresses.  
53 Dentre os estresses abióticos, o déficit hídrico é um dos que mais afetam o crescimento  
54 e desenvolvimento das plantas e contribui para a redução da produtividade agrícola.  
55 Assim, objetivou-se avaliar a influência da melatonina na morfofisiologia e na produção  
56 de antocianinas e 20-hidroxiecdisona em *P. glomerata* cultivada *in vitro*, bem como  
57 investigar seu efeito em plantas cultivadas sob déficit hídrico. Para isso, foram  
58 executados dois experimentos. No primeiro experimento foi avaliado o efeito da  
59 aplicação de diferentes concentrações de melatonina (0, 10, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ). No  
60 segundo foi avaliado os efeitos do déficit hídrico, bem como a influência da melatonina  
61 nas respostas de tolerância ao estresse. Os efeitos do déficit hídrico foram provocados  
62 pela suplementação do meio de cultura com polietilenoglicol (PEG 4000). Em ambos os  
63 experimentos foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 2 cm, os quais  
64 foram inoculados em meio Murashige e Skoog (MS), sendo as culturas mantidas a  $25 \pm$   
65  $2^\circ \text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de 41  $\mu\text{mol}$ . Observou-se que apesar de  
66 afetar negativamente o desenvolvimento das plantas quando em altas concentrações, a  
67 melatonina também desencadeia respostas antioxidantes, modula o metabolismo

68 primário e a biossíntese de 20E e tem influência sobre hormônios relacionados com  
69 respostas de tolerância ao estresse. Plantas cultivadas sob estresse hídrico apresentaram  
70 redução no crescimento e na biomassa, incremento nos teores de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bem  
71 como alterações no metabolismo primário e secundário; em contrapartida, as plantas  
72 apresentaram uma série de respostas de tolerância ao estresse, como o aumento da  
73 atividade de enzimas do estresse oxidativo. A melatonina induziu respostas cruciais na  
74 mitigação do estresse, reduzindo a peroxidação lipídica, evitando a degradação de  
75 proteínas, e aliviando o estresse oxidativo. Este trabalho contribui para uma  
76 compreensão mais profunda da melatonina como uma molécula reguladora em plantas e  
77 fornece novas evidências sobre as consequências do déficit hídrico e do uso de  
78 biorreguladores nas respostas de tolerância ao estresse em plantas de *P. glomerata*.

79

80

81 **Palavras-chave:** Amaranthaceae; Elicitação; 20-hidroxiecdsona; Fitoecdisteroides;  
82 Propagação *in vitro*.

84 SILVA, José Victor Siqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2023.  
85 **Impacts of melatonin on morphophysiology and tolerance to abiotic stresses in the**  
86 ***in vitro* cultivation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].**  
87 Advisor: Wagner Campos Otoni.  
88

89 *Pfaffia glomerata*, commonly known as Brazilian ginseng, is widely used due to its  
90 pharmacological properties, such as anti-inflammatory, analgesic, antioxidant,  
91 antimicrobial, as well as to combat gastric problems, memory loss, reducing stress,  
92 anxiety, and depression. These properties are mainly due to the secondary metabolite  
93 20-hydroxyecdysone (20E), a phytoecdysteroid present in some plant species and  
94 widely used in the pharmaceutical industry. To elucidate the biosynthesis route of this  
95 critical metabolite, tissue culture has emerged as a viable alternative, as it allows control  
96 of the cultivation environment. Plant tissue culture is also an important tool for studying  
97 stress tolerance in plants, as well as the use of bioregulators as an alternative to  
98 minimize damage caused by stress. Melatonin is a multiregulatory molecule capable of  
99 acting as a hormone, has antioxidant action, improving plant tolerance to various  
100 stresses. Among abiotic stresses, water deficit is one of those that most affects plant  
101 growth and development and contributes to reduce agricultural productivity. Thus, the  
102 objective was to evaluate the influence of melatonin on the morphophysiology and  
103 production of anthocyanins and 20-hydroxyecdysone in *P. glomerata* grown *in vitro*, as  
104 well as to investigate its effect on plants grown under water deficit. Two experiments  
105 were therefore carried out. In the first experiment, the effect of applying different  
106 concentrations of melatonin (0, 10, 100, 500 and 1000  $\mu\text{M}$ ) was evaluated. In the  
107 second, the effects of water deficit were evaluated, as well as the influence of melatonin  
108 on stress tolerance responses. The effects of water deficit were caused by supplementing  
109 the culture medium with polyethylene glycol (PEG 4000). In both experiments, nodal  
110 segments of approximately 2 cm were used, which were inoculated in the Murashige  
111 and Skoog (MS) medium. The cultures were maintained at  $25 \pm 2$  ° C under a 16 h  
112 photoperiod and 41  $\mu\text{mol}$  irradiance of. It was observed that despite negatively affecting  
113 plant development when in high concentrations, melatonin also triggers antioxidant  
114 responses, modulates primary metabolism and 20E biosynthesis and influences  
115 important hormones for stress tolerance responses. Plants grown under water deficit  
116 showed a reduction in growth and biomass, an increase in MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  contents, as

117 well as alterations in primary and secondary metabolism; on the other hand, plants  
118 showed a series of stress tolerance responses, such as an increase in the activity of  
119 oxidative stress enzymes. Melatonin induced crucial stress mitigation responses,  
120 reducing lipid peroxidation, preventing protein degradation, and alleviating oxidative  
121 stress. This work contributes to a deeper understanding of melatonin as a regulatory  
122 molecule in plants. It provides new evidence on the consequences of water deficit and  
123 the use of bioregulators on stress tolerance responses in *P. glomerata* plants.

124

125

126 **Keywords:** Amaranthaceae; Elicitation; 20-hydroxyecdysone; Phytoecdysteroids; *In*  
127 *vitro* propagation.

129	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
130	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	12
131	<b>CAPÍTULO I:</b> .....	17
132	<b>Melatonina modula processos fisiológicos e metabólicos de plantas de <i>Pfaffia</i></b>	
133	<b><i>glomerata</i> cultivadas <i>in vitro</i></b> .....	17
134	<b>RESUMO</b> .....	17
135	<b>ABSTRACT</b> .....	18
136	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
137	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
138	<b>Crescimento das plantas e desenho experimental</b> .....	22
139	<b>Variáveis de crescimento</b> .....	22
140	<b>Extração metanólica para análises bioquímicas</b> .....	23
141	<b>Teor de pigmentos fotossintéticos e de antocianinas</b> .....	23
142	<b>Teor de açúcares, aminoácidos, proteínas e amido</b> .....	24
143	<b>Conteúdo de prolina</b> .....	25
144	<b>Quantificação de enzimas do estresse oxidativo</b> .....	25
145	<b>Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio</b> .....	26
146	<b>Quantificação do 20-hidroxiecdisona</b> .....	27
147	<b>Determinação do perfil hormonal</b> .....	27
148	<b>Análises estatísticas</b> .....	28
149	<b>RESULTADOS</b> .....	29
150	<b>DISCUSSÃO</b> .....	32
151	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
152	<b>FIGURAS</b> .....	49
153	<b>CAPÍTULO II:</b> .....	57
154	<b>Efeitos do déficit hídrico e da melatonina sobre o crescimento e biossíntese de 20-</b>	
155	<b>hidroxiecdisona em <i>Pfaffia glomerata</i> cultivada <i>in vitro</i></b> .....	57
156	<b>RESUMO</b> .....	57
157	<b>ABSTRACT</b> .....	58
158	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	59
159	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	62
160	<b>Crescimento das plantas e desenho experimental</b> .....	62

161	Variáveis de crescimento .....	62
162	Extração metanólica para análises bioquímicas.....	63
163	Teor de pigmentos fotossintéticos e de antocianinas.....	63
164	Teor de açúcares, aminoácidos, proteínas e amido .....	64
165	Conteúdo de prolina .....	65
166	Quantificação de enzimas do estresse oxidativo.....	65
167	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio .....	66
168	Quantificação do 20-hidroxicdisona .....	67
169	Análises estatísticas.....	67
170	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
171	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
172	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
173	<b>FIGURAS.....</b>	<b>85</b>
174	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>91</b>
175		

## 176 INTRODUÇÃO GERAL

177 *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) é uma planta medicinal conhecida  
178 popularmente por fáfia ou ginseng-brasileiro, que apresenta grande potencial  
179 farmacológico, sendo comparada ao ginseng-coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer)  
180 (Nascimento *et al.*, 2007). Possui distribuição geográfica ampla, com predominância no  
181 sul da América tropical e subtropical. É encontrada em quase todas as regiões do Brasil,  
182 ocorrendo principalmente em locais de solo úmido e arenoso, compondo a vegetação  
183 ciliar de rios (Marchioretto, 2015).

184 Seu potencial uso na medicina e indústria farmacêutica se justifica por sua ação  
185 tônica, rejuvenescedora, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antimicrobiana,  
186 combate de problemas gástricos e perdas de memória (Neto *et al.*, 2005; Souza *et al.*,  
187 2005; Mendes, 2011; Caleffi *et al.*, 2015; Mazzeo *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2019;),  
188 contribui para a redução do estresse, ansiedade e depressão (Franco *et al.*, 2021), além  
189 de possuir efeitos que auxiliam no tratamento do câncer (Neves *et al.*, 2016).

190 *P. glomerata* produz e armazena compostos como o 20-hidroxiecdisona (20E),  
191 ecdisterona, os ácidos glomérico e pfamérico, rubrosterona,  $\beta$ -D glucopiranosil oleato e  
192 frutanos insulínicos. A presença desses compostos, bem como a interação entre eles,  
193 pode estar relacionada com as propriedades medicinais que a espécie apresenta  
194 (Shiobara *et al.*, 1993; Caleffi *et al.*, 2015; Festucci-Buselli *et al.*, 2008a; Franco *et al.*,  
195 2021; Dinan *et al.*, 2021). O 20E é o que, dentre estes compostos, está presente em  
196 maiores teores nas plantas de *P. glomerata* (Schmelz *et al.*, 1998; Dinan, 2001), é  
197 análogo ao hormônio que controla a ecdise em insetos, sendo que, em plantas, a  
198 hipótese mais aceita é que 20E atue como um fitoquímico protetor contra insetos  
199 fitófagos não adaptados (Festucci-Buselli *et al.*, 2008b; Dinan *et al.*, 2009), embora  
200 também possa atuar como fitohormônios e fonte de fitoesteroides requeridos para o  
201 crescimento e proliferação celular (Machackova *et al.*, 1995).

202 Em decorrência de seu uso medicinal e farmacêutico e, conseqüentemente, o  
203 aumento do seu valor econômico, o extrativismo predatório de *P. glomerata* e a  
204 destruição do seu habitat natural, tem gerado perda genética para espécie além de  
205 colocar em risco o fornecimento interrupto de matéria-prima (Kamada, 2006; Kamada  
206 *et al.*, 2009). A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta importante para minimizar  
207 esses danos, através da propagação clonal em larga escala e de estudos com elicitores  
208 bióticos e abióticos. Os elicitores podem alterar etapas importantes das vias

209 biossintéticas impactando na produção de metabólitos secundários e influenciando nas  
210 respostas de tolerância aos estresses (Patel & Krishnamurthy, 2013).

211 Um potencial elicitador é a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), uma  
212 indolamina identificada inicialmente na glândula pineal de bovinos (Lerner *et al.*, 1958)  
213 e, posteriormente, em plantas (Dubbels *et al.*, 1995; Hattori *et al.*, 1995). É uma  
214 molécula multirregulatória presente na maioria das plantas e animais, que desempenha  
215 várias funções (Zhan *et al.*, 2019). Esta molécula age como antioxidante em plantas,  
216 eliminando radicais livres, reduzindo a peroxidação lipídica e aliviando o estresse  
217 oxidativo (Reiter *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2018), também pode atuar como hormônio,  
218 regulando o crescimento de ramos e raízes (Arnao & Hernández-Ruiz, 2017).

219 Estudos também mostram que a melatonina pode melhorar a tolerância a vários  
220 estresses em plantas, como salinidade, toxicidade de metais, ataque de patógenos, frio,  
221 calor e seca (Li *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Li *et al.*,  
222 2016; Balabusta *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2018). Visto  
223 que, o papel da melatonina na modulação do metabolismo secundário em plantas e seus  
224 efeitos na resposta de tolerância ao estresse permanecem pouco claros. O objetivo do  
225 presente trabalho foi avaliar a influência da melatonina na morfofisiologia e na  
226 produção de compostos como o 20-E em plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro*,  
227 submetidas e não submetidas a déficit hídrico.

228

229 **REFERÊNCIAS**

- 230 Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J. (2017). Growth activity, rooting capacity, and  
231 tropism: three auxinic precepts fulfilled by melatonin. *Acta Physiologiae Plantarum*  
232 39(6), 127.
- 233 Balabusta, M., Szafranska, K., Posmyk, M.M. (2016). Exogenous melatonin improves  
234 antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) germinated under chilling  
235 stress. *Frontiers in Plant Science* 7, 1–12.
- 236 Caleffi, E. R.; Krausová, G.; Hyršlová, I.; Paredes, L. L. R.; dos Santos, M. M.; Sasaki,  
237 G. L.; Gonçalves, R. A. C.; De Oliveira, A. J. B. (2015). Isolation and prebiotic activity  
238 of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots.  
239 *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 392–399.
- 240 Dias, F. C. R., Martins, A. L. P., Melo, F. C. S. A., Cupertino, M. C., Gomes, M. L. M.,  
241 Oliveira, J. M., Damasceno, E. M., Silva, J., Otoni, W. C., Matta, S. L. P. (2019).  
242 Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous  
243 tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the  
244 mice testes. *Journal of Ethnopharmacology* 233:179–189.
- 245 Dinan, L. (2001) Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57:325–339.
- 246 Dinan, L., Harmatha, J., Volodin, V., Lafont, R. (2009). Phytoecdysteroids: diversity,  
247 biosynthesis and distribution. *Ecdysone: Structures and functions*. Netherlands p. 3–45.
- 248 Dinan, L., Dioh, W., Veillet, S., Lafont, R. (2021). 20-Hydroxyecdysone from plant  
249 Extracts to clinical use: Therapeutic potential for the treatment of neuromuscular,  
250 cardio-metabolic and respiratory diseases. *Biomedicines* 9(5): 492.
- 251 Ding, F., Wang, M., Liu, B., Zhang, S. (2017). Exogenous melatonin mitigates  
252 photoinhibition by accelerating non-photochemical quenching in tomato seedlings  
253 exposed to moderate light during chilling. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–11.
- 254 Ding, F., Wang, G., Wang, M., Zhang, S. (2018). Exogenous melatonin improves  
255 tolerance to water deficit by promoting cuticle formation in tomato plants. *Molecules*  
256 23: 1605.

- 257 Dubbels, R., Reiter, R., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., et al.  
258 (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high  
259 performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*  
260 18:28–31.
- 261 Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., Chen, L. (2018). Melatonin: A multifunctional factor in  
262 plants. *International Journal Molecular Sciences* 19: 1528.
- 263 Festucci-Buselli, R. A., Contim, L. A. S., Barbosa, L. C. A., Stuart, J., Otoni, W. C.  
264 (2008a). Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone –  
265 a review. *Botany* 86: 978 – 987.
- 266 Festucci-Buselli, R. A., Contim, L. A. S., Barbosa, L. C. A., Stuart, J., Otoni, W. C.  
267 (2008b). Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata*  
268 development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20:305–311.
- 269 Franco, R. R., Takata, L. A., Chagas, K., Justino, A. B., Saraiva, A. L., Goulart, L. R.,  
270 Ávila, V. M. R., Otoni, W. C., Espindola, F. S., Silva, C. R. (2021). A 20-  
271 hydroxyecdysone-enriched fraction from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen roots  
272 alleviates stress, anxiety, and depression in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 267:  
273 113599.
- 274 Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, et al. (1995)  
275 Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and  
276 binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology*  
277 *International* 35:627–34.
- 278 Kamada, T. (2006). Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia*  
279 *glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de beta-  
280 ecdisona. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.
- 281 Kamada, T., Picoli, E., Vieira, R., Barbosa, L. C. A., Cruz, C. D., Otoni, W. C. (2009).  
282 Variation of morphological and physiological characters in natural populations of  
283 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and their correlation with  $\beta$ -ecdysone production.  
284 *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11(3): 247-256.

- 285 Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. (1958). Isolation of melatonin, the  
286 pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical*  
287 *Society* 80:2587
- 288 Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., Jia, D., Fu, M., Ma, F. (2012). The  
289 mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus*  
290 *hupehensis*. *Journal of Pineal Research* 53: 298–306.
- 291 Li, M.Q., Hasan, M.K., Li, C.X., Ahammed, G.J., Xia, X.J., Shi, K., Zhou, Y.H.; Reiter,  
292 R.J., Yu, J.Q., Xu, M.X., et al. (2016). Melatonin mediates selenium-induced tolerance  
293 to cadmium stress in tomato plants. *Journal of Pineal Research* 61: 291-302.
- 294 Liang, C., Zheng, G., Li,W.;Wang, Y., Hu, B., Wang, H., Wu, H., Qian, Y., Zhu, X.G.,  
295 Tan, D.X.; et al. (2015). Melatonin delays leaf senescence and enhances salt stress  
296 tolerance in rice. *Journal of Pineal Research* 59, 91–101.
- 297 Machackova, I., Vagner, M., Slama, K. (1995). Comparison between the effects of 20-  
298 hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants. *European*  
299 *Journal of Entomology* 92:309–316.
- 300 Marchioretto, M. S. (2015). *Pfaffia* in Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim  
301 Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
302 <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB4330>> Acesso em: 03/04/2023.
- 303 Mazzeo, G. C. C. S., Cortez, F. S., Pusceddu, F. H.; Santos, A. R., Guimarães, L. L.,  
304 Amaral, F. P., Silva, M. P. O., Toma, W. (2013). Avaliação da atividade  
305 antiulcerogênica e ecotoxicológica do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das  
306 folhas de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). *UNISANTA*  
307 *BioScience* 2:75–80.
- 308 Mendes, F. R. (2011). Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk  
309 medicine. *Revista Brasileira Farmacognosia* 21:754–763.
- 310 Nascimento, E. X., Mota, J. H., Carmo Vieira M., Zárata, N. A. H. (2007). Produção de  
311 biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo  
312 solteiro e consorciado. *Ciência e Agrotecnologia* 31:724–730.

- 313 Neto, A. G., Costa, J. M. L. C., Belati, C., Vinholis, A. H. C., Possebom, L. S., Da Silva  
314 Filho, A. A., Cunha, W. R., Carvalho, J. C. T., Bastos, J. K., Silva, M. L. A. (2005).  
315 Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata*  
316 (Spreng.) Pedersen. *Journal of Ethnopharmacology* 96:87–91.
- 317 Neves, C. S., Gomes, S. S. L., dos Santos, T. R., de Almeida, M. M., de Souza, Y. O.,  
318 Garcia, R. M. G, Otoni, W. C., Raposo, N. B. R., Viccini, L. F., Campos, J. M. S.  
319 (2016). “Brazilian ginseng” (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen, Amaranthaceae)  
320 methanolic extract: cytogenotoxicity in animal and plant assays. *South African Journal*  
321 *of Botany* 106:174–180.
- 322 Patel, H. & Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plants tissue culture. *Journal of*  
323 *Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2): 60-65.
- 324 Reiter, R.J., Tan, D.X., Zhou, Z., Cruz, M.H.C., Fuentes-Broto, L., Galano, A. (2015).  
325 Phytomelatonin: Assisting plants to survive and thrive. *Molecules* 20: 7396–7437.
- 326 Schmelz, E. A., Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Bowers, W. S. (1998). Damage-  
327 induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: A rapid root response involving  
328 the octadecanoic acid pathway. *Journal of Chemical Ecology* 24:339–360.
- 329 Shi, H., Wang, X., Tan, D.X., Reiter, R.J., Chan, Z. (2015). Comparative physiological  
330 and proteomic analyses reveal the actions of melatonin in the reduction of oxidative  
331 stress in Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Journal of Pineal Research* 59:  
332 120–131.
- 333 Shi, H., Wang, X., Ye, T., Chen, F., Deng, J., Yang, P., Zhang, Y., Chan, Z. (2014). The  
334 Cysteine2/Histidine2-Type Transcription Factor ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS  
335 THALIANA6 Modulates Biotic and Abiotic Stress Responses by Activating Salicylic  
336 Acid-Related Genes and C-REPEAT-BINDING FACTOR Genes in *Arabidopsis*.  
337 *Journal Plant Physiology* 165: 1367–1379.
- 338 Shiobara, Y., Inque, S. S., Keato, K., Nishigushi, Y., Oishi, Y., Nishimito, N., Oliveira,  
339 F., Aksue, G., Akisue, M. K., Hashimoto, G. A. (1993). A nortriterpenoid, triterpenoid  
340 and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry* 32:1527–1530.

- 341 Souza Daniel, J. F., Alves, K. Z., Silva Jacques, D., Silva E Souza, P. V., Carvalho, M.  
342 G., Freire, R. B., Ferreira, D.T, Freire, M. F. I. (2005). Free radical scavenging activity  
343 of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). Indian Journal of  
344 Pharmacology 37:174.
- 345 Xu, W.; Cai, S.Y.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Ahammed, G.J.; Xia, X.J.; Shi, K.; Zhou,  
346 Y.H.; Yu, J.Q.; Reiter, R.J.; et al. (2016). Melatonin enhances thermotolerance by  
347 promoting cellular protein protection in tomato plants. Journal of Pineal Research, 61,  
348 457–469.
- 349 Zhan, H., Nie, X., Zhang, T., Li, S., Wang, X., Du, X., Tong, W., Song, W. (2019).  
350 Melatonin: A small molecule but important for salt stress tolerance in plants.  
351 International Journal of Molecular Sciences 20(3): 709.

352

## CAPÍTULO I:

353

**Melatonina modula processos fisiológicos e metabólicos de plantas de *Pfaffia***

354

***glomerata* cultivadas *in vitro***355 **RESUMO**

356

*Pfaffia glomerata*, conhecida por ginseng brasileiro, possui potenciais propriedades farmacológicas e medicinais devido, principalmente à produção do metabólito secundário 20-hidroxiecdisona (20E). De modo a compreender a rota de biossíntese de metabólitos de interesse, diversas estratégias podem ser empregadas, tais como a aplicação de compostos elicitores. A melatonina é uma molécula multifuncional ativa em diversos processos metabólicos e que pode influenciar no acúmulo de diversos metabólitos secundários. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da elicitação com melatonina no desenvolvimento e na produção de 20E em plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais de aproximadamente 2 cm foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (MS), suplementado com diferentes concentrações de melatonina (0, 10, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ). As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A elicitação com altas concentrações de melatonina afeta negativamente o crescimento das plantas, o acúmulo de biomassa e os teores de pigmentos. Por outro lado, a melatonina induziu mecanismos de resposta antioxidantes, levando ao aumento da atividade de enzimas do estresse oxidativo e redução da peroxidação lipídica e do acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os teores de aminoácidos, prolina e proteínas também foram maiores em raízes de plantas expostas a melatonina. Além disso, a melatonina afetou o metabolismo primário e a biossíntese de 20E em concentrações específicas e teve influência sobre hormônios importantes nas respostas de tolerância ao estresse. Nossos resultados contribuem para uma melhor compreensão da melatonina como uma molécula reguladora em plantas.

377

378

379

**Palavras-chave:** Fitorreguladores; Ginseng-brasileiro; Metabólitos secundários;

380

Antioxidantes; Elicitores.

381 **ABSTRACT**

382 *Pfaffia glomerata*, known as Brazilian ginseng, has potential pharmacological and  
383 medicinal properties mainly due to the production of the secondary metabolite 20-  
384 hydroxyecdysone (20E). To understand the biosynthesis route of metabolites of interest,  
385 various strategies can be employed, such as the application of elicitor compounds.  
386 Melatonin is a multifunctional molecule active in several metabolic processes and can  
387 influence the accumulation of secondary metabolites. Thus, the objective of the present  
388 study was to evaluate the effect of melatonin elicitation on the development and  
389 production of 20E in *P. glomerata* plants grown *in vitro*. Nodal segments of  
390 approximately 2 cm were inoculated in Murashige and Skoog (MS) medium  
391 supplemented with different concentrations of melatonin (0, 10, 100, 500, and 1000  
392  $\mu\text{M}$ ); cultures were maintained at  $25 \pm 2$  ° C, under a photoperiod of 16 h and irradiance  
393 of  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Elicitation with high concentrations of melatonin negatively affected  
394 plant growth, biomass accumulation and pigment content. On the other hand, melatonin  
395 induces antioxidant response mechanisms, leading to an increase in the activity of  
396 oxidative stress enzymes and a reduction of lipid peroxidation and  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulation.  
397 The levels of amino acids, proline, and proteins were also higher in the roots of plants  
398 exposed to melatonin. In addition, melatonin affected primary metabolism and 20E  
399 biosynthesis at specific concentrations and influenced important hormones in stress  
400 tolerance responses. The results contribute to a deeper understanding of melatonin as a  
401 regulatory molecule in plants.

402

403

404 **Keywords:** Phyto regulators; Brazilian ginseng; Secondary metabolites; Antioxidants;  
405 Elicitors.

## 406 INTRODUÇÃO

407 As plantas possuem grande importância para os seres humanos, além da  
408 utilização na alimentação, geração de energia e construção civil, a presença de inúmeros  
409 compostos, chamados de metabólitos ou fitoquímicos, tem potencializado o uso das  
410 plantas na medicina e indústria farmacêutica (Bhaskar *et al.*, 2022). Metabólitos  
411 primários são produzidos em grandes proporções e tem participação essencial em  
412 processos metabólicos como fotossíntese e respiração, enquanto os metabólitos  
413 secundários são sintetizados em menores quantidades, atuam principalmente na defesa  
414 contra patógenos, respostas a estresses e são fundamentais para interação planta-  
415 ambiente (Erb & Kliebenstein, 2020; Pang *et al.*, 2021).

416 Os metabólitos secundários são amplamente usados em agroquímicos,  
417 suplementos alimentares, fármacos e cosméticos (Ramakrishna & Ravishankar, 2011).  
418 O aumento do valor econômico de plantas medicinais e, conseqüentemente, sua maior  
419 procura, tem levado ao desaparecimento em seus habitats naturais; isto, somado com as  
420 mudanças climáticas e instabilidades geopolíticas, tem dificultado a obtenção de  
421 compostos derivados de plantas (Chen *et al.*, 2016).

422 A cultura de tecidos vegetais pode ser uma ferramenta importante para atender a  
423 demanda existente por fitoquímicos. Além de eliminar barreiras geográficas e  
424 climáticas, permite o cultivo em larga escala independente da época do ano e fornece  
425 um ambiente favorável para o desenvolvimento (Karuppusamy, 2009; Evans *et al.*,  
426 2020; Twaij, 2020).

427 *Pfaffia glomerata* é uma planta medicinal pertencente à família Amaranthaceae,  
428 conhecida popularmente por fáfia ou ginseng brasileiro. Suas propriedades medicinais e  
429 uso potencial na indústria cosmética e farmacêutica, se dá principalmente pela presença  
430 do composto 20-hidroxiecdisona (20E), um fitoquímico análogo ao hormônio que  
431 controla a ecdise em insetos (Schmelz *et al.*, 1998; Dinan, 2001; Nascimento *et al.*,  
432 2007; Festucci-Buselli *et al.*, 2008a; Festucci-Buselli *et al.*, 2008b; Caleffi *et al.*, 2015).

433 Estudos em mamíferos, têm sugerido que o 20E pode desempenhar um papel no  
434 sistema nervoso central, auxiliando no tratamento de transtornos mentais, melhorando o  
435 comprometimento cognitivo e apresentando benefícios contra lesões cerebrais, além de  
436 inibir a produção de espécies reativas de oxigênio e espécies nitrosas, ter uma ação  
437 antioxidante e reduzir o estresse, ansiedade e depressão, auxiliar no tratamento de  
438 doenças neuromusculares, cardiometabólicas e respiratórias (De-Paris *et al.*, 2000; Vigo

439 *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014b; Xia *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2021;  
440 Dinan *et al.*, 2021).

441 Apesar de o 20E apresentar um grande potencial farmacológico, sua rota  
442 biossintética ainda não foi completamente elucidada. Batista *et al.* (2018) realizaram o  
443 sequenciamento *de novo* do transcriptoma da *P. glomerata* e observaram que  
444 possivelmente a expressão do gene *Phantom* (CYP76C) esteja envolvida com a síntese  
445 de 20E dessa espécie. Com isso, novas perspectivas se abrem para análise da via  
446 biossintética de 20E e compreensão do metabolismo secundário em *P. glomerata*. A  
447 utilização de elicitores pode ser um ponto chave para esses estudos.

448 Outro composto presente em plantas de *P. glomerata* são as antocianinas,  
449 metabólito pertencente ao grupo dos flavonoides, relacionado com a reprodução e  
450 proteção das plantas a estresses ambientais (Pervaiz, 2017; Gould, 2018). Alterações  
451 ambientais, tais como a qualidade da luz (Silva *et al.*, 2019), irradiância luminosa (Silva  
452 *et al.*, 2021) e fotoperíodo (Fortini *et al.*, 2020) podem modular a biossíntese de  
453 antocianinas em *P. glomerata*,

454 Felipe *et al.* (2019a) estudaram o efeito da radiação UV-B (280-360 nm) em dois  
455 acessos (22 e 43) de *P. glomerata* contrastantes na produção de antocianinas.  
456 Observaram que as plantas com baixo teor de antocianinas (acesso 22) tiveram um  
457 incremento de 20E após exposição à radiação UV-B, em contrapartida, não houve  
458 alteração no teor de antocianinas em plantas que produzem naturalmente maior  
459 quantidade desse composto (acesso 43). Possivelmente, a alta concentração de  
460 antocianinas em plantas do acesso 43 auxiliou na atenuação dos efeitos nocivos da  
461 radiação UV, enquanto as plantas do acesso 22 foram mais responsivas aos efeitos  
462 deletérios da radiação UV, o que resultou no aumento da produção de 20E. Outros  
463 elicitores podem influenciar no metabolismo de antocianinas, como já visto por Ai &  
464 Zhu (2018) e Li *et al.* (2020), que verificaram diminuição significativa nos níveis de  
465 antocianinas em plantas de *Arabidopsis thaliana* após aplicação de melatonina.

466 Elicitores são compostos químicos oriundos de fontes abióticas e bióticas que  
467 geram respostas nas plantas, podendo afetar o crescimento e desenvolvimento, a síntese  
468 e o acúmulo de metabólitos. Fatores como o tipo do elicitor, a concentração e a forma  
469 de aplicação, determinam os efeitos na produção de metabólitos e influenciam na  
470 produção de biomassa (Naik & Al-Khayri, 2016).

471 A melatonina está presente na maioria das plantas, sendo importante para o  
472 crescimento, desenvolvimento, senescência e respostas ao estresse (Wang *et al.*, 2018a;

473 Zhan *et al.*, 2019). É uma molécula conhecida como potente antioxidante, reduzindo a  
474 peroxidação lipídica e aliviando o estresse oxidativo (Reiter *et al.*, 2015; Fan *et al.*,  
475 2018). Pode atuar como hormônio, regulando o crescimento de ramos e raízes (Arnao &  
476 Hernández-Ruiz, 2017), além de influenciar no comportamento de vários outros  
477 hormônios, como auxina, ácido jasmônico, ácido abscísico, ácido salicílico,  
478 brassinosteróide e etileno (Arnao & Hernández-Ruiz, 2018, Lee & Back, 2018; 2019;  
479 Zhang *et al.*, 2019).

480 A melatonina é uma molécula multifuncional ativa em diversos processos  
481 metabólicos, podendo regular o metabolismo primário e modular a concentração de  
482 carboidratos (Zhao *et al.*, 2015a; Kobylíňska *et al.*, 2018). Ainda influencia na  
483 eficiência fotossintética (Lin *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2022). Além disso, a melatonina  
484 pode atuar na regulação de diversos metabólitos secundários, estimulando o acúmulo de  
485 antocianinas, como observado em repolho (Zhang *et al.*, 2016), ou a redução do teor  
486 deste pigmento, atestado em *Arabidopsis* (Ai & Zhu, 2018; Li *et al.*, 2020).

487 Ai & Zhu (2018) mostraram que a melatonina exerceu papel negativo no  
488 metabolismo de antocianinas em plantas de *Arabidopsis thaliana*, antagonizando a  
489 síntese desencadeada por jasmonato. Ademais, outros trabalhos têm mostrado que o  
490 jasmonato pode estar relacionado com a sinalização da via de biossíntese de 20E em  
491 plantas (Wang *et al.* 2014a; John *et al.* 2018; Erst *et al.* 2019; Fortini *et al.* 2022).

492 Tendo em vista que a melatonina pode ser uma importante molécula de  
493 sinalização, integrando várias vias do metabolismo secundário em plantas e podendo  
494 atuar na modulação da biossíntese de vários compostos, esse trabalho teve como  
495 objetivo avaliar o efeito da aplicação de diferentes concentrações de melatonina no  
496 desenvolvimento e na produção de antocianinas e 20E em plantas de *P. glomerata*  
497 cultivadas *in vitro*.

## 498 MATERIAL E MÉTODOS

### 499 Crescimento das plantas e desenho experimental

500 As plantas de *P. glomerata* utilizadas nesse trabalho foram provenientes do  
501 banco de germoplasma *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT),  
502 localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da  
503 Universidade Federal de Viçosa (UFV).

504 Segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de *P. glomerata* (acesso 43), foram  
505 obtidos de plantas com 30 dias de cultivo e transferidos para frascos de vidro contendo  
506 80 mL de meio de cultura semissólido constituído pelos sais e vitaminas MS  
507 (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>) e 3% de  
508 sacarose (m/v), solidificado com 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (PhytoTechnology Laboratories®,  
509 Kansas, United States) e pH 5,7 ± 0,1, autoclavado durante 20 min, a 121°C e pressão  
510 de 1,5 atm. Para condução do experimento, após os meios de cultura serem  
511 autoclavados, foram adicionados diferentes concentrações de melatonina (0, 10, 100,  
512 500 e 1000 µM); Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA).

513 Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno com dois  
514 orifícios de 10 mm cobertos por membranas fluoroporos hidrofóbicas (PTFE, MilliSeal  
515 AVS-045 Air Vent) de 0,45 µm de poros, que permitem taxa de troca de CO<sub>2</sub> de 25 µL  
516 L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Batista *et al.*, 2017) e mantidos por 35 dias em sala de crescimento com  
517 fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  
518 fornecida por duas lâmpadas LEDs (SMD 100, 18W, Vilux®, Vitória, ES, Brasil).

519 O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5  
520 tratamentos (diferentes concentrações de melatonina), com 10 repetições cada. Cada  
521 unidade experimental foi constituída por um frasco contendo três segmentos nodais.

### 522 Variáveis de crescimento

523 Foram avaliadas as seguintes variáveis de crescimento: massa seca (g),  
524 comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm) e área  
525 foliar (cm<sup>2</sup>). Para determinação da área foliar, as folhas foram destacadas e fixadas em  
526 papel branco, fotografadas com câmera digital e as imagens processadas no programa  
527 ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). O material vegetal foi mantido em estufa a 50 °C por  
528 72 horas para obtenção da massa seca.

## 529 **Extração metanólica para análises bioquímicas**

530 Amostras de folhas e raízes foram coletadas em nitrogênio líquido, maceradas,  
 531 liofilizadas e submetidas à extração metanólica (Lisec *et al.*, 2006). Foram adicionados  
 532 700 µL de metanol aos microtubos contendo aproximadamente 10 mg do material  
 533 vegetal e mantidos em um recipiente com água quente. As amostras foram  
 534 homogeneizadas e incubadas a 80 °C sob agitação de 400 ×g, por 20 min, em seguida,  
 535 foram centrifugadas a 12.000 ×g, por 15 min e temperatura de 4 °C. Todo sobrenadante  
 536 foi transferido para novos microtubos, sendo que, uma alíquota de 150 µL foi retirada  
 537 para leitura de pigmentos fotossintéticos. Foram adicionados 375 µL de clorofórmio e  
 538 750 µL de água ultrapura ao sobrenadante restante, as amostras foram homogeneizadas  
 539 e centrifugadas a 12.000 ×g, a 4 °C por 10 min, a fase aquosa superior e incolor (extrato  
 540 metanólico) foi transferida para novos microtubos e utilizada para determinação de  
 541 açúcares e aminoácidos. O precipitado resultante da extração metanólica foi submetido  
 542 a duas lavagens com álcool etílico 70% e posteriormente utilizado para determinação  
 543 dos teores de amido e proteína.

## 544 **Teor de pigmentos fotossintéticos e de antocianinas**

545 Em microplacas de 96 poços foram adicionados 25 µL do extrato metanólico e  
 546 175 µL de metanol e feitas leituras em um leitor de microplacas (OptiMax Tunable  
 547 Microplate Reader) nos comprimentos de onda 470, 666 e 653 nm correspondendo,  
 548 respectivamente, a carotenoides, clorofila *a* (Chl *a*) e clorofila *b* (Chl *b*). Os cálculos  
 549 foram feitos com as fórmulas, descritas por Wellburn (1994):

$$550 \text{ Clorofila } a = (15,65 \times A_{666}) - 7,34 \times A_{653}$$

$$551 \text{ Clorofila } b = (27,05 \times A_{653}) - (5,03 \times A_{666})$$

$$552 \text{ Carotenoides} = \frac{(1000 \times A_{470}) - (2,86 \times \text{Clorofila } a) - (129,2 \times \text{Clorofila } b)}{221}$$

553 O teor de antocianinas foi determinado utilizando a metodologia proposta por  
 554 Neff & Chory (1998). Amostras com aproximadamente 10 mg de material macerado e  
 555 liofilizado de folhas foram acrescidas de 300 mL de metanol acidificado (1% HCl p/v) e  
 556 incubadas overnight sob agitação à temperatura ambiente. Para separar a fase de  
 557 clorofilas das antocianinas, foram adicionados 200 µL de água destilada e 500 µL de  
 558 clorofórmio e, então, a solução foi vortexada e centrifugada em 14000 ×g por 5 min.  
 559 Para montagem da placa foi coletado 200 µL da porção superior da solução. As leituras

560 foram realizadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 530 ( $A_{530}$ ) e 657  
561 ( $A_{657}$ ) nm. O conteúdo relativo de antocianinas foi obtido pela subtração de  $A_{657}$  em  
562  $A_{530}$ .

### 563 **Teor de açúcares, aminoácidos, proteínas e amido**

564 Os teores dos açúcares glicose, frutose e sacarose e o teor de amido foram  
565 determinados seguindo a metodologia descrita por Fernie *et al.* (2001). Já o conteúdo de  
566 proteínas e aminoácidos foram quantificados pelo método descrito por Cross *et al*  
567 (2006).

568 Para determinação dos açúcares, em cada poço de uma microplaca foram  
569 adicionados 160  $\mu\text{L}$  do meio de reação (HEPES/KOH 100 mM com  $\text{MgCl}_2$  3 mM pH 7,  
570 ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato -  
571 G6PDH (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ )), 25  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico e 25  $\mu\text{L}$  de metanol. No leitor de  
572 microplacas foram realizadas leituras sob absorbâncias de 340 nm com intervalos de 1  
573 min entre as leituras. Após a estabilização da densidade ótica (OD) foram adicionados 5  
574  $\mu\text{L}$  das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U  
575 por reação) e invertase (5 U por reação), com intervalo aproximado de 30 min entre  
576 cada aplicação.

577 O teor de aminoácidos foi determinado adicionando em uma microplaca 30  $\mu\text{L}$   
578 do extrato metanólico, 20  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, 50  $\mu\text{L}$  de tampão citrato pH 5,2 acrescido  
579 de ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100  $\mu\text{L}$  de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v),  
580 em cada poço. A microplaca foi incubada a 95 °C no escuro por 20 min e,  
581 posteriormente, foi feita leitura no comprimento de onda de 570 nm. A curva de  
582 calibração foi feita utilizando leucina como padrão.

583 Determinou-se o conteúdo de proteínas ressuspendendo o precipitado resultante  
584 da extração metanólica em 400  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1 M. Os microtubos foram  
585 homogeneizados e incubados por 1 h a 95 °C e sob agitação de 400  $\times g$ , em seguida,  
586 centrifugados a 12000  $\times g$ , a 4 °C por 10 min. Foi retirada uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do  
587 sobrenadante e adicionada em microplaca contendo 180  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford  
588 (diluição 1:5 do reagente) em cada poço. Foi feita leitura no comprimento de onda de  
589 595 nm. A curva de calibração foi feita utilizando albumina sérica bovina (BSA) como  
590 padrão.

591 O teor de amido foi determinado adicionando 70  $\mu\text{L}$  de ácido acético 1 M, a fim  
592 de condicionar um pH ótimo para a reação, nos tubos contendo o precipitado resultante

593 da extração metanólica e NaOH 0,1M. Foi retirada uma alíquota de 40 µL da suspensão  
 594 e colocada em uma microplaca com 60 µL do mix de hidrólise do amido (composto  
 595 pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades µL<sup>-1</sup>) e α-amilase (0,01 U µL<sup>-1</sup>). A  
 596 microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425<sup>®</sup>) e deixada over night em  
 597 estufa a 37 °C. O extrato hidrolisado (25 µL) foi transferido para uma nova microplaca  
 598 contendo 25 µL de metanol e 160 µL da reação composta por tampão HEPES/KOH 1M  
 599 pH 7,0 MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM e 56 unidades G6PDH (0,7  
 600 unidades µL<sup>-1</sup>) por poço. No leitor de microplacas as amostras foram lidas a 340 nm de  
 601 absorvância, com intervalo de 1 min entre as leituras. Uma vez estabilizado a OD,  
 602 adicionou-se 2 µL de hexocinase (2 unidades por reação) em cada poço. Para cálculo do  
 603 conteúdo de açúcares e amido foi utilizada a equação de Lambert-Beer:

$$604 \quad \text{NADPH } (\mu\text{mol}) = \frac{\Delta\text{OD}}{2,85 \times 6,22}$$

#### 605 **Conteúdo de prolinas**

606 A determinação do conteúdo de prolinas seguiu a metodologia proposta por  
 607 Bates *et al.* (1973). Adicionou-se em uma microplaca 50 µL do extrato metanólico e  
 608 100 µL de niidrina ácida (Niidrina 1% (m/v) em ácido acético 60% (v/v) e etanol  
 609 20%(v/v)). A microplaca foi vedada com fita de alumínio e incubada a 95 °C por 20  
 610 min. Foi feita leitura no comprimento de onda de 520 nm e a curva de calibração foi  
 611 feita utilizando solução padrão de prolina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### 612 **Quantificação de enzimas do estresse oxidativo**

613 Foram quantificadas as enzimas Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), Peroxidase do  
 614 Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e  
 615 Peroxidase oxidoreductase (POD, EC1.11.1.7). 50 mg de material fresco da parte aérea  
 616 foram homogeneizados, com 1 mL do meio de extração (tampão fosfato de potássio a  
 617 0,1 M, pH 6.8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0.1 mM; fluoreto de  
 618 fenilmetilsulfônico (PMSF) a 1 mM e PVPP 1% (p/v). Foi realizada centrifugação a  
 619 10.000 ×g durante 15 min a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático  
 620 bruto.

621 Para a determinação da atividade da CAT foram adicionados 20 µL do extrato a  
 622 200 µL de meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM)  
 623 em microplaca (Havir & McHale, 1987). A leitura foi realizada no comprimento de

624 onda de 240 nm por 1 min (a cada 10 s), e o cálculo da atividade enzimática dado pelo  
625 decréscimo da absorbância.

626 A atividade da APX (Nakano & Asada, 1981) foi determinada através do  
627 acréscimo do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, ácido  
628 ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM) em 20 µL do extrato na  
629 microplaca. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em comprimento de onda de  
630 290 nm durante 1 min.

631 Determinou-se a atividade da SOD de acordo com protocolo descrito por  
632 Giannopolities & Ries (1977), a partir da adição de 2,97 mL de meio de reação  
633 (Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio  
634 (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e Riboflavina 2 µM) e 30 µL do extrato bruto em  
635 microplaca. A microplaca com as amostras foi mantida a 25 °C por 5 min em câmara de  
636 reação (iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W). Após este tempo, a placa foi  
637 retirada da iluminação e a reação interrompida. Foi feita leitura em comprimento de  
638 onda de 560 nm e a absorbância incrementada pela produção da coloração azul durante  
639 a reação, o valor de absorbância foi subtraído do branco, que não possuía extrato  
640 enzimático.

641 A atividade da POD foi determinada de acordo com Chance & Maehly (1955).  
642 Para tal, o meio de reação (13 mM guaiacol, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 mM, Na-phosphate pH  
643 6.5) foi acrescentado ao extrato bruto e a leitura foi realizada à 470 nm por 1 min.

#### 644 **Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio**

645 A determinação da peroxidação lipídica ocorreu a partir da quantificação dos  
646 teores de malonodialdeído (MDA), utilizando a metodologia proposta por Heath &  
647 Packer (1968), com modificações. Para a extração, foram acrescentados 500 µL de  
648 ácido tricloroacético 1% (TCA) em 50 mg de material vegetal fresco e macerado. A  
649 solução foi vortexada e centrifugada a 12.000 × g por 15 min a 4 °C. Em seguida, 250  
650 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, juntamente com 750 µL de  
651 ácido 2-tiobarbitúrico 0.5 % (TBA; p/v) em TCA 20% (p/v). A reação ocorreu por  
652 incubação em agitação a 95 °C durante 30 min; passado este tempo, a reação foi  
653 interrompida transferindo os tubos de reação para banho de gelo. Os sobrenadantes  
654 foram transferidos para novos tubos e centrifugados (10.000 ×g, 10 min, 4 °C), a leitura  
655 foi realizada em espectrofotômetro a 532 (A<sub>532</sub>) e 600 (A<sub>600</sub>) nm. A concentração de

656 MDA foi dada pela subtração da  $A_{600}$  pela  $A_{532}$ , e calculada de acordo com o coeficiente  
657 de extinção de  $155 \text{ mM cm}^{-1}$ .

658 O teor de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi determinado de acordo com a  
659 metodologia de Velikova *et al.* (2000). Para a extração, foram adicionados  $500 \mu\text{L}$  de  
660 ácido tricloroacético 0,1% (TCA) em  $50 \text{ mg}$  de material vegetal fresco e macerado. A  
661 solução foi vortexada e centrifugada a  $14000 \times g$  por  $15 \text{ min}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em microplacas,  
662 foram adicionados  $20 \mu\text{L}$  do sobrenadante,  $80 \mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio ( $10$   
663  $\text{mM}$  e  $\text{pH } 7,0$ ) e  $100 \mu\text{L}$  de iodeto de potássio ( $1 \text{ M}$ ). A reação ocorreu por incubação no  
664 escuro por  $45 \text{ min}$  e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a  $390 \text{ nm}$ . O teor de  
665  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi calculado com base em curva padrão.

#### 666 **Quantificação do 20-hidroxiecdisona**

667 Utilizou-se para quantificação do 20E uma metodologia proposta por Kamada *et*  
668 *al.* (2009). O extrato metanólico foi preparado conforme descrito por Côrrea *et al.*  
669 (2015) e a quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência  
670 (HPLC) em aparelho Shimadzu SPD-10Avp (Kyoto, Japão) equipado com coluna RP  
671 ( $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm i.d.}$ ,  $5 \mu\text{m}$  de tamanho de partículas; Fase estacionária C18) de  
672 Phenomenex (Torrance, CA, EUA) e um Shimadzu SPD-M20A detector de matriz  
673 fotodiodo (monitoramento  $246 \text{ nm}$ ). A fase móvel consistiu em água ultrapura (solvente  
674 A) e metanol de grau LC (solvente B). O perfil de gradiente utilizado foi:  $0\text{-}8\text{min}$ :  $50\%$   
675 B;  $8\text{-}13 \text{ min}$ :  $50\text{-}95\%$  B. Todas as análises foram realizadas a uma taxa de fluxo de  $1,0$   
676  $\text{mL min}^{-1}$ , a  $40^\circ\text{C}$ . O volume de amostra injetado foi de  $20 \mu\text{L}$ , com duração de  $15 \text{ min}$ .  
677 A curva de calibração foi obtida injetando-se soluções padrão de 20E (Sigma-Aldrich,  
678 St. Louis, MO, EUA) preparadas em metanol de grau HPLC ( $0$  a  $120 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 679 **Determinação do perfil hormonal**

680 A determinação dos níveis hormonais foi realizada de acordo com Forcat *et al.*  
681 (2008). Aproximadamente  $100 \text{ mg}$  de amostras foliares foram macerados em nitrogênio  
682 líquido e adicionados  $300 \mu\text{L}$  de solução extratora (metanol:isopropanol:ácido acético  
683  $20:79:1$ ) em microtubo de  $1,5 \text{ mL}$ . As amostras foram agitadas em vórtex ( $4$  vezes por  
684  $20 \text{ s}$ ), sonicadas por  $5 \text{ min}$  e mantidas no gelo por  $30 \text{ min}$ . Após a centrifugação ( $13.000$   
685  $\times g$ ,  $10 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ ), foram coletados  $250 \mu\text{L}$  do sobrenadante e transferidos para um  
686 novo microtubo. O processo de extração foi repetido sob o *pellet* resultante, e o  
687 sobrenadante foi coletado e adicionado ao anterior.

688 O perfil hormonal foi determinado por LC-MS/MS (Agilent 1200 Infinity  
689 Series) acoplado ao espectrômetro de massa tipo triplo quadrupolo- QqQ (6430 Agilent  
690 Technologies). A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se à coluna Zorbax  
691 Eclipse Plus C18 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda  
692 Zorbax SB-C18, 1,8  $\mu\text{m}$  (Agilent). Uma curva de calibração (0,1 ng a 200 ng) utilizando  
693 os respectivos padrões de cada hormônio foi realizada para obtenção da quantificação  
694 absoluta. Os dados gerados foram analisados no *software* MassHunter Workstation para  
695 obtenção da área dos picos de cada hormônio nas amostras e os resultados estão  
696 expressos em ng/g de tecido fresco.

#### 697 **Análises estatísticas**

698 As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz,  
699 2016). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste F e  
700 as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 701 **RESULTADOS**

### 702 **Concentrações elevadas de melatonina levam à redução no desenvolvimento de** 703 **plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro***

704 No presente estudo, foram analisados os efeitos de diferentes concentrações de  
705 melatonina sob o desenvolvimento de plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro*  
706 (Figuras 1 e 2). A elicitação com concentrações de melatonina de 500  $\mu\text{M}$  levou a uma  
707 redução de 27,5% e de 1000  $\mu\text{M}$  levou a uma redução de 50% no acúmulo de biomassa  
708 das plantas (Figuras 3A, 3B e 3C), quando comparados ao controle.

709 As concentrações mais altas de melatonina (500 e 1000  $\mu\text{M}$ ) também afetaram  
710 negativamente o crescimento das plantas, levando à redução do comprimento do caule  
711 (cerca de 15% e 40%, respectivamente) e da raiz (aproximadamente 25% e 50%,  
712 respectivamente) (Figuras 3E e 3F). Além disso, plantas cultivadas em 10  $\mu\text{M}$  de  
713 melatonina apresentaram as maiores médias de área foliar, enquanto os menores valores  
714 foram de plantas elicidadas com a concentração mais elevada (Figura 3D).

### 715 **Melatonina influencia os teores de pigmentos**

716 Os teores de Chl *a* e Chl total (Figuras 4A e 4C) foram significativamente  
717 menores nos tratamentos com 10 e 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina (cerca de 25%), quando  
718 comparado com os demais tratamentos. Independente da concentração de melatonina, a  
719 elicitação também levou a uma redução nos teores de Chl *b* e carotenoides, comparado  
720 ao controle (Figuras 4B e 4E). Além disso, a partir de 100  $\mu\text{M}$  de melatonina, à medida  
721 que a concentração do elicitor aumentou, o conteúdo de antocianinas nas plantas  
722 elicidadas diminuiu significativamente (Figura 4F).

### 723 **Metabolismo primário de *P. glomerata* é afetado pela elicitação com melatonina**

724 Os teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e amido foram afetados pelo  
725 acréscimo de melatonina ao meio de cultura. Observamos uma redução significativa nos  
726 teores de glicose (aproximadamente 55%) e frutose (aproximadamente 70%) nas folhas  
727 (Figuras 5A e 5C) quando aplicado uma concentração de 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina.  
728 Nas raízes (Figuras 5B e 5D), os teores mais elevados de glicose e frutose foram  
729 observados em plantas elicidadas com 10 e 100  $\mu\text{M}$ , comparadas aos demais  
730 tratamentos.

731 Comparada ao controle, as folhas de plantas elicitadas com 100  $\mu\text{M}$  de  
732 melatonina (Figura 5E) apresentaram incremento no conteúdo de sacarose (cerca de  
733 37%). Houve aumento significativo no teor de sacarose das raízes (Figura 5F), à  
734 proporção que se aumentou as concentrações de melatonina. O acúmulo de amido nas  
735 folhas foi menor (aproximadamente 40%) nos tratamentos com 10 e 500  $\mu\text{M}$  de  
736 melatonina (Figura 5G). Por outro lado, o maior conteúdo de amido foi observado em  
737 raízes de plantas elicitadas com 10  $\mu\text{M}$  de melatonina (Figura 5H).

#### 738 **Aplicação de 1000 $\mu\text{M}$ de melatonina aumentou a concentração de aminoácidos,** 739 **prolina e proteínas em raízes de *P. glomerata***

740 A elicitação com melatonina não afetou o conteúdo de aminoácidos, prolina e  
741 proteínas nas folhas (Figuras 6A, 6C e 6E). Por outro lado, as raízes de plantas  
742 elicitadas com 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina produziram a maior quantidade destes  
743 metabólitos (Figuras 6B, 6D e 6F).

#### 744 **Melatonina afetou a atividade das enzimas do estresse oxidativo**

745 A atividade das enzimas CAT, APX e POD foi maior em raízes de *P. glomerata*  
746 elicitadas com as doses mais elevadas de melatonina (500 e 1000  $\mu\text{M}$ ) (Figuras 7B, 7D  
747 e 7F), em comparação com o controle (meio isento de melatonina). Nas folhas, a  
748 elicitação com melatonina levou a uma redução na atividade da APX (Figura 7C). Além  
749 disso, plantas elicitadas com 500  $\mu\text{M}$  de melatonina apresentaram maior atividade da  
750 CAT nas folhas (Figura 7A).

#### 751 **Teores de MDA e $\text{H}_2\text{O}_2$ foram afetados pela aplicação de melatonina**

752 Os teores de MDA nas folhas diminuíram em resposta à elicitação com  
753 concentrações superiores à 100  $\mu\text{M}$  de melatonina (Figura 8A). Nas raízes, o maior  
754 conteúdo de MDA foi obtido no tratamento com 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina (Figura 8B).  
755 Além disso, à medida que as plantas foram elicitadas com concentrações maiores de  
756 melatonina, incrementou os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  das folhas e decresceu nas raízes (Figuras  
757 8C e 8D).

#### 758 **Elicitação com baixa concentração de melatonina induz o acúmulo de 20E em** 759 **folhas de *P. glomerata***

760 A elicitação com melatonina afetou a produção de 20E em folhas de *P.*  
761 *glomerata*, sendo essa influência dependente da concentração do elicitor. Concentrações  
762 menores de melatonina (10  $\mu\text{M}$ ) incrementaram o acúmulo de 20E (cerca de 30%), em  
763 relação ao controle. Por outro lado, a elicitação com 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina  
764 levou à redução de cerca de 30% e 60%, respectivamente, dos teores de 20E quando  
765 comparadas ao controle (Figura 9).

#### 766 **Melatonina induz alterações nos níveis de fitohormônios**

767 A adição de melatonina ao meio de cultura alterou a concentração de  
768 fitohormônios nas plantas de *P glomerata* (Figura 10), sendo observada a redução no  
769 conteúdo de ABA em plantas cultivadas sob 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina (40 e 54%,  
770 respectivamente) (Figura 10A). Por outro lado, evidenciou-se um aumento nos teores de  
771 ACC (4 vezes em 100  $\mu\text{M}$  de melatonina; Figura 10C), Zea (6 e 8 vezes em 500  $\mu\text{M}$  e  
772 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina, respectivamente; Figura 10D) e MeJa (1,5 vezes em 1000  $\mu\text{M}$   
773 de melatonina; Figura 10E). Contudo, a elicitação com melatonina não afetou de forma  
774 significativa os conteúdos de AIA, GA<sub>3</sub> e BR (Figuras 10B, 10F e 10G).

775 **DISCUSSÃO**

776 A melatonina pode atuar como modulador do crescimento e desenvolvimento  
777 das plantas, sendo a concentração, um fator chave para aumentar ou reduzir o tamanho  
778 das raízes, do caule e o acúmulo de biomassa (Arnao & Hernández-Ruiz, 2017; Wang *et*  
779 *al.*, 2018a). No presente estudo, as concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  de melatonina não  
780 induziram diferenças significativas na massa seca e no comprimento do caule e raiz de  
781 *P. glomerata*. No entanto, plantas expostas a altas concentrações de melatonina (500 e  
782 1000  $\mu\text{M}$ ) apresentaram drástica redução da biomassa e do comprimento do caule e da  
783 raiz (Figura 3).

784 Resultados semelhantes foram observados em *Lupinus albus*, *Arabidopsis*  
785 *thaliana*, *Zea mays* e *Glycine max*, que mostraram que altas concentrações de  
786 melatonina afetam adversamente o crescimento da planta (Hernández-Ruiz *et al.*, 2004;  
787 Bajwa *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015b). Nas raízes, alta concentração  
788 de melatonina também tem um efeito inibitório no crescimento, como observado em  
789 *Brassica juncea*, *Prunus avium x Prunus cerasus*, *Helianthus annuus*, *Solanum*  
790 *lycopersicum* e em algumas espécies de monocotiledôneas (Hernández-Ruiz *et al.*,  
791 2005; Chen *et al.*, 2009; Sarropoulou *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014; Wen *et al.*,  
792 2016; Liang *et al.*, 2017).

793 A elicitação com melatonina levou à redução nos teores de pigmentos em *P.*  
794 *glomerata* (Figura 4). Altas concentrações de melatonina podem causar peroxidação dos  
795 cloroplastos, prejudicando sua estrutura e funções, além de ter ação enzimática na  
796 degradação de clorofilas e carotenoides (Arnao & Hernández-Ruiz, 2009; Sarropoulou  
797 *et al.*, 2012). O papel negativo da melatonina no metabolismo de antocianinas em *P.*  
798 *glomerata* corroboram com os achados em plantas de *A. thaliana* (Ai & Zhu, 2018; Li *et*  
799 *al.*, 2020). De acordo com Ai & Zhu (2018), a melatonina não afeta o catabolismo, mas  
800 atua na supressão da produção de dihidro-kaempferol, importante precursor da síntese  
801 de antocianinas.

802 Observamos que plantas de *P. glomerata* tratadas com 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de  
803 melatonina reduziram a produção de glicose e frutose nas folhas, enquanto o tratamento  
804 com 10 e 100  $\mu\text{M}$  de melatonina estimulou a biossíntese e/ou acúmulo desses dois  
805 açúcares nas raízes (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D). Já o teor de sacarose foi superior nas  
806 folhas de *P. glomerata* tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de melatonina; enquanto que a  
807 concentração deste carboidrato nas raízes elevou-se conforme aumentou a quantidade de

808 melatonina acrescida no meio de cultura (Figuras 5E e 5F). Foi relatado maior acúmulo  
809 de sacarose em folhas e raízes de mudas de *A. thaliana* tratadas com melatonina, sendo  
810 que nas raízes, o teor de sacarose foi 16 vezes maior comparadas com plantas controle  
811 (Zhao *et al.*, 2015a).

812 Corroborando com os achados do presente estudo, em plantas de *Zea mays*, 10 e  
813 100  $\mu\text{M}$  de melatonina elevou o teor de sacarose nas folhas e os teores de glicose e  
814 frutose nas raízes. O acúmulo em excesso de carboidratos em células fotossintéticas  
815 afetou negativamente a fotossíntese o que, conseqüentemente, resultou em um menor  
816 crescimento das plantas (Zhao *et al.*, 2015b). Melatonina também afetou os teores de  
817 açúcares em *Malus domestica*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinífera* e *Prunus avium* x  
818 *Prunus cerasus* (Sarropoulou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019; Zhong *et*  
819 *al.*, 2020). A melatonina pode regular a produção de triose fosfato no ciclo de Calvin,  
820 sua transformação em hexoses e o pool de amido no estroma cloroplástico e o de  
821 sacarose no citosol e nas paredes celulares (Arnao *et al.*, 2021).

822 A adição de melatonina gerou um aumento na atividade das enzimas do estresse  
823 oxidativo CAT, APX e POD (Figura 7B, 7D e 7F) e uma redução nos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$   
824 (Figura 8D) em raízes de *P. glomerata*. Melatonina pode levar a um menor acúmulo de  
825  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células pela eliminação direta de radicais livres (Reiter *et al.*, 2007; Galano *et*  
826 *al.*, 2013) e por induzir a atividade de enzimas do estresse oxidativo eficientes na  
827 degradação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , principalmente CAT, APX e POD (Li *et al.*, 2012; Park *et al.*,  
828 2013). Também houve redução no conteúdo de ABA em plantas de *P. glomerata*  
829 tratadas com 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina. Li *et al.* (2015) demonstraram que  
830 melatonina regula negativamente genes de síntese e positivamente genes catabólicos de  
831 ABA, reduzindo seu conteúdo em plantas de *Malus prunifolia* e *Malus hupehensis*  
832 estressadas pela seca. O acúmulo de ABA em células vegetais está relacionado com a  
833 formação de ROS, portanto, quando um menor teor de ABA está disponível,  
834 conseqüentemente o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido (Liu *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011).

835 Além de funcionar como ativador de enzimas antioxidantes e proteger as plantas  
836 contra danos oxidativos, a melatonina pode diminuir a peroxidação lipídica das células  
837 vegetais, expressa pela redução significativa no teor de MDA das folhas em  
838 concentrações acima de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 8A). Resultados semelhantes foram obtidos em  
839 plantas de *Oryza sativa* (Han *et al.*, 2017) e *Glycine max* (Imran *et al.*, 2021), em que a  
840 aplicação de melatonina aumentou a atividade de enzimas antioxidantes e aliviou o  
841 acúmulo de ROS e MDA.

842 Em uma concentração de 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina, os teores de aminoácidos,  
843 prolina e proteínas foram aumentados em raízes de *P. glomerata*. O acúmulo de  
844 aminoácidos pode estar envolvido no ajuste osmótico, eliminação de radicais livres e  
845 manutenção de proteínas e da integridade de membrana (Keutgen & Pawelzik, 2008). A  
846 prolina é um importante aminoácido osmoprotetor, tem um papel essencial no  
847 metabolismo primário, atua na defesa antioxidante eliminando ROS e melhora a  
848 estabilidade das proteínas e a estrutura de membranas (Trovato *et al.*, 2019;  
849 Hosseinifard *et al.*, 2022). A melatonina aumentou o teor de prolina em mudas de  
850 tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Siddiqui *et al.*, 2019) e o teor de aminoácidos totais  
851 e prolina em *Moringa oleifera* (Sadak *et al.*, 2020), o que contribuiu para melhor  
852 tolerância ao estresse salino.

853 A melatonina pode atuar como hormônio e influenciar a concentração e  
854 atividade de outros hormônios (Arnao & Hernández-Ruiz, 2018). Neste trabalho,  
855 observamos que a melatonina elevou os teores de ACC, Zea e MeJa (Figura 10C, 10D e  
856 10E). Plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) superexpressoras de melatonina  
857 exibiram taxas de produção de ACC mais altas do que plantas controle, assim como em  
858 raízes e folhas de videiras (*Vitis vinifera*) tratadas com 50  $\mu\text{M}$  de melatonina (Xu *et al.*,  
859 2019). Melatonina também regulou positivamente o teor de Zea em plantas de *Carya*  
860 *cathayensis* (Sharma *et al.*, 2020), e de MeJa em *Solanum lycopersicum* (Liu *et al.*,  
861 2019), *Citrullus lanatus* (Li, *et al.*, 2021a) e *Triticum aestivum* (Luo *et al.*, 2023).

862 Nossos dados mostraram que a elicitação com 10  $\mu\text{M}$  de melatonina levou a um  
863 incremento de 30% no teor de 20E em plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro*. Em  
864 contrapartida, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina reduziram significativamente os teores de  
865 20E. É sabido que fatores como o tipo, concentração e a forma de aplicação de um  
866 elicitor são determinantes para sua atividade como estimulante ou inibidor da  
867 biossíntese de metabólitos (Naik & Al-Khayri, 2016). Felipe *et al.* (2019b) verificaram  
868 que uma concentração moderada (120 mM) de NaCl aumentou o conteúdo de 20E em  
869 folhas de *P. glomerata*, enquanto os outros tratamentos tiveram um teor de 20E  
870 semelhante quando comparado ao controle. Jafari & Shahsavari (2021) mostraram que a  
871 melatonina aumentou os níveis de metabólitos secundários em citros, mas o incremento  
872 de óleos essenciais foi mais significativo em plantas expostas a uma concentração  
873 intermediária de melatonina (100  $\mu\text{M}$ ).

874 Apesar de ter um grande potencial para indústria farmacêutica, a rota  
875 biossintética do 20E ainda não foi completamente elucidada. Estudos têm mostrado que

876 o jasmonato pode estar relacionado com a sinalização da via de biossíntese de 20E em  
877 plantas (Wang *et al.* 2014a; John *et al.* 2018; Erst *et al.* 2019; Fortini *et al.* 2022).  
878 Fortini *et al.* (2022) indicaram que a regulação negativa da biossíntese do jasmonato  
879 pode estar associada a redução nos teores de 20E em *P. glomerata*. Em nossos achados  
880 observamos que 1000  $\mu\text{M}$  de melatonina elevou o teor de MeJa e que concentrações  
881 mais baixas não afetaram a produção desse hormônio, ao mesmo tempo que, houve  
882 decréscimo na produção de 20E após aplicações acima de 500  $\mu\text{M}$  de melatonina. Nesse  
883 caso, jasmonato pode não ter influenciado na biossíntese de 20E.

884 O ABA é um hormônio que pode estar envolvido nas respostas de tolerância ao  
885 estresse, através da indução do fechamento estomático e da regulação da biossíntese de  
886 metabólitos secundários (Kushiro *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2017). Em cultura de  
887 células em suspensão de *Ajuga lobata*, o tratamento com ABA induziu maior acúmulo  
888 de 20E (Wang *et al.*, 2018b). A biossíntese de ABA pode ser regulada negativamente  
889 por moléculas tais como a melatonina, com consequente manutenção dos estômatos  
890 abertos e maior eficiência fotossintética (Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2021b). Nossos  
891 resultados mostraram que a elicitação com altas concentrações de melatonina leva a  
892 uma redução significativa nos níveis de ABA e de 20E, o que demonstra que a  
893 melatonina pode ter papel importante na regulação da rota de biossíntese desses  
894 compostos em *P. glomerata*.

895 Portanto, os resultados deste estudo evidenciam que a melatonina possui um  
896 papel significativo nas respostas fisiológicas e metabólicas de plantas de *P. glomerata*  
897 cultivadas *in vitro*. A melatonina demonstra ser uma molécula multifuncional,  
898 influenciando negativamente o desenvolvimento das plantas em concentrações elevadas,  
899 enquanto desencadeia respostas antioxidantes e modula o metabolismo primário e a  
900 biossíntese de 20E em concentrações específicas. Além disso, sua influência sobre  
901 hormônios chave no estresse sinaliza seu papel complexo na regulação do crescimento e  
902 da tolerância das plantas ao estresse. Este trabalho contribui para uma compreensão  
903 mais profunda da melatonina como uma molécula reguladora em plantas, destacando  
904 sua sensibilidade às concentrações e órgãos específicos.

905 **REFERÊNCIAS**

- 906 Ai, Y., Zhu, Z. (2018). Melatonin antagonizes jasmonate-triggered anthocyanin  
907 biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Agricultural and Food Chemistry,  
908 66(21): 5392–5400.
- 909 Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J. (2009). Protective effect of melatonin against  
910 chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. Journal of Pineal  
911 Research, 46(1), 58-63.
- 912 Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J. (2017). Growth activity, rooting capacity, and  
913 tropism: three auxinic precepts fulfilled by melatonin. Acta Physiologiae Plantarum  
914 39(6), 127.
- 915 Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J. (2018). Melatonin and its relationship to plant  
916 hormones. Annals of Botany, 121(2), 195-207.
- 917 Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J., Cano, A., Reiter, R. J. (2021). Melatonin and  
918 carbohydrate metabolism in plant cells. Plants, 10(9), 1917.
- 919 Bajwa, V. S., Shukla, M. R., Sherif, S. M., Murch, S. J., Saxena, P. K. (2014). Role of  
920 melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Pineal Research,  
921 56(3), 238-245.
- 922 Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for  
923 water-stress studies. Plant Soil 39:205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- 924 Batista, D. S., Dias, L. L. C., Rêgo, M. M. D., Saldanha, C. W., Otoni, W. C. (2017).  
925 Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of  
926 ornamental pepper explants. Ciência Rural 47:1–6.
- 927 Batista, D. S., Koehler, A. D., Romanel, E., de Souza, V. C., Silva, T. D., Almeida, M.  
928 C., Maciel, T. E. F., Ferreira, P. R. B., Felipe, S. H. S., Saldanha, C. W., Maldaner, J.,  
929 Dias, L. L. C., Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C. (2019). *De novo* assembly and  
930 transcriptome of *Pfaffia glomerata* uncovers the role of photoautotrophy and the P450  
931 family genes in 20-hydroxyecdysone production. Protoplasma, 256, 601-614.

- 932 Bhaskar, R., Xavier, L. S. E., Udayakumaran, G., Kumar, D. S., Venkatesh, R., Nagella,  
933 P. (2022). Biotic elicitors: A boon for the in-vitro production of plant secondary  
934 metabolites. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 149(1-2), 7-24.
- 935 Caleffi, E. R.; Krausová, G.; Hyršlová, I.; Paredes, L. L. R.; Dos Santos, M. M.;  
936 Sasaki, G. L.; Gonçalves, R. A. C.; De Oliveira, A. J. B. (2015). Isolation and prebiotic  
937 activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots.  
938 *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 392–399.
- 939 Chance, B., Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods*  
940 *Enzymology*, 2:764–775.
- 941 Chen, Q., Qi, W. B., Reiter, R. J., Wei, W., Wang, B. M. (2009). Exogenously applied  
942 melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of  
943 etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *Journal of Plant Physiology*, 166(3), 324-328.
- 944 Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., Steinmetz, A. (2016). Conservation  
945 and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese*  
946 *Medicine*, 11, 1-10.
- 947 Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H. K., Jenkins, G. I.,  
948 Tonelli, C. (2008). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to  
949 different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 165,  
950 886–894.
- 951 Corrêa, J. P. O., Vital, C. E., Pinheiro, M. V. M., Batista, D. S. Azevedo, J. F. L.,  
952 Saldanha, C. W., Cruz, A. C. F., DaMatta, F. M., Otoni, W. C. (2015). *In vitro*  
953 photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata*  
954 (Spreng.) Pedersen accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121:289–300.
- 955 Cross, J. M., Von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y.,  
956 Palacios, N., Stitt, M. (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24  
957 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*,  
958 142:1574–1588.
- 959 Cruz, C. D. (2016). Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and  
960 Selegen. *Acta Scientiarum Agronomy*, 38:547.

- 961 De-Paris, F., Neves, G., Salgueiro, J. B., Quevedo, J., Izquierdo, I., Rates, S. M. K.  
962 (2000). Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng.  
963 (Amaranthaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 261-269.
- 964 Dinan, L. (2001) Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57:325–339.
- 965 Dinan, L., Dioh, W., Veillet, S., Lafont, R. (2021). 20-Hydroxyecdysone from plant  
966 extracts to clinical use: therapeutic potential for the treatment of neuromuscular, cardio-  
967 metabolic and respiratory diseases. *Biomedicines* 9(5): 492.
- 968 Erb, M., Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators,  
969 and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1),  
970 39-52.
- 971 Erst, A. A., Zibareva, L. N., Filonenko, E. S., Zheleznichenko, T. V. (2019) Influence of  
972 Methyl Jasmonate on production of ecdysteroids from hairy roots of *Silene linicola* C.C.  
973 Gmelin. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 45:920–926.
- 974 Evans, D. E., Coleman, J. O., Kearns, A. (2020). *Plant cell culture*. Taylor & Francis.
- 975 Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., Chen, L. (2018). Melatonin: a multifunctional factor in  
976 plants. *International Journal Molecular Sciences* 19: 1528.
- 977 Felipe, S. H. S., Batista, D. S., Chagas, K., Correia, L. N. F., Silva, T. D., Fortini, E. A.,  
978 Silva, P. O., Otoni, W. C. (2019a). Accessions of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*)  
979 with contrasting anthocyanin content behave differently in growth, antioxidative  
980 defense, and 20-hydroxyecdysone levels under UV-B radiation. *Protoplasma* 256(6):  
981 1557–1571.
- 982 Felipe, S. H. S., Batista, D. S., Vital, C. E., Chagas, K., Silva, P. O., Silva, T. D.,  
983 Fortini, E. A., Correia, L. N. F., Ávila, R. T., Maldaner, J., Festucci-Buselli, R. A.,  
984 DaMatta, F. M., Otoni, W. C. (2019b). Salinity-induced modifications on growth,  
985 physiology and 20-hydroxyecdysone levels in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata*  
986 (Spreng.) Pedersen]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 140, 43-54.
- 987 Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G., Kruger, N. J. (2001). Fructose 2,6-  
988 bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and

- 989 increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*,  
990 212:250–263.
- 991 Festucci-Buselli, R. A., Contim, L. A. S., Barbosa, L. C. A., Stuart, J., Otoni, W. C.  
992 (2008a). Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone –  
993 a review. *Botany* 86: 978 – 987.
- 994 Festucci-Buselli, R. A., Contim, L. A. S., Barbosa, L. C. A., Stuart, J., Otoni, W. C.  
995 (2008b). Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata*  
996 development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20:305–311.
- 997 Forcat, S., Bennett, M. H., Mansfield, J. W., Grant, M. R. (2008). A rapid and robust  
998 method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA  
999 in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods*, 4, 1-8.
- 1000 Fortini E. A., Batista D. S., Felipe S. H. S., Silva T. D., Correia L. N. F., Farias L. M.,  
1001 Faria D. V., Pinto V. B., Santa-Catarina C., Silveira V., De-la-Peña C., Castillo-Castro  
1002 E., Otoni W. C. (2022) Physiological, epigenetic, and proteomic responses in *Pfaffia*  
1003 *glomerata* growth in vitro under salt stress and 5-azacytidine. *Protoplasma*, 260(2), 467-  
1004 482. doi: 10.1007/s00709-022-01789-4.
- 1005 Fortini, E. A., Batista, D. S., de Castro, K. M., Silva, T. D., Felipe, S. H. S., Correia, L.  
1006 N. F., Chagas, K., Farias, L. M., Leite, J. P. V., Otoni, W. C. (2020). Photoperiod  
1007 modulates growth and pigments and 20-hydroxyecdysone accumulation in Brazilian  
1008 ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] grown in vitro. *Plant Cell, Tissue and*  
1009 *Organ Culture (PCTOC)*, 142(3), 595-611.
- 1010 Franco, R. R., Takata, L. A., Chagas, K., Justino, A. B., Saraiva, A. L., Goulart, L. R.,  
1011 Ávila, V. M. R., Otoni, W. C., Espindola, F. S., Silva, C. R. (2021). A 20-  
1012 hydroxyecdysone-enriched fraction from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen roots  
1013 alleviates stress, anxiety, and depression in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 267:  
1014 113599.
- 1015 Galano, A., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of  
1016 melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of Pineal Research*, 54:245–257.

- 1017 Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher  
1018 plants. *Plant Physiology* 59:309–14.
- 1019 Gould, K. S., Jay-Allemand, C., Logan, B. A., Baissac, Y., Bidel, L. P. (2018). When are  
1020 foliar anthocyanins useful to plants? Re-evaluation of the photoprotection hypothesis  
1021 using *Arabidopsis thaliana* mutants that differ in anthocyanin accumulation.  
1022 *Environmental and Experimental Botany* 154:11–24.
- 1023 Han, Q. H., Huang, B., Ding, C. B., Zhang, Z. W., Chen, Y. E., Hu, C., Zhou, L. J.,  
1024 Huang, Y., Liao, J. Q., Yuan, S., Yuan, M. (2017). Effects of melatonin on anti-  
1025 oxidative systems and photosystem II in cold-stressed rice seedlings. *Frontiers in Plant*  
1026 *Science*, 8, 785.
- 1027 Havir, E. A., McHale, N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of  
1028 multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450–5.
- 1029 Heath, R. L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics  
1030 and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*  
1031 125:189–198.
- 1032 Hernandez-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M. B. (2004). Melatonin: a growth-stimulating  
1033 compound present in lupin tissues. *Plants*, 220, 140-144.
- 1034 Hernández-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M. B. (2005). Melatonin acts as a growth-  
1035 stimulating compound in some monocot species. *Journal of Pineal Research*, 39(2), 137-  
1036 142.
- 1037 Hosseinifard, M., Stefaniak, S., Ghorbani Javid, M., Soltani, E., Wojtyła, Ł.,  
1038 Garnczarska, M. (2022). Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance  
1039 in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5186.
- 1040 Hu, J., Luo, C. X., Chu, W. H., Shan, Y. A., Qian, Z. M., Zhu, G., Yu, Y. B., Feng, H.  
1041 (2012). 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury  
1042 by scavenging free radicals and modulating NF- $\kappa$ B and JNK pathways. *Plos One*, 7(12),  
1043 e50764.

- 1044 Imran, M., Latif Khan, A., Shahzad, R., Aaqil Khan, M., Bilal, S., Khan, A., Kang, S.  
1045 M., Lee, I. J. (2021). Exogenous melatonin induces drought stress tolerance by  
1046 promoting plant growth and antioxidant defence system of soybean plants. *AoB Plants*,  
1047 13(4), plab026.
- 1048 Jafari, M., Shahsavar, A. (2021). The effect of foliar application of melatonin on  
1049 changes in secondary metabolite contents in two citrus species under drought stress  
1050 conditions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 692735.
- 1051 John, R., Shajitha, P.P., Devassy, A., Mathew, L. (2018). Effect of elicitation and  
1052 precursor feeding on accumulation of 20-hydroxyecdysone in *Achyranthes aspera* Linn.  
1053 cell suspension cultures. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24:275–284.
- 1054 Kamada, T., Picoli, E., Vieira, R., Barbosa, L. C. A., Cruz, C. D., Otoni, W. C. (2009).  
1055 Variation of morphological and physiological characters in natural populations of  
1056 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and their correlation with  $\beta$ -ecdysone production.  
1057 *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11(3): 247-256.
- 1058 Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites  
1059 from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants*  
1060 *Research*, 3(13), 1222-1239.
- 1061 Keutgen, A. J., Pawelzik, E. (2008). Contribution of amino acids to strawberry fruit  
1062 quality and their relevance as stress indicators under NaCl salinity. *Food Chemistry*,  
1063 111(3), 642-647.
- 1064 Kobylińska, A., Borek, S., Posmyk, M. M. (2018). Melatonin redirects carbohydrates  
1065 metabolism during sugar starvation in plant cells. *Journal of Pineal Research*, 64(4),  
1066 e12466.
- 1067 Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T.,  
1068 Hirai, N., Koshihara, T., Kamiya, Y., Nambara, E. (2004). The *Arabidopsis* cytochrome  
1069 P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The*  
1070 *EMBO Journal*, 23(7), 1647-1656.

- 1071 Lee, K., Back, K. (2019). Melatonin-deficient rice plants show a common semidwarf  
1072 phenotype either dependent or independent of brassinosteroid biosynthesis. *Journal of*  
1073 *Pineal Research*, 66(2), e12537.
- 1074 Li, C., Tan, D. X., Liang, D., Chang, C., Jia, D., Ma, F. (2015). Melatonin mediates the  
1075 regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two  
1076 *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 669-680.
- 1077 Li, C., Wang, P., Wei, Z. W., Liang, D., Liu, C, H., Yin, L., Jia, D. F., Fu, M. Y. Ma, F.  
1078 W. (2012). The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in  
1079 *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 53:298–306.
- 1080 Li, D., Guo, Y., Zhang, D., He, S., Gong, J., Ma, H. (2020). Melatonin represses oil and  
1081 anthocyanin accumulation in seeds. *Plant Physiology* 183(3): 898–914.
- 1082 Li, H., Guo, Y., Lan, Z., Xu, K., Chang, J., Ahammed, G. J., Ma, J., Wei, C., Zhang, X.  
1083 (2021a). Methyl jasmonate mediates melatonin-induced cold tolerance of grafted  
1084 watermelon plants. *Horticulture Research*, 8.
- 1085 Li, Z., Su, X., Chen, Y., Fan, X., He, L., Guo, J., Wang, Y., Yang, Q. (2021b).  
1086 Melatonin improves drought resistance in maize seedlings by enhancing the antioxidant  
1087 system and regulating abscisic acid metabolism to maintain stomatal opening under  
1088 PEG-induced drought. *Journal of Plant Biology*, 64, 299-312.
- 1089 Liang, C., Li, A., Yu, H., Li, W., Liang, C., Guo, S., Zhang, R., Chu, C. (2017).  
1090 Melatonin regulates root architecture by modulating auxin response in rice. *Frontiers in*  
1091 *Plant Science*, 8, 134.
- 1092 Lin, S., Song, X. F., Mao, H. T., Li, S. Q., Gan, J. Y., Yuan, M., Chen, Y. E. (2022).  
1093 Exogenous melatonin improved photosynthetic efficiency of photosystem II by  
1094 reversible phosphorylation of thylakoid proteins in wheat under osmotic stress.  
1095 *Frontiers in Plant Science*, 13.
- 1096 Liscic, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2006). Gas  
1097 chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature*  
1098 *Protocols* 1: 387–396.

- 1099 Liu, C., Chen, L., Zhao, R., Li, R., Zhang, S., Yu, W., Sheng, J., Shen, L. (2019).  
1100 Melatonin induces disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit by activating  
1101 jasmonic acid signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(22),  
1102 6116-6124.
- 1103 Liu, J., Zhang, R., Sun, Y., Liu, Z., Jin, W., Sun, Y. (2016). The beneficial effects of  
1104 exogenous melatonin on tomato fruit properties. *Scientia Horticulturae*, 207, 14-20.
- 1105 Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., Zhang, J. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of  
1106 ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination.  
1107 *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 2979-2990.
- 1108 Luo, M., Wang, D., Delaplace, P., Pan, Y., Zhou, Y., Tang, W., Chen, K., Chen, J., Xu,  
1109 Z., Ma, Y., Chen, M. (2023). Melatonin enhances drought tolerance by affecting  
1110 jasmonic acid and lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*  
1111 and Biochemistry, 107974.
- 1112 Mukherjee, S., David, A., Yadav, S., Baluška, F., Bhatla, S. C. (2014). Salt stress-  
1113 induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin  
1114 and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiologia Plantarum*,  
1115 152(4), 714-728.
- 1116 Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with  
1117 tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473–497.
- 1118 Murcia, G., Fontana, A., Pontin, M., Baraldi, R., Bertazza, G., Piccoli, P. N. (2017).  
1119 ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to  
1120 alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochemistry*, 135, 34-52.
- 1121 Naik, P. M., Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors-role in secondary  
1122 metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and biotic*  
1123 *stress in plants – recent advances and future perspectives*, 247–277.
- 1124 Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific  
1125 peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867–880.

- 1126 Nascimento, E. X., Mota, J. H., Carmo Vieira M., Zárate, N. A. H. (2007). Produção de  
1127 biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo  
1128 solteiro e consorciado. *Ciência e Agrotecnologia* 31:724–730.
- 1129 Neff, M. M., Chory, J. (1998). Genetic interactions between phytochrome A,  
1130 phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant*  
1131 *Physiology*.
- 1132 Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., Cheng, Y. (2021). Linking  
1133 plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. *Frontiers in Plant*  
1134 *Science*, 12.
- 1135 Park, S., Lee, D. E., Jang, H., Byeon, Y., Kim, Y. S., Back, K. (2013). Melatonin-rich  
1136 transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *Journal of*  
1137 *Pineal Research*, 54:258–263.
- 1138 Pervaiz, T., Songtao, J., Faghihi, F., Haider, M. S., Fang, J. (2017). Naturally occurring  
1139 anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *Journal of*  
1140 *Plant Biochemistry Physiology* 5(2): 1–9.
- 1141 Ramakrishna, A., Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on  
1142 secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1720–1731.
- 1143 Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Flores, L. J., Czarnocki, Z. (2007). Melatonin  
1144 and its metabolites: new findings regarding their production and their radical  
1145 scavenging actions. *Acta Biochemica Polonica*, 54:1–9.
- 1146 Reiter, R.J., Tan, D.X., Zhou, Z., Cruz, M.H.C., Fuentes-Broto, L., Galano, A. (2015).  
1147 Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules* 20: 7396–7437.
- 1148 Sadak, M. S., Abdalla, A. M., Abd Elhamid, E. M., Ezzo, M. I. (2020). Role of  
1149 melatonin in improving growth, yield quantity and quality of *Moringa oleifera* L. plant  
1150 under drought stress. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-13.
- 1151 Sarropoulou, V. N., Therios, I. N., Dimassi-Theriou, K. N. (2012). Melatonin promotes  
1152 adventitious root regeneration in *in vitro* shoot tip explants of the commercial sweet

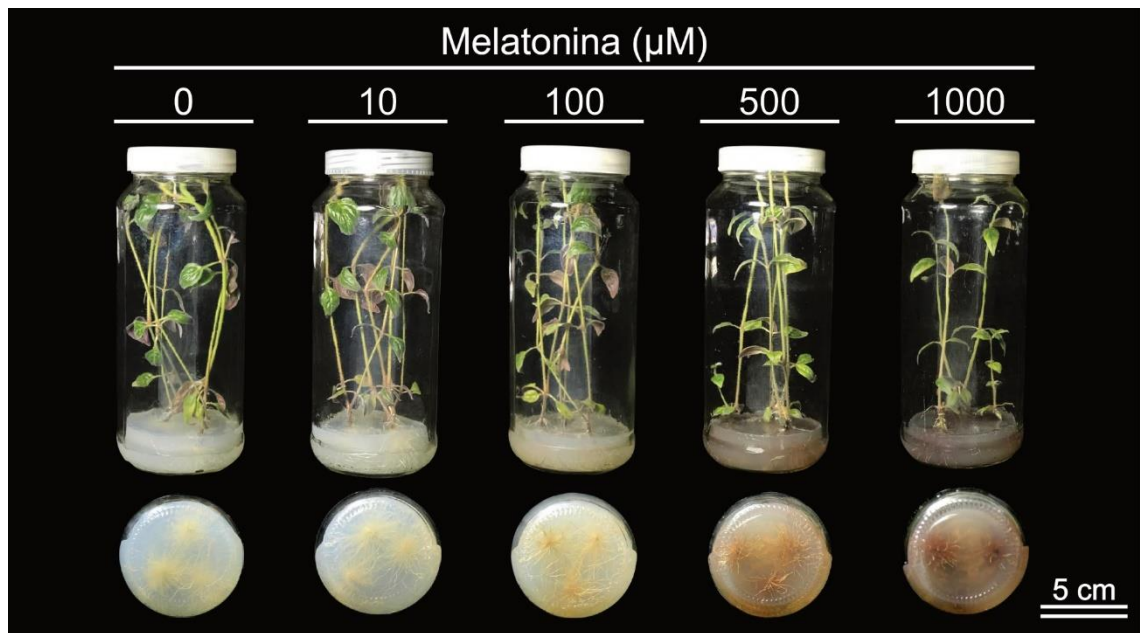
- 1153 cherry rootstocks CAB-6P (*Prunus cerasus* L.), Gisela 6 (*P. cerasus* x *P. canescens*),  
1154 and MxM 60 (*P. avium* x *P. mahaleb*). *Journal of Pineal Research*, 52(1), 38-46.
- 1155 Schmelz, E. A., Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Bowers, W. S. (1998). Damage-  
1156 induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: a rapid root response involving  
1157 the octadecanoic acid pathway. *Journal of Chemical Ecology* 24:339–360.
- 1158 Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25  
1159 years of image analysis". *Nature Methods* 9:671–675.
- 1160 Sharma, A., Wang, J., Xu, D., Tao, S., Chong, S., Yan, D., Li, Z., Yuan, H., Zheng, B.  
1161 (2020). Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant  
1162 system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in  
1163 grafted *Carya cathayensis* plants. *Science of the Total Environment*, 713, 136675.
- 1164 Siddiqui, M. H., Alamri, S., Al-Khaishany, M. Y., Khan, M. N., Al-Amri, A., Ali, H.  
1165 M., Alaraidh, I. A., Alsahli, A. A. (2019). Exogenous melatonin counteracts NaCl-  
1166 induced damage by regulating the antioxidant system, proline and carbohydrates  
1167 metabolism in tomato seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2),  
1168 353.
- 1169 Silva, T. D., Batista, D. S., Castro, K. M., Fortini, E. A., Felipe, S. H. S., Fernandes, A.  
1170 M., Sousa, R. M. J., Chagas, K., Silva, J. V. S. S., Correia, L. N. F., Torres-Silva, G.,  
1171 Farias, L. M., Otoni, W. C. (2021). Irradiance-driven 20-hydroxyecdysone production  
1172 and morphophysiological changes in *Pfaffia glomerata* plants grown *in vitro*.  
1173 *Protoplasma*, 258, 151-167.
- 1174 Silva, T. D., Batista, D. S., Fortini, E. A., de Castro, K. M., Felipe, S. H. S., Fernandes,  
1175 A. M., Sousa, R. M. J., Chagas, K., Silva, J. V. S. S., Correia, L. N. F., Farias, L. M.,  
1176 Leite, J. P. V., Otoni, W. C. (2020). Blue and red light affects morphogenesis and 20-  
1177 hydroxyecdysone content of *in vitro Pfaffia glomerata* accessions. *Journal of*  
1178 *Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 203, 111761.
- 1179 Sun, H., Wang, X. Q., Zeng, Z. L., Yang, Y. J., Huang, W. (2022). Exogenous  
1180 melatonin strongly affects dynamic photosynthesis and enhances water-water cycle in  
1181 tobacco. *Frontiers in Plant Science*, 2703.

- 1182 Trovato, M., Forlani, G., Signorelli, S., Funck, D. (2019). Proline metabolism and its  
1183 functions in development and stress tolerance. In: Osmoprotectant-mediated abiotic  
1184 stress tolerance in plants. Springer, 41-72.
- 1185 Twaij, B. M., Jazar, Z. H., Hasan, M. (2020). Trends in the use of tissue culture,  
1186 applications and future aspects. International Journal of plant biology, 11(1), 8385.
- 1187 Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant  
1188 systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant  
1189 Science, 151(1), 59–66.
- 1190 Vigo, C. L. S., Narita, E., & Marques, L. C. (2003). Validação da metodologia de  
1191 quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.)  
1192 Pedersen-Amaranthaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, 13, 46-49.
- 1193 Wang, Q. J., Zheng, L. P., Zhao, P. F., Zhao, Y. L., Wang, J. W. (2014a). Cloning and  
1194 characterization of an elicitor-responsive gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl  
1195 coenzyme A reductase involved in 20-hydroxyecdysone production in cell cultures of  
1196 *Cyanotis arachnoidea*. Plant Physiology and Biochemistry, 84, 1-9.
- 1197 Wang, W., Wang, T., Feng, W. Y., Wang, Z. Y., Cheng, M. S., Wang, Y. J. (2014b).  
1198 Ecdysterone protects gerbil brain from temporal global cerebral ischemia/reperfusion  
1199 injury via preventing neuron apoptosis and deactivating astrocytes and microglia cells.  
1200 Neuroscience Research, 81, 21-29.
- 1201 Wang, Y. C., Yang, Y. Y., Chi, D. F. (2018b). Transcriptome analysis of abscisic acid  
1202 induced 20E regulation in suspension *Ajuga lobata* cells. 3 Biotech, 8, 1-20.
- 1203 Wang, Y., Reiter, R. J., Chan, Z. (2018a). Phytomelatonin: a universal abiotic stress  
1204 regulator. Journal of Experimental Botany, 69(5), 963-974.
- 1205 Wei, W., Li, Q. T., Chu, Y. N., Reiter, R. J., Yu, X. M., Zhu, D. H., Zhang, W. K., Ma,  
1206 B., Lin, Q., Zhang, J. S., Chen, S. Y. (2015). Melatonin enhances plant growth and  
1207 abiotic stress tolerance in soybean plants. Journal of Experimental Botany, 66(3), 695-  
1208 707.

- 1209 Wellburn A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as  
1210 total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution.  
1211 *Journal Plant Physiology*, 144:307–313.
- 1212 Wen, D., Gong, B., Sun, S., Liu, S., Wang, X., Wei, M., Yang, F., Li, Y., Shi, Q.  
1213 (2016). Promoting roles of melatonin in adventitious root development of *Solanum*  
1214 *lycopersicum* L. by regulating auxin and nitric oxide signaling. *Frontiers in Plant*  
1215 *Science*, 7, 718.
- 1216 Xia, X., Zhang, Q., Liu, R., Wang, Z., Tang, N., Liu, F., Huang, G., Jiang, X., Gui, G.,  
1217 Wang, L. Sun, X. (2014). Effects of 20-hydroxyecdysone on improving memory deficits  
1218 in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rat. *European Journal of*  
1219 *Pharmacology*, 740, 45-52.
- 1220 Xu, L., Xiang, G., Sun, Q., Ni, Y., Jin, Z., Gao, S., Yao, Y. (2019). Melatonin enhances  
1221 salt tolerance by promoting *MYB108A*-mediated ethylene biosynthesis in grapevines.  
1222 *Horticulture Research*, 6.
- 1223 Yang, J., Zhang, C., Wang, Z., Sun, S., Zhan, R., Zhao, Y., Ma, B., Ma, F., Li, M.  
1224 (2019). Melatonin-mediated sugar accumulation and growth inhibition in apple plants  
1225 involves down-regulation of fructokinase 2 expression and activity. *Frontiers in Plant*  
1226 *Science*, 10, 150.
- 1227 Ye, N., Zhu, G., Liu, Y., Li, Y., Zhang, J. (2011). ABA controls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation  
1228 through the induction of *OsCATB* in rice leaves under water stress. *Plant and Cell*  
1229 *Physiology*, 52(4), 689-698.
- 1230 Zhan, H., Nie, X., Zhang, T., Li, S., Wang, X., Du, X., Tong, W., Song, W. (2019).  
1231 Melatonin: a small molecule but important for salt stress tolerance in plants.  
1232 *International Journal of Molecular Sciences* 20(3): 709.
- 1233 Zhang, N., Sun, Q., Li, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, H., Guo, Y. D. (2016). Melatonin  
1234 improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high  
1235 reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 7,  
1236 197.

- 1237 Zhang, Q., Liu, X., Zhang, Z., Liu, N., Li, D., Hu, L. (2019). Melatonin improved  
1238 waterlogging tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by reprogramming polyamine and  
1239 ethylene metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10, 44.
- 1240 Zhao, H., Su, T., Huo, L., Wei, H., Jiang, Y., Xu, L., Ma, F. (2015b). Unveiling the  
1241 mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case.  
1242 *Journal of Pineal Research*, 59(2), 255-266.
- 1243 Zhao, H., Xu, L., Su, T., Jiang, Y., Hu, L., Ma, F. (2015a). Melatonin regulates  
1244 carbohydrate metabolism and defenses against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC  
1245 3000 infection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Pineal Research*, 59(1), 109-119.
- 1246 Zhong, L., Lin, L., Yang, L., Liao, M. A., Wang, X., Wang, J., Lv, X., Deng, H., Liang  
1247 D., Xia, H., Tang, Y. (2020). Exogenous melatonin promotes growth and sucrose  
1248 metabolism of grape seedlings. *PLoS One*, 15(4), e0232033.

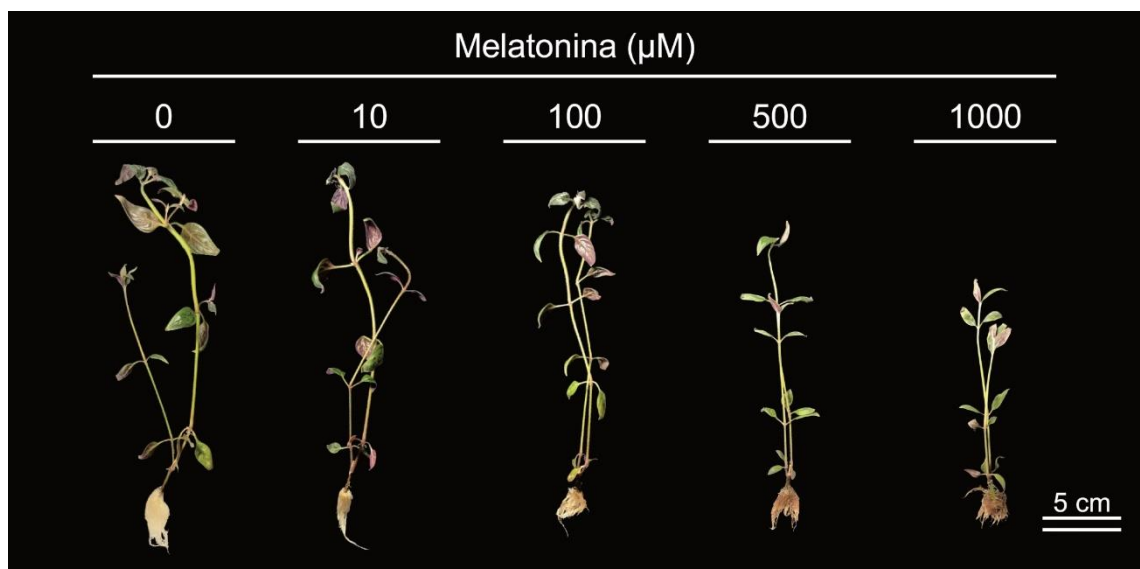
## 1249 FIGURAS



1250

1251 **Figura 1.** Plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes  
 1252 concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 µM). Abaixo está a representação  
 1253 do sistema radicular no fundo do frasco. Barra = 5 cm.

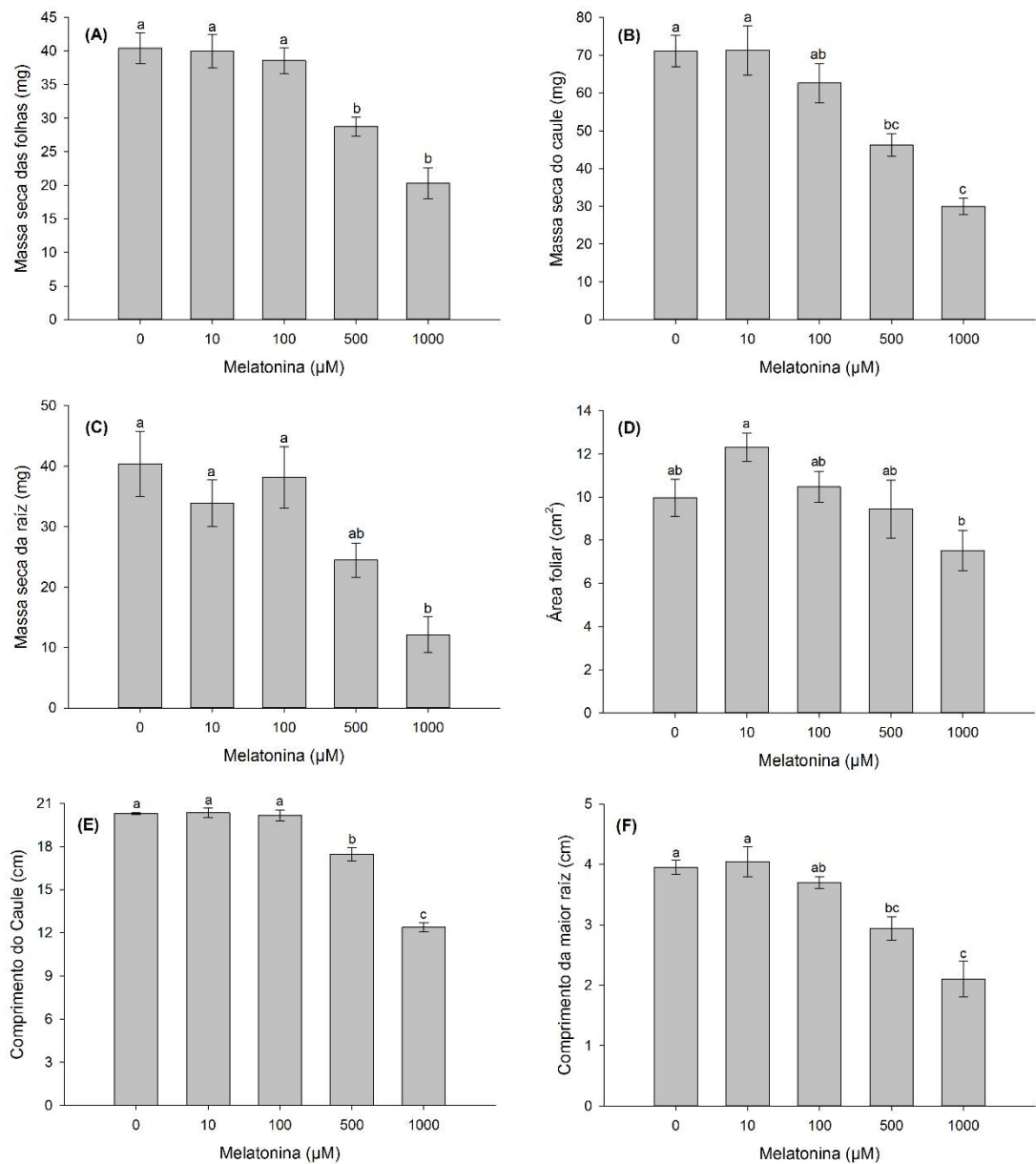
1254



1255

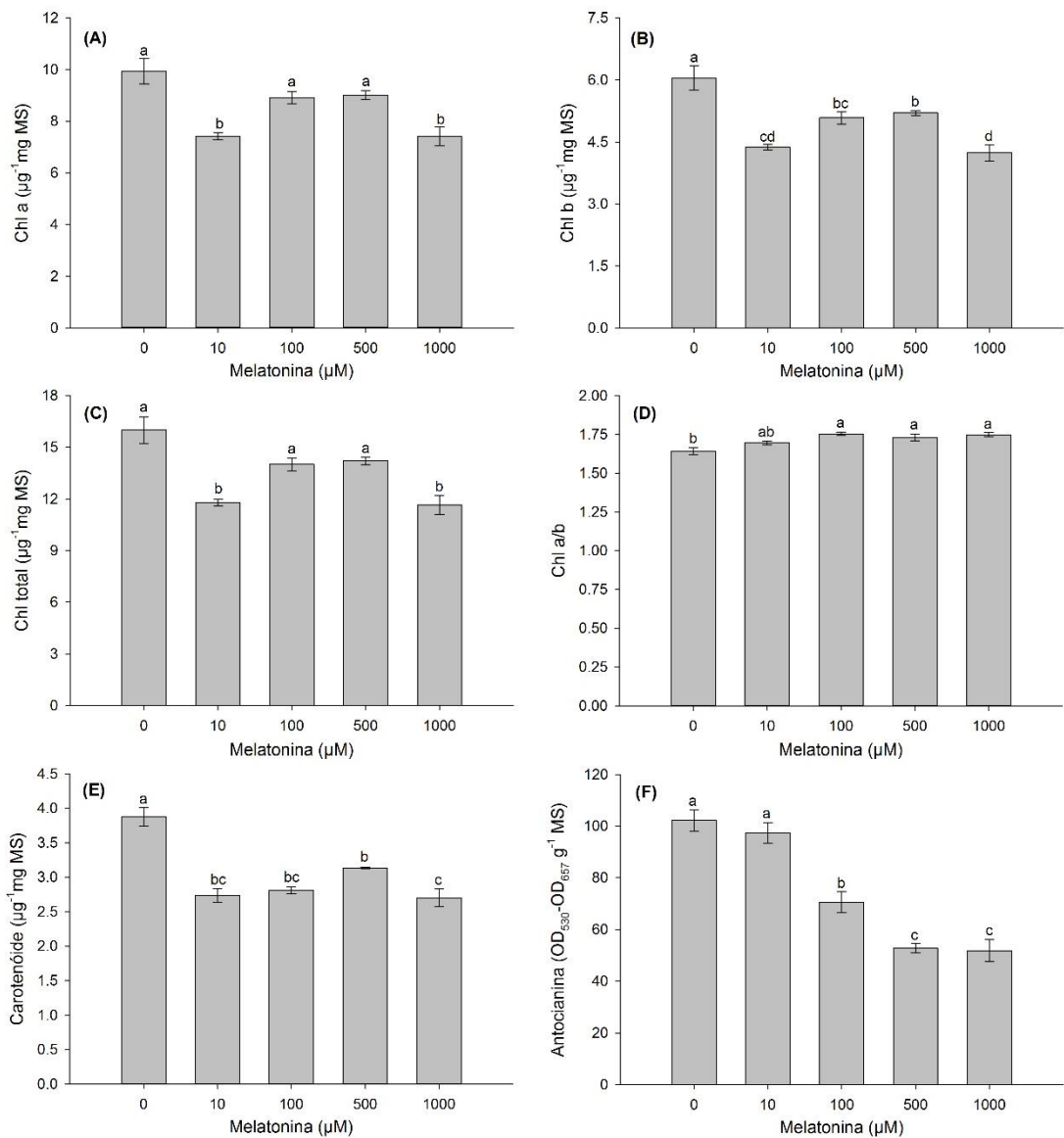
1256 **Figura 2.** Plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes  
 1257 concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 µM). Barra = 5 cm.

1258



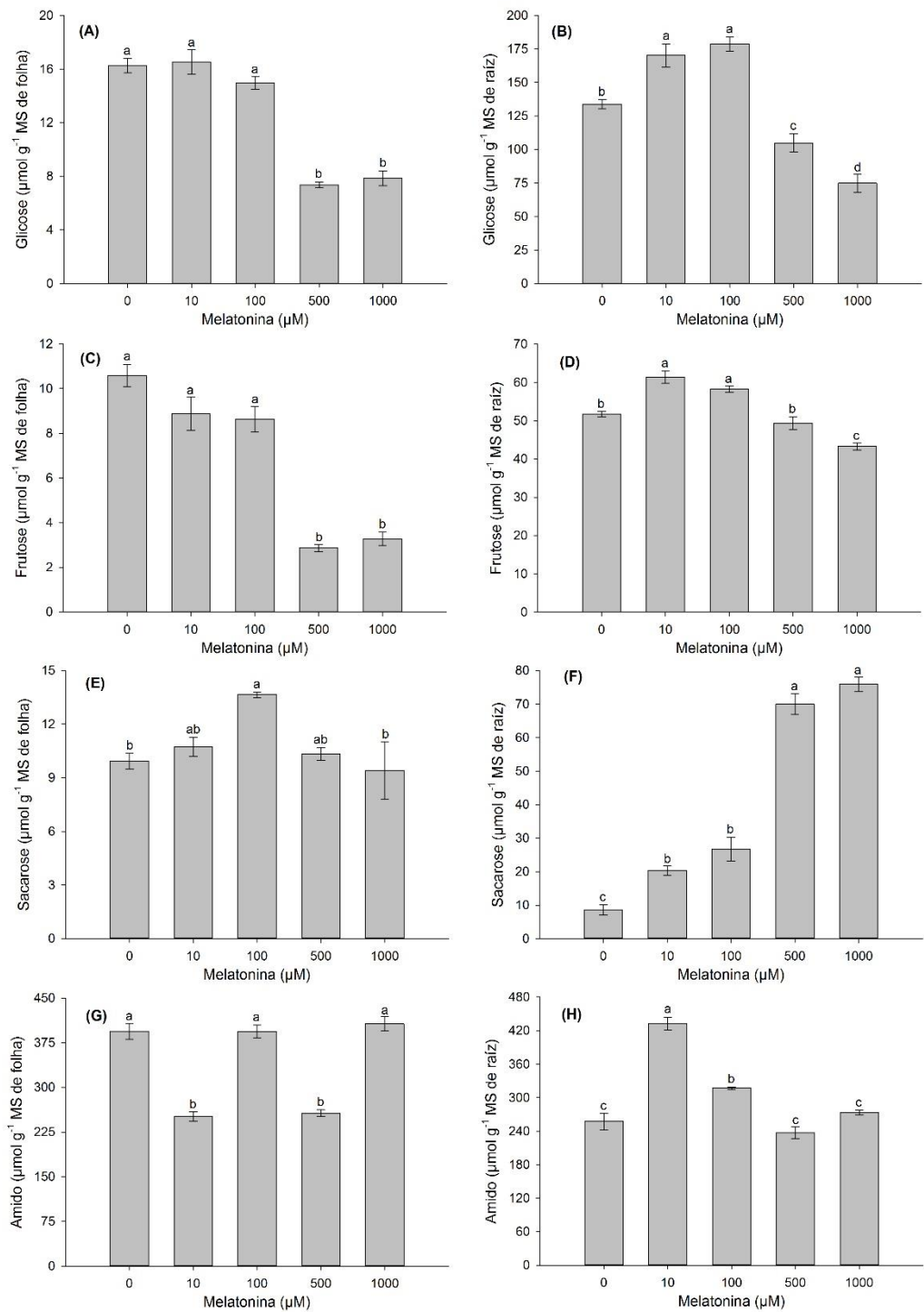
1259

1260 **Figura 3.** Análises de crescimento de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro*  
 1261 sob diferentes concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 µM). (A) Massa  
 1262 seca das folhas (mg), (B) Massa seca do caule (mg), (C) Massa seca das raízes (mg),  
 1263 (D) Área foliar (cm<sup>2</sup>), (E) Comprimento do caule (cm), (F) Comprimento da maior raiz  
 1264 (cm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%  
 1265 de probabilidade. Dados apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).



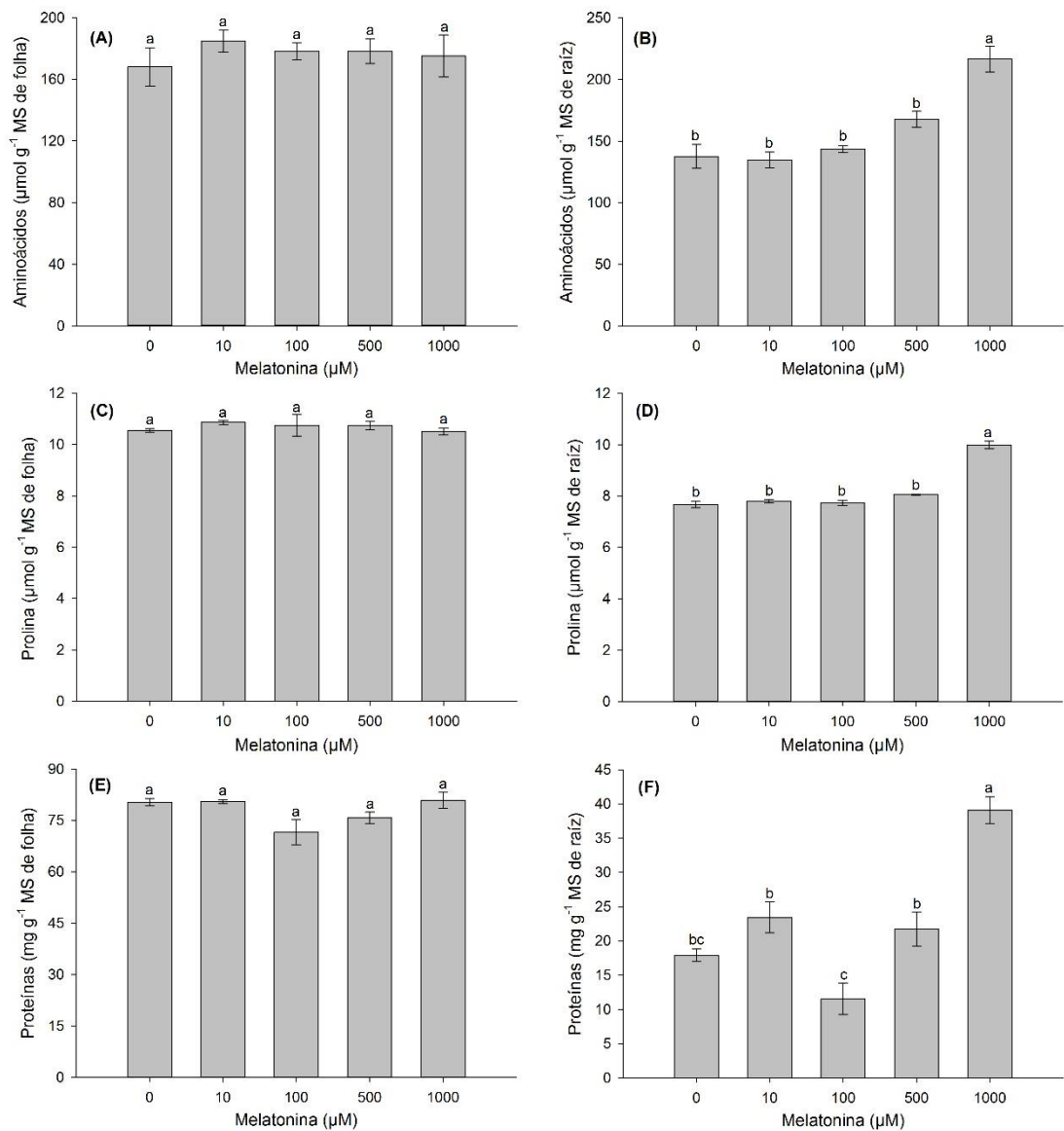
1266

1267 **Figura 4.** Teores de pigmentos em plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo  
 1268 *in vitro* sob diferentes concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 µM). (A)  
 1269 Clorofila *a* (µg<sup>-1</sup> mg MS), (B) Clorofila *b* (µg<sup>-1</sup> mg MS), (C) Clorofila total (µg<sup>-1</sup> mg  
 1270 MS), (D) Clorofila *a/b*, (E) Carotenóides (µg<sup>-1</sup> mg MS), (F) Antocianina (OD<sub>530</sub> - OD<sub>657</sub>  
 1271 g<sup>-1</sup> MS). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a  
 1272 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).



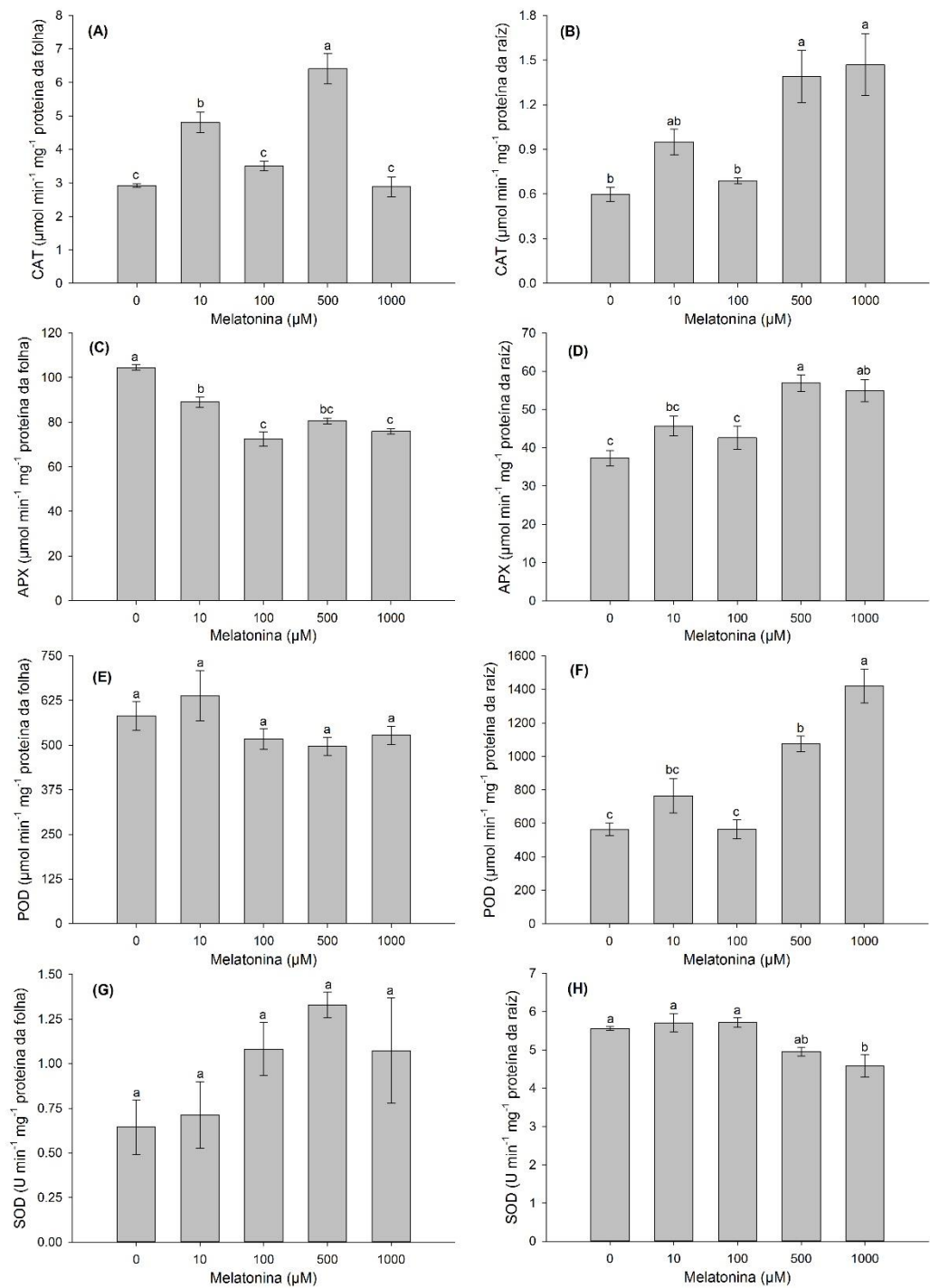
1273

1274 **Figura 5.** Teor de metabólitos primários em folhas (A, C, E, G) e raízes (B, D, F, H) de  
 1275 *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de  
 1276 melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 µM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 1277 entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores  
 1278 médios ± erro padrão (n=4).



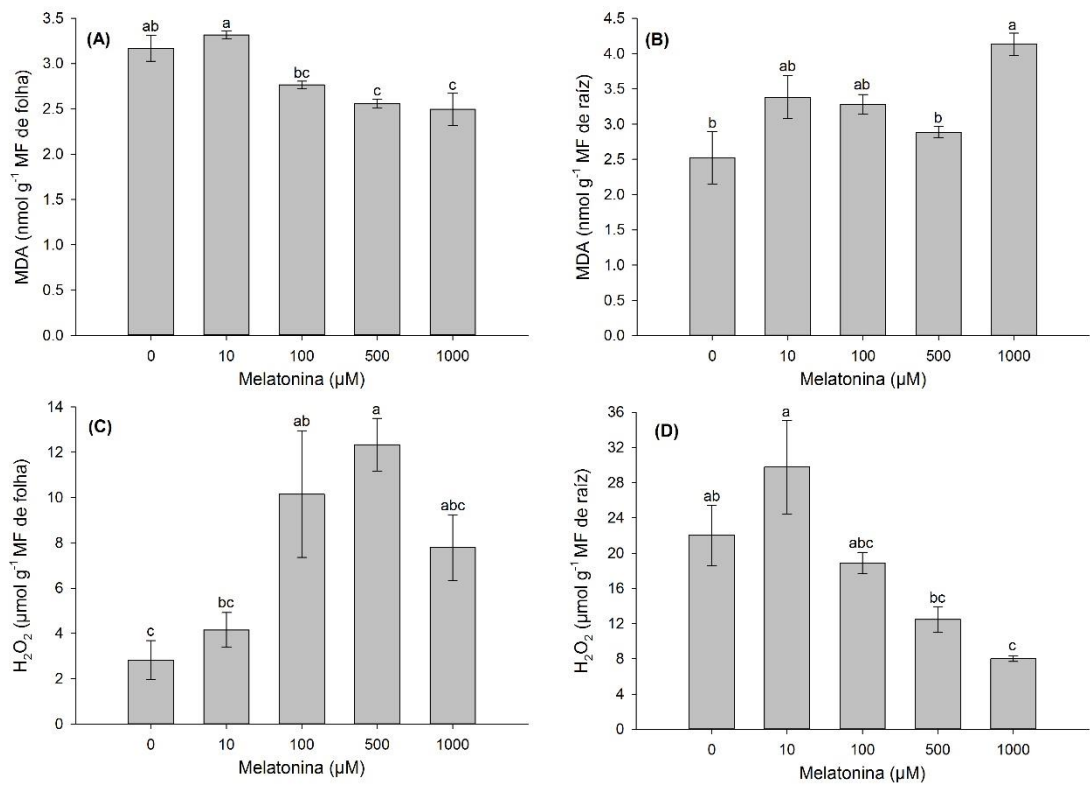
1279

1280 **Figura 6.** Concentração de aminoácidos, prolina e proteínas em folhas (A, C, E) e raízes  
 1281 (B, D, F) de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes  
 1282 concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 µM). Médias seguidas pela mesma  
 1283 letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados  
 1284 apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).



1285

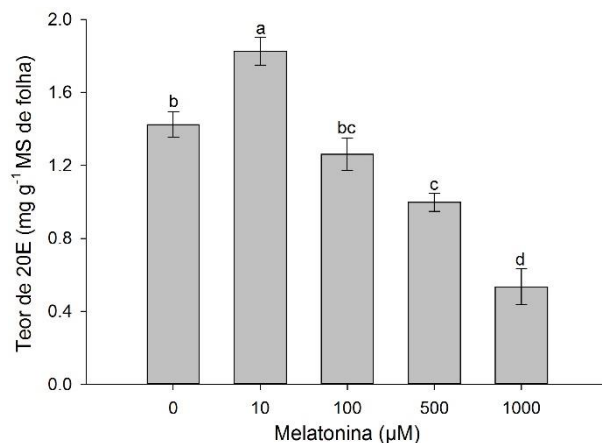
1286 **Figura 7.** Atividade das enzimas do estresse oxidativo em folhas (A, C, E, G) e raízes  
 1287 (B, D, F, H) de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes  
 1288 concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 µM). CAT, catalase; APX,  
 1289 ascorbato peroxidase; POD, peroxidase oxidoreductase; SOD, desmutase do superóxido.  
 1290 Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de  
 1291 probabilidade. Dados apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).



1292

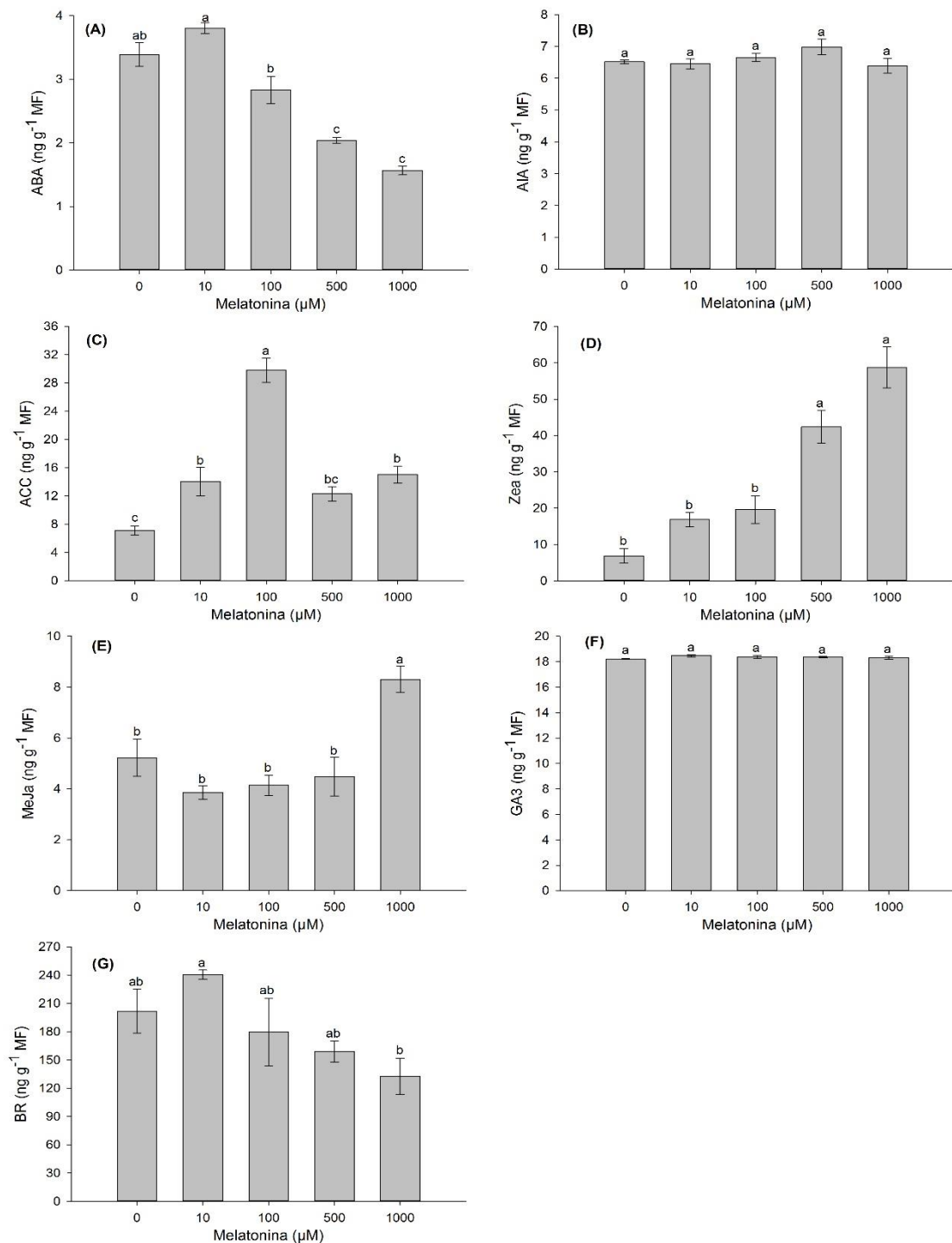
1293 **Figura 8.** Concentração de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio livre  
 1294 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em folhas (A, C) e raízes (B, D) de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in*  
 1295 *vitro*, sob diferentes concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000 μM). Médias  
 1296 seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de  
 1297 probabilidade. Dados apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).

1298



1299

1300 **Figura 9.** Teor de 20-hidroxiectidisona (20E) em folhas de *Pfaffia glomerata* após 35  
 1301 dias de cultivo *in vitro*, sob diferentes concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e  
 1302 1000 μM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a  
 1303 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios ± erro padrão (n=3).



1304

1305 **Figura 10.** Teor de fitohormônios em plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de  
 1306 cultivo *in vitro*, sob diferentes concentrações de melatonina (0; 10; 100; 500 e 1000  
 1307 µM). (A) ácido abscísico (ABA); (B) ácido indolacético (AIA); (C) ácido 1-  
 1308 aminociclopropano-1-carboxílico (ACC-1); (D) zeatina (Zea); (E) metil jasmonato  
 1309 (MeJa); (F) ácido giberélico (GA3); (G) brassinosteróides (BR). Médias seguidas pela  
 1310 mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados  
 1311 apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).

## CAPÍTULO II:

1312

1313 **Efeitos do déficit hídrico e da melatonina sobre o crescimento e biossíntese de 20-**  
1314 **hidroxiecdisona em *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro***

1315 **RESUMO**

1316 O déficit hídrico é um dos estresses abióticos que mais contribui para a redução da  
1317 produtividade agrícola devido seu impacto negativo no crescimento e desenvolvimento  
1318 das plantas. O uso de biorreguladores, como a melatonina, pode ser uma alternativa para  
1319 melhorar as respostas de tolerância ao estresse, regulando mecanismos fisiológicos e  
1320 bioquímicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do déficit hídrico  
1321 no crescimento, desenvolvimento e na produção de 20E em *Pfaffia glomerata* cultivada  
1322 *in vitro* e a influência da melatonina nas respostas de tolerância ao estresse. Segmentos  
1323 nodais de aproximadamente 2 cm foram inoculados em meio de Murashige e Skoog  
1324 (MS), as culturas foram mantidas a  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de  
1325  $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os efeitos do déficit hídrico foram provocados pela suplementação do  
1326 meio de cultura com polietilenoglicol (PEG 4000). O experimento consistiu em 4  
1327 tratamentos: 100  $\mu\text{M}$  melatonina (Melat), 2,5 g L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG),  
1328 Melat+PEG e controle. PEG e Melat foram adicionados no décimo dia de cultivo. Após  
1329 35 dias de cultivo, plantas expostas ao déficit hídrico apresentaram redução no  
1330 crescimento, biomassa e nos teores de pigmentos, além de incremento da produção de  
1331 MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em contrapartida, as plantas apresentaram uma série de respostas de  
1332 tolerância ao estresse, como o aumento da atividade de enzimas do estresse oxidativo e  
1333 a produção de solutos osmorreguladores. A melatonina induziu respostas cruciais para  
1334 atenuar os efeitos do estresse, promovendo redução da peroxidação lipídica e da  
1335 degradação de proteínas, o que pode ter contribuído para amenizar o estresse oxidativo.  
1336 Nossos resultados fornecem informações importantes sobre as consequências do déficit  
1337 hídrico em *P. glomerata* e o uso da melatonina nas respostas de tolerância ao estresse  
1338 em plantas.

1339

1340

1341 **Palavras-chave:** Fitorreguladores; Ginseng-brasileiro; Estresse oxidativo;  
1342 Antioxidantes; Polietilenoglicol.

1343 **ABSTRACT**

1344 The water deficit is one of the abiotic stresses that most contribute to the reduction of  
1345 agricultural productivity due to its negative impact on plant growth and development.  
1346 Bioregulators, such as melatonin, may be an alternative to improve tolerance responses  
1347 to stress, regulating physiological and biochemical mechanisms. The present study  
1348 aimed to evaluate the effects of water deficit on the growth, development, and  
1349 production of 20E in *Pfaffia glomerata* cultivated *in vitro* and the influence of  
1350 melatonin on stress tolerance responses. Nodal segments of approximately 2 cm were  
1351 inoculated in Murashige and Skoog (MS) medium; cultures were maintained at  $25 \pm 2$   
1352 °C under a photoperiod of 16 h and irradiance of  $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The effects of water  
1353 deficit were caused by supplementing the culture medium with polyethylene glycol  
1354 (PEG 4000). The experiment consisted of 4 treatments: 100  $\mu\text{M}$  melatonin (Melat); 2.5  
1355  $\text{g L}^{-1}$  Polyethyleneglycol (PEG); Melat+PEG; and control. PEG and Melat were  
1356 increased on the tenth day of cultivation. After 35 days of cultivation, plants exposed to  
1357 water deficit showed a reduction in growth, biomass, and pigment content, as well as an  
1358 increase in MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  production. On the other hand, plants also exhibited an  
1359 increase in the activity of oxidative stress enzymes and the production of  
1360 osmoregulatory solutes. Melatonin induced crucial responses to mitigate the effects of  
1361 stress, promoting a reduction in lipid peroxidation and in protein degradation, which may  
1362 have contributed to alleviating oxidative stress. The results of the experiments provide  
1363 essential information about the consequences of water deficit in *P. glomerata* and the  
1364 use of melatonin in plant stress tolerance responses.

1365

1366

1367 **Keywords:** Phyto regulators; Brazilian ginseng; Oxidative stress; Antioxidants;  
1368 Polyethyleneglycol.

## 1369 INTRODUÇÃO

1370 As plantas, devido ao seu estilo de vida sésstil, enfrentam desafios em ambientes  
1371 sujeitos a alterações constantes, e em consequência, estão expostas a diversos tipos de  
1372 estresses. Os estresses podem ser de natureza biótica, tais como ataque por herbívoros e  
1373 infecção por patógenos, ou abiótica, em decorrência de flutuações na disponibilidade de  
1374 recursos como água, sal, luz, temperatura, nutrientes e CO<sub>2</sub>. A influência que cada fator  
1375 abiótico tem sobre a planta irá variar de acordo com sua intensidade e/ou duração,  
1376 podendo afetar o crescimento, desenvolvimento e/ou produtividade (Koyro *et al.*, 2012;  
1377 Suzuki *et al.*, 2014; Zhu, 2016).

1378 O déficit hídrico é um dos problemas ambientais que mais contribui para a  
1379 redução da produtividade agrícola (Lamaoui *et al.*, 2018) e, está entre os estresses  
1380 abióticos que mais afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Oliveira *et*  
1381 *al.*, 2013). O estresse osmótico induzido pela escassez de água leva à uma menor  
1382 absorção de nutrientes, reduz as taxas fotossintéticas e de transpiração, diminuindo a  
1383 abertura estomática e aumentando também o estresse oxidativo nas plantas (Reddy *et*  
1384 *al.*, 2004; Liang *et al.*, 2019).

1385 A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas pode  
1386 alterar a estrutura de proteínas e ácidos nucleicos e induzir peroxidação de lipídica de  
1387 membrana (Miller *et al.*, 2010; Tenhaken, 2015; Foyer, 2018; Kanojia, 2018), bem  
1388 como afetar o aparato fotossintético (Gururani *et al.*, 2015; Hazrati, 2016). A produção  
1389 de componentes enzimáticos (enzimas antioxidantes) e não enzimáticos (tais como  
1390 carotenoides e antocianinas) e a manutenção de alta capacidade antioxidante contribuem  
1391 para eliminação de ROS, aumentando a tolerância das plantas a estresses abióticos  
1392 (Caverzan *et al.*, 2016; Choudhury *et al.*, 2017; Turkan *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2021).

1393 O acúmulo de carboidratos e aminoácidos na célula é outro mecanismo de  
1394 defesa importante em plantas sob déficit hídrico, garantindo o ajuste osmótico que  
1395 conserva a absorção de água e a turgescência celular, mantendo maior taxa  
1396 fotossintética, abertura estomática e expansão celular mesmo em condição de estresse  
1397 (Sanders & Arndt, 2012; Fan & Xiang, 2015; Blum, 2017; Turner, 2018).

1398 A cultura de tecidos vegetais, uma técnica realizada em condições ambientais  
1399 controladas, em menos tempo e espaço, é uma ferramenta importante para compreensão  
1400 das respostas bioquímicas e fisiológicas nas plantas, assim como o estudo de tolerância  
1401 ao estresse. O cultivo *in vitro* oferece oportunidades para a propagação de plantas com

1402 características agronômicas desejáveis, além do desenvolvimento de métodos que  
1403 permitem maior sobrevivência em condições ambientais adversas pela rustificação dos  
1404 clones (Rai *et al.*, 2011; Pérez-Clemente & Gómez-Cadenas, 2012; Jan *et al.*, 2018).

1405 No cultivo *in vitro*, o déficit hídrico pode ser induzido pela adição de agentes  
1406 osmorreguladores, como o manitol, sorbitol ou polietilenoglicol (PEG), que elevam o  
1407 potencial osmótico do meio de cultura sem serem absorvidos ou serem fitotóxicos e  
1408 podem modular o metabolismo da planta (Verslues *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2016;  
1409 Ebad *et al.*, 2017).

1410 O uso de biorreguladores, como a melatonina, surge como alternativa para  
1411 facilitar o crescimento das plantas e melhorar as respostas de tolerância ao déficit  
1412 hídrico, regulando vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos (Saidi *et al.*, 2017;  
1413 Xalxo & Keshavkant, 2019). A melatonina é uma molécula multirregulatória presente  
1414 na maioria das plantas que age como potente antioxidante, eliminando radicais livres,  
1415 reduzindo a peroxidação lipídica e aliviando o estresse oxidativo (Reiter *et al.*, 2015;  
1416 Fan *et al.*, 2018; Zhan *et al.*, 2019), pode melhorar a capacidade fotossintética e realizar  
1417 um papel protetor na fotossíntese, regulando genes associados à degradação e síntese da  
1418 clorofila (Yang *et al.*, 2022) e aumentando a expressão de proteínas (Wang *et al.*, 2022)

1419 *Pfaffia glomerata* é uma planta medicinal pertencente à família Amaranthaceae,  
1420 conhecida popularmente por fáfia ou ginseng brasileiro. Seu potencial uso na indústria  
1421 cosmética e farmacêutica se justifica por sua ação tônica, rejuvenescedora, anti-  
1422 inflamatória, analgésica, antioxidante, antimicrobiana, combate de problemas gástricos  
1423 e perdas de memória (Neto *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2005; Mendes, 2011; Caleffi *et al.*,  
1424 2015; Mazzeo *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2019;), contribui para a redução do estresse,  
1425 ansiedade e depressão (Franco *et al.*, 2021), além de possuir efeitos aneugênicos e  
1426 clastogênicos, auxiliando no tratamento do câncer (Neves *et al.*, 2016).

1427 As propriedades medicinais de *P. glomerata* se dá principalmente pela presença  
1428 do composto 20-hidroxiecdisona (20E), um composto análogo ao hormônio que  
1429 controla a ecdise em insetos, sendo que, em plantas, a hipótese mais aceita é que 20E  
1430 atue como um fitoquímico protetor contra insetos fitófagos não adaptados (Festucci-  
1431 Buselli *et al.*, 2008b; Dinan *et al.*, 2009), embora também possa atuar como  
1432 fitohormônio e fonte de fitoesteroides requeridos para o crescimento e proliferação  
1433 celular (Machackova *et al.*, 1995).

1434 Diferentes estudos com *P. glomerata* em condição de estresse têm sido  
1435 realizados (Pereira *et al.*, 2018; Felipe *et al.*, 2019a; Felipe *et al.*, 2019b; Chagas, 2019;

1436 Batista *et al.*, 2019b; Silva, 2022; Fortini *et al.*, 2023). O presente trabalho, tem como  
1437 objetivo avaliar os efeitos do déficit hídrico no crescimento, desenvolvimento e na  
1438 produção de 20E em *P. glomerata* cultivada *in vitro*, bem como a influência da  
1439 melatonina nas respostas de tolerância ao estresse.

## 1440 MATERIAL E MÉTODOS

### 1441 Crescimento das plantas e desenho experimental

1442 Plantas de *P. glomerata* utilizadas nesse trabalho foram provenientes do banco  
1443 de germoplasma *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT-II),  
1444 localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da  
1445 Universidade Federal de Viçosa (UFV).

1446 Segmentos nodais de plantas de *P. glomerata* (acesso 43), medindo cerca de 2  
1447 cm, foram inoculados em meio de cultura líquido estacionário contendo sais e vitaminas  
1448 MS suplementado com 3% de sacarose (m/v) mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>)  
1449 (PhytoTechnology Laboratories®, Kansas, United States) e pH ajustado para 5,7 ± 0,1.  
1450 Os explantes ficaram sustentados por suportes constituídos de bases invertidas de copos  
1451 plásticos de 200 mL, cortados com altura aproximada de 2,5 cm e disco de papel  
1452 (Chagas, 2019). Os suportes foram colocados em frascos de vidro (600 mL de  
1453 capacidade) que receberam alíquotas de 100 mL do referido meio de cultura líquido,  
1454 vedados com tampas de polipropileno com duas membranas que permitem taxa de troca  
1455 de CO<sub>2</sub> de 25 μL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Batista *et al.*, 2017). Todo material foi autoclavado a uma  
1456 temperatura de 121°C e pressão de 1,5 atm por 20 min.

1457 O experimento consistiu em 4 tratamentos: 100 μM melatonina (Melat, Sigma-  
1458 Aldrich Co, St Louis, MO, USA), 2,5 g L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG, PEG 4000),  
1459 Melat+PEG (mesmas concentrações descritas anteriormente) e controle (sem adição de  
1460 Melatonina ou PEG). PEG e Melat foram adicionados no décimo dia de cultivo. Todas  
1461 as culturas foram mantidas à 25±2 °C com fotoperíodo de 16 h e sob irradiância de 41  
1462 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por duas lâmpadas LEDs (SMD 100, 18W, Vilux®, Vitória, ES,  
1463 Brasil).

1464 O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com  
1465 10 repetições para cada tratamento. Cada unidade experimental foi constituída por um  
1466 frasco contendo três segmentos nodais.

### 1467 Variáveis de crescimento

1468 Foram avaliadas as seguintes variáveis de crescimento: massa seca (mg),  
1469 comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm) e área  
1470 foliar (cm<sup>2</sup>). Para determinação da área foliar, as folhas foram destacadas e fixadas em  
1471 papel branco, fotografadas com câmera digital e as imagens processadas no programa

1472 ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). O material vegetal foi colocado em estufa a 50 °C por  
1473 72 horas para obtenção da massa seca.

#### 1474 **Extração metanólica para análises bioquímicas**

1475 Amostras de folhas e raízes foram coletadas em nitrogênio líquido, maceradas,  
1476 liofilizadas e submetidas à extração metanólica (Lisec *et al.*, 2006). Foram adicionados  
1477 700 µL de metanol aos microtubos contendo aproximadamente 10 mg do material  
1478 vegetal e mantidos em um recipiente com água quente. As amostras foram  
1479 homogeneizadas e incubadas a 80 °C sob agitação de 400 ×g, por 20 min, em seguida,  
1480 foram centrifugadas a 12.000 ×g, por 15 min e temperatura de 4 °C. Todo sobrenadante  
1481 foi transferido para novos microtubos, sendo que, uma alíquota de 150 µL foi retirada  
1482 para leitura de pigmentos fotossintéticos. Foram adicionados 375 µL de clorofórmio e  
1483 750 µL de água ultrapura ao sobrenadante restante, as amostras foram homogeneizadas  
1484 e centrifugadas a 12.000 ×g, a 4 °C por 10 min, a fase aquosa superior e incolor (extrato  
1485 metanólico) foi transferida para novos microtubos e utilizada para determinação de  
1486 açúcares e aminoácidos. O precipitado resultante da extração metanólica foi submetido  
1487 a duas lavagens com álcool etílico 70% e posteriormente utilizado para determinação  
1488 dos teores de amido e proteína.

#### 1489 **Teor de pigmentos fotossintéticos e de antocianinas**

1490 Em microplacas de 96 poços foram adicionados 25 µL do extrato metanólico e  
1491 175 µL de metanol e feitas leituras em um leitor de microplacas (OptiMax Tunable  
1492 Microplate Reader) nos comprimentos de onda 470, 666 e 653 nm correspondendo,  
1493 respectivamente, a carotenoides, clorofila *a* (Chl *a*) e clorofila *b* (Chl *b*). Os cálculos  
1494 foram feitos com as fórmulas, descritas por Wellburn (1994):

$$1495 \text{ Clorofila } a = (15,65 \times A_{666}) - 7,34 \times A_{653}$$

$$1496 \text{ Clorofila } b = (27,05 \times A_{653}) - (5,03 \times A_{666})$$

$$1497 \text{ Carotenoides} = \frac{(1000 \times A_{470}) - (2,86 \times \text{Clorofila } a) - (129,2 \times \text{Clorofila } b)}{221}$$

1498 O teor de antocianinas foi determinado utilizando a metodologia proposta por  
1499 Neff & Chory (1998). Amostras com aproximadamente 10 mg de material macerado e  
1500 liofilizado de folhas foram acrescidas de 300 mL de metanol acidificado (1% HCl p/v) e  
1501 incubadas overnight sob agitação à temperatura ambiente. Para separar a fase de

1502 clorofilas das antocianinas, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de água destilada e 500  $\mu\text{L}$  de  
1503 clorofórmio e, então, a solução foi vortexada e centrifugada em 14000  $\times g$  por 5 min.  
1504 Para montagem da placa foi coletado 200  $\mu\text{L}$  da porção superior da solução. As leituras  
1505 foram realizadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 530 ( $A_{530}$ ) e 657  
1506 ( $A_{657}$ ) nm. O conteúdo relativo de antocianinas foi obtido pela subtração de  $A_{657}$  em  
1507  $A_{530}$ .

### 1508 **Teor de açúcares, aminoácidos, proteínas e amido**

1509 Os teores dos açúcares glicose, frutose e sacarose e o teor de amido foram  
1510 determinados seguindo a metodologia descrita por Fernie *et al.* (2001). Já o conteúdo de  
1511 proteínas e aminoácidos foram quantificados pelo método descrito por Cross *et al*  
1512 (2006).

1513 Para determinação dos açúcares, em cada poço de uma microplaca foram  
1514 adicionados 160  $\mu\text{L}$  do meio de reação (HEPES/KOH 100 mM com  $\text{MgCl}_2$  3 mM pH 7,  
1515 ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato -  
1516 G6PDH (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ )), 25  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico e 25  $\mu\text{L}$  de metanol. No leitor de  
1517 microplacas foram realizadas leituras sob absorbâncias de 340 nm com intervalos de 1  
1518 min entre as leituras. Após a estabilização da densidade ótica (OD) foram adicionados 5  
1519  $\mu\text{L}$  das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U  
1520 por reação) e invertase (5 U por reação), com intervalo aproximado de 30 min entre  
1521 cada aplicação.

1522 O teor de aminoácidos das folhas de *P. glomerata* foi determinado adicionando  
1523 em uma microplaca 30  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico e 20  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, enquanto que,  
1524 das raízes foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico e 35  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, em  
1525 ambos, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão citrato pH 5,2 acrescido de ácido ascórbico  
1526 0,2 % (p/v) e 100  $\mu\text{L}$  de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v), em cada poço. A  
1527 microplaca foi incubada a 95 °C no escuro por 20 min e, posteriormente, foi feita leitura  
1528 no comprimento de onda de 570 nm. A curva de calibração foi feita utilizando leucina  
1529 como padrão.

1530 Para a determinação do conteúdo de proteínas, ressuspendeu-se o precipitado  
1531 resultante da extração metanólica em 400  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1 M. Os microtubos foram  
1532 homogeneizados e incubados por 1 h a 95 °C e sob agitação de 400  $\times g$ , sendo em  
1533 seguida, centrifugados a 12000  $\times g$ , a 4 °C por 10 min. Foi retirada uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$   
1534 do sobrenadante e adicionada em microplaca contendo 180  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford

1535 (diluição 1:5 do reagente) em cada poço. Foi feita leitura no comprimento de onda de  
 1536 595 nm. A curva de calibração foi feita utilizando albumina sérica bovina (BSA) como  
 1537 padrão.

1538 O teor de amido foi determinado adicionando 70 µL de ácido acético 1 M, a fim  
 1539 de condicionar um pH ótimo para a reação, nos tubos contendo o precipitado resultante  
 1540 da extração metanólica e NaOH 0,1M. Foi retirada uma alíquota de 40 µL da suspensão  
 1541 e colocada em uma microplaca com 60 µL do mix de hidrólise do amido (composto  
 1542 pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades µL<sup>-1</sup>) e α-amilase (0,01 U µL<sup>-1</sup>). A  
 1543 microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425<sup>®</sup>) e deixada over night em  
 1544 estufa a 37 °C. O extrato hidrolisado (25 µL) foi transferido para uma nova microplaca  
 1545 contendo 25 µL de metanol e 160 µL da reação composta por tampão HEPES/KOH 1M  
 1546 pH 7,0 MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM e 56 unidades G6PDH (0,7  
 1547 unidades µL<sup>-1</sup>) por poço. No leitor de microplacas as amostras foram lidas a 340 nm de  
 1548 absorvância, com intervalo de 1 min entre as leituras. Uma vez estabilizado a OD,  
 1549 adicionou-se 2 µL de hexocinase (2 unidades por reação) em cada poço. Para cálculo do  
 1550 conteúdo de açúcares e amido foi utilizada a equação de Lambert-Beer:

$$1551 \quad \text{NADPH } (\mu\text{mol}) = \frac{\Delta\text{OD}}{2,85 \times 6,22}$$

### 1552 **Conteúdo de prolinas**

1553 A determinação do conteúdo de prolinas seguiu a metodologia proposta por  
 1554 Bates *et al.* (1973). Adicionou-se em uma microplaca 50 µL do extrato metanólico e  
 1555 100 µL de niidrina ácida (Niidrina 1% (m/v) em ácido acético 60% (v/v) e etanol 20%  
 1556 (v/v)). A microplaca foi vedada com fita de alumínio e incubada a 95 °C por 20 min.  
 1557 Foi feita leitura no comprimento de onda de 520 nm e a curva de calibração foi feita  
 1558 utilizando solução padrão de prolina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### 1559 **Quantificação de enzimas do estresse oxidativo**

1560 Foram quantificadas as enzimas Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), Peroxidase do  
 1561 Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e  
 1562 Peroxidase oxidoreductase (POD, EC1.11.1.7). 50 mg de material fresco da parte aérea  
 1563 foram homogeneizados, com 1 mL do meio de extração (tampão fosfato de potássio a  
 1564 0,1 M, pH 6.8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0.1 mM; fluoreto de  
 1565 fenilmetilsulfônico (PMSF) a 1 mM e PVPP 1% (p/v). Foi realizada centrifugação a

1566 10.000 ×g durante 15 min a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático  
1567 bruto.

1568 Para a determinação da atividade da CAT foram adicionados 20 µL do extrato a  
1569 200 µL de meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM)  
1570 em microplaca (Havir & McHale, 1987). A leitura foi realizada no comprimento de  
1571 onda de 240 nm por 1 min (a cada 10 s), e o cálculo da atividade enzimática dado pelo  
1572 decréscimo da absorbância.

1573 A atividade da APX (Nakano & Asada, 1981) foi determinada através do  
1574 acréscimo do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, ácido  
1575 ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM) em 20 µL do extrato na  
1576 microplaca. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em comprimento de onda de  
1577 290 nm durante 1 min.

1578 Determinou-se a atividade da SOD de acordo com protocolo descrito por  
1579 Giannopolities & Ries (1977), a partir da adição de 2,97 mL de meio de reação  
1580 (Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio  
1581 (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e Riboflavina 2 µM) e 30 µL do extrato bruto em  
1582 microplaca. A microplaca com as amostras foi mantida a 25 °C por 5 min em câmara de  
1583 reação (iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W). Após este tempo, a placa foi  
1584 retirada da iluminação e a reação interrompida. Foi feita leitura em comprimento de  
1585 onda de 560 nm e a absorbância incrementada pela produção de coloração azul durante  
1586 a reação, o valor de absorbância foi subtraído do branco, que não possuía extrato  
1587 enzimático.

1588 A atividade da POD foi determinada de acordo com Chance & Maehly (1955).  
1589 Para tal, o meio de reação (13 mM guaiacol, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 mM, Na-phosphate pH  
1590 6.5) foi acrescentado ao extrato bruto e a leitura foi realizada à 470 nm por 1 min.

#### 1591 **Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio**

1592 A determinação da peroxidação lipídica ocorreu a partir da quantificação dos  
1593 teores de malonodialdeído (MDA), utilizando a metodologia proposta por Heath &  
1594 Packer (1968), com modificações. Para a extração, foram acrescentados 500 µL de  
1595 ácido tricloroacético 1% (TCA) em 50 mg de material vegetal fresco e macerado. A  
1596 solução foi vortexada e centrifugada a 12.000 × g por 15 min a 4 °C. Em seguida, 250  
1597 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, juntamente com 750 µL de  
1598 ácido 2-tiobarbitúrico 0.5 % (TBA; p/v) em TCA 20% (p/v). A reação ocorreu por

1599 incubação em agitação a 95 °C durante 30 min; passado este tempo, a reação foi  
1600 interrompida transferindo os tubos de reação para banho de gelo. Os sobrenadantes  
1601 foram transferidos para novos tubos e centrifugados (10.000 ×g, 10 min, 4 °C), a leitura  
1602 foi realizada em espectrofotômetro a 532 (A<sub>532</sub>) e 600 (A<sub>600</sub>) nm. A concentração de  
1603 MDA foi dada pela subtração da A<sub>600</sub> pela A<sub>532</sub>, e calculada de acordo com o coeficiente  
1604 de extinção de 155 mM cm<sup>-1</sup>.

1605 O teor de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi determinado de acordo com a  
1606 metodologia de Velikova *et al.* (2000). Para a extração, foram adicionados 500 µL de  
1607 ácido tricloroacético 0,1% (TCA) em 50 mg de material vegetal fresco e macerado. A  
1608 solução foi vortexada e centrifugada a 14000 ×g por 15 min a 4 °C. Em microplacas,  
1609 foram adicionados 20 µL do sobrenadante, 80 µL de tampão fosfato de potássio (10  
1610 mM e pH 7,0) e 100 µL de iodeto de potássio (1 M). A reação ocorreu por incubação no  
1611 escuro por 45 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm. O teor de  
1612 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi calculado com base em curva padrão.

### 1613 **Quantificação do 20-hidroxiecdisona**

1614 Utilizou-se para quantificação do 20E uma metodologia proposta por Kamada *et*  
1615 *al.* (2009). O extrato metanólico foi preparado conforme descrito por Côrrea *et al.*  
1616 (2015) e a quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência  
1617 (HPLC) em aparelho Shimadzu SPD-10Avp (Kyoto, Japão) equipado com coluna RP  
1618 (150 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm de tamanho de partículas; Fase estacionária C18) de  
1619 Phenomenex (Torrance, CA, EUA) e um Shimadzu SPD-M20A detector de matriz  
1620 fotodiodo (monitoramento 246 nm). A fase móvel consistiu em água ultrapura (solvente  
1621 A) e metanol de grau LC (solvente B). O perfil de gradiente utilizado foi: 0-8min: 50%  
1622 B; 8-13 min: 50-95% B. Todas as análises foram realizadas a uma taxa de fluxo de 1,0  
1623 mL min<sup>-1</sup>, a 40°C. O volume de amostra injetado foi de 20 µL, com duração de 15 min.  
1624 A curva de calibração foi obtida injetando-se soluções de padrão 20E (Sigma-Aldrich,  
1625 St. Louis, MO, EUA) preparadas em metanol de grau HPLC (0 a 120 mg L<sup>-1</sup>).

### 1626 **Análises estatísticas**

1627 As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz,  
1628 2016). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste F e  
1629 as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 1630 **RESULTADOS**

### 1631 **Estresse hídrico leva a redução do crescimento de *P. glomerata***

1632 O presente estudo avaliou o efeito da elicitação com Melatonina e do PEG sob o  
1633 crescimento e desenvolvimento de plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* (Figura  
1634 1). O estresse osmótico e hídrico induzido pela adição de PEG 4000, sozinho ou em  
1635 combinado com melatonina, levou à redução significativa no acúmulo de biomassa das  
1636 folhas (~38%, Figuras 2A), caule (~50%, Figuras 2B), e raiz (~50%, Figuras 2C), da  
1637 área foliar (~65%, Figura 2D) e do comprimento do caule (~35%, Figura 2E), quando  
1638 comparados ao controle. Por outro lado, plantas elicidadas apenas com melatonina  
1639 apresentaram o menor comprimento da raiz (Figura 2F).

### 1640 **Estresse hídrico reduz os teores de pigmentos**

1641 Os teores de clorofilas, carotenoides e antocianinas foram drasticamente  
1642 reduzidos em plantas de *P. glomerata* sob estresse hídrico, independente da presença de  
1643 melatonina em combinação ou não (Figura 3). Comparado com as plantas do controle,  
1644 as plantas dos tratamentos que foram adicionados PEG e Melat+PEG reduziram cerca  
1645 de 75, 65, 70, 60 e 55% os teores de Chl *a*, Chl *b*, Chl total, carotenoides e antocianina,  
1646 respectivamente.

### 1647 **Metabolismo primário de *P. glomerata* é afetado sob estresse hídrico e melatonina**

1648 Em condições de estresse hídrico, aumentou o teor dos açúcares (glicose, frutose  
1649 e sacarose) nas folhas de *P. glomerata* (Figuras 4A, 4C e 4D) tratadas com PEG e  
1650 Melat+PEG, quando comparadas ao controle. Além disso, a associação PEG 4000 e  
1651 melatonina reduziu glicose e frutose e elevou o teor de sacarose das raízes (Figuras 4B e  
1652 4D). Por outro lado, não houve diferença significativa nos teores destes açúcares em  
1653 plantas expostas apenas à Melat.

1654 O conteúdo de amido das folhas (Figura 4G) foi reduzido significativamente nas  
1655 plantas tratadas com melatonina, com e sem estresse hídrico. Comparadas ao controle, o  
1656 conteúdo de amido foi maior (~70%) em raízes de plantas tratadas somente com  
1657 melatonina (Figura 4H).

### 1658 **Estresse hídrico aumenta a concentração de aminoácidos e prolina e reduz de** 1659 **proteínas nas folhas**

1660 A concentração de aminoácidos e prolina foi maior nas plantas sob estresse  
1661 hídrico (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D). As plantas estressadas apresentaram aumento de  
1662 aproximadamente 50% no teor de aminoácidos das raízes e 365% no teor de prolina das  
1663 folhas, quando comparadas ao controle. O teor de proteínas nas folhas (Figura 5E) foi  
1664 reduzido significativamente em condições de estresse hídrico, porém, essa redução foi  
1665 atenuada quando adicionada melatonina às plantas estressadas. As raízes das plantas sob  
1666 condição de estresse associada com melatonina exibiram maior concentração de  
1667 proteínas (Figura 5F).

#### 1668 **Condição de estresse hídrico e melatonina afetam a atividade das enzimas do** 1669 **estresse oxidativo**

1670 A atividade da enzima CAT foi maior nas folhas de *P. glomerata* dos  
1671 tratamentos com melatonina (Melat+PEG e Melat), quando comparadas ao controle.  
1672 Nas raízes de plantas cultivadas sob estresse com apenas PEG houve maior atividade da  
1673 CAT; porém, comparadas ao controle, a atividade da enzima não foi alterada quando a  
1674 melatonina e PEG foram associados (Figura 6B). Resultado similar foi observado para a  
1675 enzima POD, nas folhas, os tratamentos com melatonina resultaram em maior atividade,  
1676 entretanto, nas raízes, o uso de melatonina não teve efeito significativo sobre o aumento  
1677 da atividade da enzima provocado pelo estresse hídrico.

1678 Em folhas de *P. glomerata* a atividade da enzima APX não apresentou diferença  
1679 significativa entre os tratamentos (Figura 6C). Nas raízes, a atividade da APX foi  
1680 significativamente maior em plantas do tratamento sob estresse hídrico, no entanto, ao  
1681 aplicar melatonina na condição de estresse, não houve maior atividade da APX em  
1682 comparação com as plantas do controle (Figura 6D). Já a enzima SOD, teve sua  
1683 atividade aumentada nas raízes de plantas tratadas somente com melatonina, não  
1684 apresentando diferença estatística significativa entre os tratamentos nas folhas (Figura  
1685 6G e 6H).

#### 1686 **Melatonina atenua o aumento nos teores de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas sob estresse** 1687 **hídrico**

1688 Foi observado um aumento significativo no teor de MDA nas plantas de *P.*  
1689 *glomerata* sob estresse hídrico, entretanto, quando associado melatonina e estresse  
1690 hídrico, esse aumento foi atenuado (Figuras 7A e 7B). O teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi maior nas  
1691 folhas das plantas estressadas e, embora não significativo, a adição de melatonina

1692 também levou à uma atenuação desse efeito (Figura 7C). Em raízes (Figura 7D),  
1693 observou o maior teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observado em plantas elicitadas com Melat+PEG,  
1694 enquanto que o menor teor foi em Melat.

1695 **O acúmulo de 20E é reduzido em folhas de *P. glomerata* sob estresse hídrico**

1696 O teor de 20E foi significativamente menor em folhas de *P. glomerata*  
1697 cultivadas sob condição de estresse hídrico (Figura 8), combinado ou não com  
1698 melatonina. Por outro lado, a elicitação apenas com melatonina não afetou o acúmulo de  
1699 20E, comparado ao controle.

1700 **DISCUSSÃO**

1701 O déficit hídrico é uma das principais restrições ambientais que afetam o  
1702 desenvolvimento das plantas, pois limita a absorção de nutrientes, reduz a taxa  
1703 fotossintética e a abertura estomática, bem como pode levar ao aumento do estresse  
1704 oxidativo (Reddy *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2019). Como  
1705 consequência, as plantas podem apresentar redução da altura, senescência e queda das  
1706 folhas, o que resulta em menor acúmulo de biomassa (Seleiman, *et al.*, 2021). Nesse  
1707 trabalho, observamos que plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* sob estresse  
1708 hídrico apresentaram redução significativa na área foliar e no comprimento do caule.  
1709 Apesar dessa resposta ser uma estratégia que permite a planta reduzir a superfície de  
1710 transpiração e a necessidade de água em um ambiente limitante, resultou também em  
1711 uma redução da biomassa. Chagas (2019) e Silva (2022), também relataram redução nos  
1712 parâmetros de crescimento em plantas de *P. glomerata* submetidas ao déficit hídrico.

1713 As plantas desenvolvem várias estratégias de tolerância a estresses, como a  
1714 produção de diferentes solutos osmoprotetores, incluindo proteínas solúveis,  
1715 aminoácidos livres totais e prolina, que contribuem para o ajuste osmótico celular,  
1716 estabilização de enzimas e proteínas, eliminação de ROS e manutenção da integridade  
1717 da membrana (Bartels & Sunkar, 2005; Dawood & El-Awadi, 2015; Zeng *et al.*, 2018).  
1718 No presente estudo, as plantas de *P. glomerata* submetidas ao déficit hídrico  
1719 apresentaram incremento nos teores de aminoácidos e prolina. Por outro lado, a  
1720 concentração de proteínas nas folhas foi significativamente menor em condição de  
1721 estresse, porém essa redução foi atenuada pela combinação com melatonina. Em  
1722 condições desfavoráveis para as plantas pode ocorrer a ação de proteases, degradando  
1723 proteínas para a síntese de compostos nitrogenados, como aminoácidos, que podem  
1724 auxiliar no ajuste osmótico da planta (Debouba *et al.*, 2006; Sankar *et al.*, 2007).  
1725 Resultados semelhantes na redução de proteínas e aumento de aminoácidos foram  
1726 encontrados por Lobato *et al.* (2008) investigando os efeitos do déficit hídrico em soja  
1727 (*Glycine max*). A aplicação de melatonina também atenuou a redução no teor de  
1728 proteínas causada pela seca em videiras (*Vitis vinifera*) (Meng *et al.*, 2014).

1729 Observamos um aumento no conteúdo de açúcares solúveis, como glicose,  
1730 frutose e sacarose, em plantas submetidas ao déficit hídrico. O acúmulo de moléculas  
1731 osmorreguladoras ocorre como resposta adaptativa das plantas ao estresse, ajuda na  
1732 manutenção do turgor das células, evitando a desidratação dos tecidos e preserva as

1733 funções celulares, além disso, os açúcares solúveis podem atuar como antioxidantes,  
1734 neutralizando ROS e evitando danos oxidativos (Van den Ende & Valluru, 2009;  
1735 Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2020).

1736 Nossos resultados também mostraram aumento na produção de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
1737 nos tratamentos sob estresse hídrico, o que pode ter contribuído para a redução dos  
1738 teores de pigmentos. O estresse hídrico pode levar a um aumento na geração de ROS  
1739 como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causar a peroxidação lipídica, e conseqüentemente promover a degradação  
1740 das clorofilas (Farooq *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram relatados em  
1741 amêndoas (*Prunus dulcis*) e pistache (*Pistacia vera*), em que o estresse hídrico,  
1742 induzido pelo PEG, reduziu significativamente os teores de clorofilas e carotenoides  
1743 (Yadollahi *et al.*, 2011; Khoyerdi *et al.*, 2016).

1744 O dano oxidativo causado pelo acúmulo de ROS é a principal consequência dos  
1745 estresses ambientais. Para lidar com esse dano, as plantas desenvolveram um eficiente  
1746 mecanismo de defesa antioxidante, incluindo o aumento da atividade de enzimas, como  
1747 CAT, APX, SOD e POD (Wang *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2017; Naeem *et al.*, 2018). A  
1748 melatonina contribui na eliminação dos radicais livres (Galano *et al.*, 2013; Reiter *et al.*,  
1749 2007), no aumento da atividade de enzimas do estresse oxidativo (Li *et al.*, 2012; Park  
1750 *et al.*, 2013) e na diminuição da peroxidação lipídica (Han *et al.*, 2017; Imran *et al.*,  
1751 2021), sendo uma molécula sinalizadora importante na defesa das plantas contra  
1752 estresses (Tan *et al.*, 2012). Neste trabalho, verificamos que a melatonina levou a um  
1753 aumento da atividade das enzimas do estresse oxidativo CAT e POD e a uma redução  
1754 dos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA nas folhas de plantas submetidas ao estresse hídrico. Já nas  
1755 raízes, a condição de estresse resultou em aumento da atividade das enzimas CAT, APX  
1756 e POD. Resultados similares foi observado por Li *et al.* (2014) em espécies de macieira  
1757 (*Malus prunifolia* e *Malus hupehensis*).

1758 O déficit hídrico é um dos mais importantes estresses ambientais que pode  
1759 alterar as propriedades fisiológicas e bioquímicas das plantas e, conseqüentemente,  
1760 aumentar ou diminuir a concentração de metabólitos secundários nos tecidos vegetais  
1761 (Yamaner & Erdag, 2013). No presente trabalho, o estresse causado pela adição de PEG  
1762 no meio de cultura reduziu pela metade o teor de 20E de folhas de *P. glomerata*  
1763 cultivadas *in vitro*. Por outro lado, a elicitação com melatonina não levou a alterações  
1764 significativas no acúmulo desse composto.

1765 As vias biossintéticas da maioria dos metabólitos secundários em plantas, assim  
1766 como do 20E, são pouco elucidadas, tornando difícil prever os efeitos da elicitação

1767 (Gupta *et al.*, 2015). Muitos fatores influenciam a produção de metabólitos, podendo  
1768 variar dependendo da espécie da planta, da severidade e duração do estresse. Em  
1769 condições adversas, as plantas podem modificar a biossíntese e o acúmulo de diversos  
1770 compostos, priorizando a alocação de recursos para processos essenciais à  
1771 sobrevivência e crescimento (Vasconsuelo & Boland, 2007; Naik & Al-Khayri, 2016).  
1772 Sob condição de estresse hídrico as concentrações de dois metabólitos secundários,  
1773 hipericina e pseudo-hipericina, foram reduzidas em plantas de *Hypericum perforatum*  
1774 (Zobayed *et al.*, 2007).

1775         Em conclusão, nossos resultados sugerem que o estresse hídrico reduz o  
1776 crescimento e acúmulo de biomassa, eleva a produção de MDA e ROS, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e  
1777 afeta o metabolismo primário e secundário de *P. glomerata* cultivada *in vitro*. Em  
1778 contrapartida, as plantas apresentaram uma série de respostas de tolerância ao estresse,  
1779 como a produção de solutos osmorreguladores e o aumento da atividade de enzimas do  
1780 estresse oxidativo. A melatonina induziu respostas cruciais na mitigação do estresse,  
1781 reduzindo a peroxidação lipídica, evitando a degradação de proteínas, aumentando a  
1782 atividade de enzimas antioxidantes e aliviando o estresse oxidativo causado pela  
1783 condição de estresse. Este trabalho fornece novas evidências sobre as consequências do  
1784 déficit hídrico e o uso de biorreguladores, como a melatonina, nas respostas de  
1785 tolerância ao estresse em plantas de *P. glomerata*.

1786 **REFERÊNCIAS**

- 1787 Bartels, D., Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in*  
 1788 *Plant Sciences*, 24(1), 23-58.
- 1789 Batista, D. S., Dias, L. L. C., Rêgo, M. M. D., Saldanha, C. W., Otoni, W. C. (2017).  
 1790 Flask sealing on in vitro seed germination and morphogenesis of two types of  
 1791 ornamental pepper explants. *Ciência Rural* 47:1–6.
- 1792 Batista, D. S., Koehler, A. D., Romanel, E., de Souza, V. C., Silva, T. D., Almeida, M.  
 1793 C., Maciel, T. E. F., Ferreira, P. R. B., Felipe, S. H. S., Saldanha, C. W., Maldaner, J.,  
 1794 Dias, L. L. C., Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C. (2019a). *De novo* assembly and  
 1795 transcriptome of *Pfaffia glomerata* uncovers the role of photoautotrophy and the P450  
 1796 family genes in 20-hydroxyecdysone production. *Protoplasma*, 256, 601-614.
- 1797 Batista, D. S., Moreira, V. S., Felipe, S. H. S., Fortini, E. A., Silva, T. D., Chagas, K.,  
 1798 Otoni, W. C. (2019b). Reference gene selection for qRT-PCR in Brazilian-ginseng  
 1799 [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] as affected by various abiotic factors. *Plant Cell,*  
 1800 *Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138, 97-107.
- 1801 Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in  
 1802 support of plant production. *Plant, Cell & Environment*, 40(1), 4-10.
- 1803 Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W.  
 1804 (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *The FEBS*  
 1805 *Journal*, 277(9), 2022-2037.
- 1806 Caleffi, E. R.; Krausová, G.; Hyršlová, I.; Paredes, L. L. R.; Dos Santos, M. M.;  
 1807 Sasaki, G. L.; Gonçalves, R. A. C.; De Oliveira, A. J. B. (2015). Isolation and prebiotic  
 1808 activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots.  
 1809 *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 392–399.
- 1810 Caverzan, A., Casassola, A., Brammer, S. P. (2016). Reactive oxygen species and  
 1811 antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. *Abiotic and biotic stress in*  
 1812 *plants-recent advances and future perspectives*, 17, 463-480.

- 1813 Chagas, K. (2019). Morpho-physiological evaluation of *Pfaffia glomerata* (Spreng.)  
1814 Pedersen accessions grown under photoautotrophy and water stress conditions. Tese de  
1815 Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.
- 1816 Chance, B., Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods*  
1817 *Enzymology*, 2:764–775.
- 1818 Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., Mittler, R. (2017). Reactive oxygen  
1819 species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- 1820 Corrêa, J. P. O., Vital, C. E., Pinheiro, M. V. M., Batista, D. S. Azevedo, J. F. L.,  
1821 Saldanha, C. W., Cruz, A. C. F., DaMatta, F. M., Otoni, W. C. (2015). In vitro  
1822 photoautotrophic potential and ex vitro photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata*  
1823 (Spreng.) Pedersen accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121:289–300.
- 1824 Cross, J. M., Von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y.,  
1825 Palacios, N., Stitt, M. (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24  
1826 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*,  
1827 142:1574–1588.
- 1828 Cruz, C. D. (2016). Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and  
1829 Selegen. *Acta Scientiarum Agronomy*, 38:547.
- 1830 Cui, G., Zhao, X., Liu, S., Sun, F., Zhang, C., Xi, Y. (2017). Beneficial effects of  
1831 melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. *Plant Physiology and*  
1832 *Biochemistry*, 118, 138-149.
- 1833 Dawood, M. G., El-Awadi, M. E. (2015). Alleviation of salinity stress on *Vicia faba* L.  
1834 plants via seed priming with melatonin. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 223-235.
- 1835 Debouba, M., Gouia, H., Suzuki, A., Ghorbel, M. H. (2006). NaCl stress effects on  
1836 enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato “*Lycopersicon*  
1837 *esculentum*” seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 163(12), 1247-1258.
- 1838 Dias, F. C. R., Martins, A. L. P., Melo, F. C. S. A., Cupertino, M. C., Gomes, M. L. M.,  
1839 Oliveira, J. M., Damasceno, E. M., Silva, J., Otoni, W. C., Matta, S. L. P. (2019).  
1840 Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous

- 1841 tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the  
1842 mice testes. *Journal of Ethnopharmacology* 233:179–189.
- 1843 Dinan, L., Harmatha, J., Volodin, V., Lafont, R. (2009). Phytoecdysteroids: diversity,  
1844 biosynthesis and distribution. *Ecdysone: Structures and Functions*. Netherlands p. 3–45.
- 1845 Du, Y., Zhao, Q., Chen, L., Yao, X., Zhang, W., Zhang, B., Xie, F. (2020). Effect of  
1846 drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. *Plant*  
1847 *Physiology and Biochemistry*, 146, 1-12.
- 1848 Ebad, F. A., Hussein, E. A., Hussein, N. A. A. (2017). Impact of biotic and abiotic  
1849 elicitation on morphology, growth, active constituents and antibacterial activity of  
1850 *Solanum nigrum* (L.) calli induced *in vitro*. *Egyptian Journal of Desert Research*, 67(1),  
1851 47-63.
- 1852 Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., Chen, L. (2018). Melatonin: a multifunctional factor in  
1853 plants. *International Journal Molecular Sciences* 19: 1528.
- 1854 Fang, Y., Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their  
1855 application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life*  
1856 *Sciences*, 72, 673-689.
- 1857 Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., Basra, S. M. A.  
1858 (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable*  
1859 *Agriculture*, 153-188.
- 1860 Felipe, S. H. S., Batista, D. S., Chagas, K., Correia, L. N. F., Silva, T. D., Fortini, E. A.,  
1861 Silva, P. O., Otoni, W. C. (2019a). Accessions of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*)  
1862 with contrasting anthocyanin content behave differently in growth, antioxidative  
1863 defense, and 20-hydroxyecdysone levels under UV-B radiation. *Protoplasma* 256(6):  
1864 1557–1571.
- 1865 Felipe, S. H. S., Batista, D. S., Vital, C. E., Chagas, K., Silva, P. O., Silva, T. D., Otoni,  
1866 W. C. (2019b). Salinity-induced modifications on growth, physiology and 20-  
1867 hydroxyecdysone levels in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].  
1868 *Plant Physiology and Biochemistry*, 140, 43-54.

- 1869 Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G., Kruger, N. J. (2001). Fructose 2,6-  
1870 bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and  
1871 increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*,  
1872 212:250–263.
- 1873 Festucci-Buselli, R. A., Contim, L. A. S., Barbosa, L. C. A., Stuart, J., Otoni, W. C.  
1874 (2008b). Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata*  
1875 development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20:305–311.
- 1876 Fortini, E. A., Batista, D. S., Felipe, S. H. S., Silva, T. D., Correia, L. N. F., Farias, L.  
1877 M., Faria, D. V., Pinto, V. B., Santa-Catarina, C., Silveira, V., De-la-Peña, C., Castillo-  
1878 Castro, E., Otoni, W. C. (2023). Physiological, epigenetic, and proteomic responses in  
1879 *Pfaffia glomerata* growth *in vitro* under salt stress and 5-azacytidine. *Protoplasma*,  
1880 260(2), 467-482.
- 1881 Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of  
1882 photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 154, 134-142.
- 1883 Franco, R. R., Takata, L. A., Chagas, K., Justino, A. B., Saraiva, A. L., Goulart, L. R.,  
1884 Ávila, V. M. R., Otoni, W. C., Espindola, F. S., Silva, C. R. (2021). A 20-  
1885 hydroxyecdysone-enriched fraction from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen roots  
1886 alleviates stress, anxiety, and depression in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 267:  
1887 113599.
- 1888 Galano, A., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of  
1889 melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of Pineal Research*, 54:245–257.
- 1890 Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher  
1891 plants. *Plant Physiology* 59:309–14.
- 1892 Gupta, P., Sharma, S., Saxena, S. (2015). Biomass yield and steviol glycoside  
1893 production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline  
1894 and polyethylene glycol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 863-874.
- 1895 Gupta, P., Sharma, S., Saxena, S. (2016). Effect of abiotic stress on growth parameters  
1896 and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) raised *in vitro*. *Journal of*  
1897 *Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(4), 160-167.

- 1898 Gururani, M. A., Venkatesh, J., Tran, L. S. P. (2015). Regulation of photosynthesis  
1899 during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant*, 8(9), 1304-1320.
- 1900 Havir, E. A., McHale, N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of  
1901 multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450–5.
- 1902 Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Modarres-Sanavy, S. A. M., Mokhtassi-Bidgoli,  
1903 A., Nicola, S. (2016). Effects of water stress and light intensity on chlorophyll  
1904 fluorescence parameters and pigments of *Aloe vera* L. *Plant Physiology and*  
1905 *Biochemistry*, 106, 141-148.
- 1906 Heath, R. L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics  
1907 and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*  
1908 125:189–198.
- 1909 Jan, N., Qazi, H. A., Ramzan, S., John, R. (2018). Developing stress-tolerant plants  
1910 through *in vitro* tissue culture: family Brassicaceae. *Biotechnologies of crop*  
1911 *improvement, volume 1: cellular approaches*, 327-372.
- 1912 Kamada, T., Picoli, E., Vieira, R., Barbosa, L. C. A., Cruz, C. D., Otoni, W. C. (2009).  
1913 Variation of morphological and physiological characters in natural populations of  
1914 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and their correlation with  $\beta$ -ecdysone production.  
1915 *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 11(3): 247-256.
- 1916 Kanojia, A., Dijkwel, P. P. (2018). Abiotic stress responses are governed by reactive  
1917 oxygen species and age. *Annual plant reviews online*, 295-326.
- 1918 Khoyerdi, F. F., Shamshiri, M. H., Estaji, A. (2016). Changes in some physiological and  
1919 osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. *Scientia*  
1920 *Horticulturae*, 198, 44-51.
- 1921 Koyro, H. W., Ahmad, P., Geissler, N. (2012). Abiotic stress responses in plants: an  
1922 overview. *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate*  
1923 *change*, 1-28.
- 1924 Lamaoui M, Jemo M, Datla R, Bekkaoui F. (2018). Heat and drought stresses in crops  
1925 and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6, 26.

- 1926 Li, C., Tan, D. X., Liang, D., Chang, C., Jia, D., Ma, F. (2015). Melatonin mediates the  
1927 regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two  
1928 *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 669–680.
- 1929 Li, C., Wang, P., Wei, Z. W., Liang, D., Liu, C, H., Yin, L., Jia, D. F., Fu, M. Y. Ma, F.  
1930 W. (2012). The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in  
1931 *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 53:298–306.
- 1932 Liang, D., Ni, Z., Xia, H., Xie, Y., Lv, X., Wang, J., Lin, L., Deng, Q., Luo, X. (2019).  
1933 Exogenous melatonin promotes biomass accumulation and photosynthesis of kiwifruit  
1934 seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae* 246:34–43.
- 1935 Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2006). Gas  
1936 chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature*  
1937 *Protocols* 1: 387–396.
- 1938 Lobato, A. K. S., Neto, C. F. O., Filho, B. G. S., Costa, R. C. L., Cruz, F. J. R., Neves,  
1939 H. K. B., Lopes, M. J. S. (2008). Physiological and biochemical behavior in soybean  
1940 (*Glycine max* cv. Sambaiba) plants under water deficit. *Australian Journal of Crop*  
1941 *Science*, 2(1), 25-32.
- 1942 Machackova, I., Vagner, M., Slama, K. Comparison between the effects of 20-  
1943 hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants. *European*  
1944 *Journal of Entomology* 92:309–316, 1995.
- 1945 Mazzeo, G. C. C. S., Cortez, F. S., Pusceddu, F. H.; Santos, A. R., Guimarães, L. L.,  
1946 Amaral, F. P., Silva, M. P. O., Toma, W. (2013). Avaliação da atividade  
1947 antiulcerogênica e ecotoxicológica do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das  
1948 folhas de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). *UNISANTA*  
1949 *BioScience* 2:75–80.
- 1950 Mendes, F. R. (2011). Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk  
1951 medicine. *Revista Brasileira Farmacognosia* 21:754–763.
- 1952 Meng, J. F., Xu, T. F., Wang, Z. Z., Fang, Y. L., Xi, Z. M., Zhang, Z. W. (2014). The  
1953 ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttings under water-deficient

- 1954 stress: antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology. *Journal of*  
1955 *Pineal Research*, 57(2), 200-212.
- 1956 Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. U. L. T. A. N., Mittler, R. O. N. (2010).  
1957 Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity  
1958 stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453-467.
- 1959 Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with  
1960 tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473–497.
- 1961 Naeem, M., Naeem, M. S., Ahmad, R., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Ihsan, M. Z.,  
1962 Abdullah, M. (2018). Improving drought tolerance in maize by foliar application of  
1963 boron: water status, antioxidative defense and photosynthetic capacity. *Archives of*  
1964 *Agronomy and Soil Science*, 64(5), 626-639.
- 1965 Naik, P. M., Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors-role in secondary  
1966 metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. *Abiotic and biotic*  
1967 *stress in plants - recent advances and future perspectives*. Rijeka: InTech, 247-277.
- 1968 Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific  
1969 peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867–880.
- 1970 Neff, M. M., Chory, J. (1998). Genetic interactions between phytochrome A,  
1971 phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant*  
1972 *Physiology*.
- 1973 Neto, A. G., Costa, J. M. L. C., Belati, C., Vinholis, A. H. C., Possebom, L. S., Da Silva  
1974 Filho, A. A., Cunha, W. R., Carvalho, J. C. T., Bastos, J. K., Silva, M. L. A. (2005).  
1975 Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata*  
1976 (Spreng.) Pedersen. *Journal of Ethnopharmacology* 96:87–91.
- 1977 Neves, C. S., Gomes, S. S. L., Dos Santos, T. R., De Almeida, M. M., De Souza, Y. O.,  
1978 Garcia, R. M. G, Otoni, W. C., Raposo, N. B. R., Viccini, L. F., Campos, J. M. S.  
1979 (2016). “Brazilian ginseng” (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen, Amaranthaceae)  
1980 methanolic extract: cytogenotoxicity in animal and plant assays. *South African Journal*  
1981 *of Botany* 106:174–180.

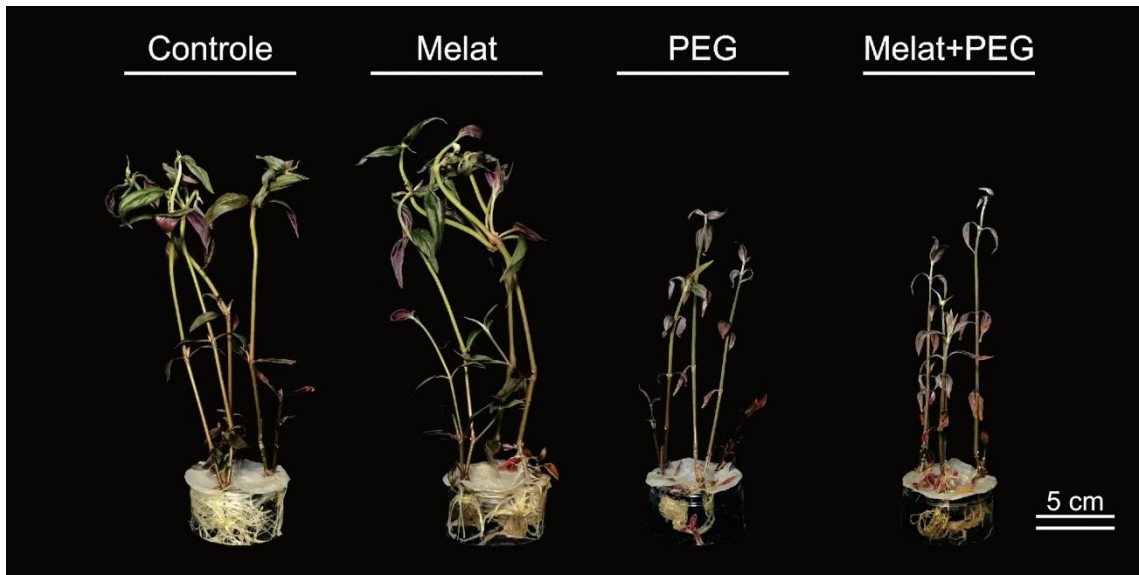
- 1982 Oliveira, S. D., Leite, A. G., Hossy, B. H., & Angeli, R. (2013). Análise de patentes  
1983 envolvendo plantas transgênicas mais tolerantes a estresse abiótico. *Revista GEINTEC-*  
1984 *Gestão, Inovação e Tecnologias* 3(5): 42–55.
- 1985 Park, S., Lee, D. E., Jang, H., Byeon, Y., Kim, Y. S., Back, K. (2013). Melatonin-rich  
1986 transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *Journal of*  
1987 *Pineal Research*, 54:258–263.
- 1988 Pereira, A. S., Dorneles, A. O. S., Bernardy, K., Sasso, V. M., Bernardy, D., Possebom,  
1989 G., Rossato, L. V., Dressler, V. L., Tabaldi, L. A. (2018). Selenium and silicon reduce  
1990 cadmium uptake and mitigate cadmium toxicity in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen  
1991 plants by activation antioxidant enzyme system. *Environmental Science and Pollution*  
1992 *Research*, 25, 18548-18558.
- 1993 Pérez-Clemente, R. M., Gómez-Cadenas, A. (2012). *In vitro* tissue culture, a tool for the  
1994 study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. *Recent advances in*  
1995 *plant in vitro culture*, 91-108.
- 1996 Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate  
1997 extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b*  
1998 extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll  
1999 standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975, 384-  
2000 394.
- 2001 Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P., Dhawan, A. K. (2011). Developing  
2002 stress tolerant plants through *in vitro* selection - an overview of the recent progress.  
2003 *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 89-98.
- 2004 Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses  
2005 of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant*  
2006 *Physiology* 161:1189–1202.
- 2007 Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Flores, L. J., Czarnocki, Z. (2007). Melatonin  
2008 and its metabolites: new findings regarding their production and their radical  
2009 scavenging actions. *Acta Biochemica Polonica*, 54:1–9.

- 2010 Reiter, R.J., Tan, D.X., Zhou, Z., Cruz, M.H.C., Fuentes-Broto, L., Galano, A. (2015).  
 2011 Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules* 20: 7396–7437.
- 2012 Roy, R., Sultana, S., Begum, N., Fornara, D., Barmon, M., Zhang, R., Sarker, T.,  
 2013 Rabbany, M. G. (2021). Exogenous melatonin reduces water deficit-induced oxidative  
 2014 stress and improves growth performance of *Althaea rosea* grown on coal mine spoils.  
 2015 *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(41), 61550-61560.
- 2016 Saidi, I., Yousfi, N., Borgi, M. A. (2017). Salicylic acid improves the antioxidant ability  
 2017 against arsenic-induced oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) seedling.  
 2018 *Journal Plant Nutrition* 40:2326–2335.
- 2019 Sanders, G. J., Arndt, S. K. (2012). Osmotic adjustment under drought conditions. *Plant*  
 2020 *responses to drought stress: From morphological to molecular features*, 199-229.
- 2021 Sankar, B., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R.,  
 2022 Panneerselvam, R. (2007). Drought-induced biochemical modifications and proline  
 2023 metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Acta Botanica Croatica*, 66(1), 43-  
 2024 56.
- 2025 Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25  
 2026 years of image analysis". *Nature Methods* 9:671–675.
- 2027 Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y.,  
 2028 Dindaroglu, T., Wajid, H. H. A., Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on  
 2029 plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259.
- 2030 Silva, T. D. (2022). Morphophysiology and 20-hydroxyecdysone production in *Pfaffia*  
 2031 *glomerata* (Spreng.) Pedersen in response to CO<sub>2</sub>-enrichment and drought stress. Tese  
 2032 de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.
- 2033 Souza Daniel, J. F., Alves, K. Z., Silva Jacques, D., Silva E Souza, P. V., Carvalho, M.  
 2034 G., Freire, R. B., Ferreira, D.T, Freire, M. F. I. (2005). Free radical scavenging activity  
 2035 of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). *Indian Journal of*  
 2036 *Pharmacology* 37:174.

- 2037 Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. (2014). Abiotic and  
2038 biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.
- 2039 Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S.,  
2040 Reiter, R. J. (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in  
2041 nutritional and agricultural science. *Journal of Experimental Botany*, 63:577–597.
- 2042 Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in plant*  
2043 *science*, 5, 771.
- 2044 Turkan, I., Uzilday, B., Dietz, K. J., Bräutigam, A., Ozgur, R. (2018). Reactive oxygen  
2045 species and redox regulation in mesophyll and bundle sheath cells of C4 plants. *Journal*  
2046 *of Experimental Botany*, 69(14), 3321-3331.
- 2047 Turner, N. C. (2018). Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress.  
2048 *Journal of experimental botany*, 69(13), 3223-3233.
- 2049 Van den Ende, W., Valluru, R. (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and  
2050 oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 9-  
2051 18.
- 2052 Vasconsuelo, A., Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation  
2053 of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), 861-875.
- 2054 Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant  
2055 systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant*  
2056 *Science*, 151(1), 59–66.
- 2057 Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006).  
2058 Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic  
2059 stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.
- 2060 Wang, L. Y., Liu, J. L., Wang, W. X., Sun, Y. (2016). Exogenous melatonin improves  
2061 growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress.  
2062 *Photosynthetica*, 54, 19-27.
- 2063 Wang, Y., Guo, D., Wang, J., Tian, B., Li, Y., Sun, G., Zhang, H. (2022). Exogenous  
2064 melatonin alleviates NO<sub>2</sub> damage in tobacco leaves by promoting antioxidant defense,

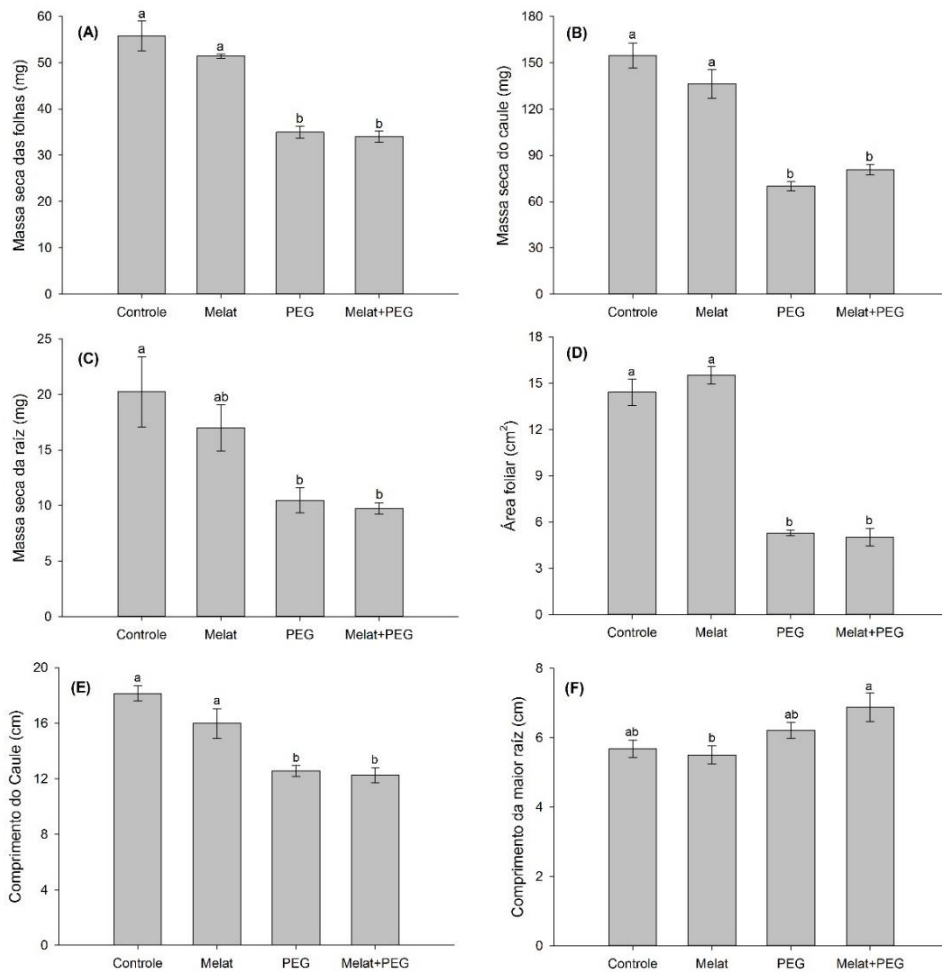
- 2065 modulating redox homeostasis, and signal transduction. *Journal of Hazardous Materials*,  
2066 424, 127265.
- 2067 Xalxo, R., Keshavkant, S. (2019). Melatonin, glutathione and thiourea attenuates lead  
2068 and acid rain-induced deleterious responses by regulating gene expression of  
2069 antioxidants in *Trigonella foenum graecum* L. *Chemosphere* 221: 1–10.
- 2070 Yadollahi, A., Arzani, K., Ebadi, A., Wirthensohn, M., Karimi, S. (2011). The response  
2071 of different almond genotypes to moderate and severe water stress in order to screen for  
2072 drought tolerance. *Scientia Horticulturae*, 129(3), 403-413.
- 2073 Yamaner, O., Erdag, B. (2013). Effects of sucrose and polyethylene glycol on  
2074 hypericins content in *Hypericum adenotrichum*. *EurAsian Journal BioSciences*, 7:101–  
2075 110.
- 2076 Yang, S., Zhao, Y., Qin, X., Ding, C., Chen, Y., Tang, Z., Huang, Y., Reiter, R. J.,  
2077 Yuan, S., Yuan, M. (2022). New insights into the role of melatonin in photosynthesis.  
2078 *Journal of Experimental Botany*, 73(17), 5918-5927.
- 2079 Zeng, L., Cai, J. S., Li, J. J., Lu, G. Y., Li, C. S., Fu, G. P., Cheng, Y. (2018).  
2080 Exogenous application of a low concentration of melatonin enhances salt tolerance in  
2081 rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*, 17: 328-335.
- 2082 Zhan, H., Nie, X., Zhang, T., Li, S., Wang, X., Du, X., Tong, W., Song, W. (2019).  
2083 Melatonin: a small molecule but important for salt stress tolerance in plants.  
2084 *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3): 709.
- 2085 Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-  
2086 324.
- 2087 Zobayed, S. M. A., Afreen, F., Kozai, T. (2007). Phytochemical and physiological  
2088 changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition.  
2089 *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 109-116.

2090 FIGURAS



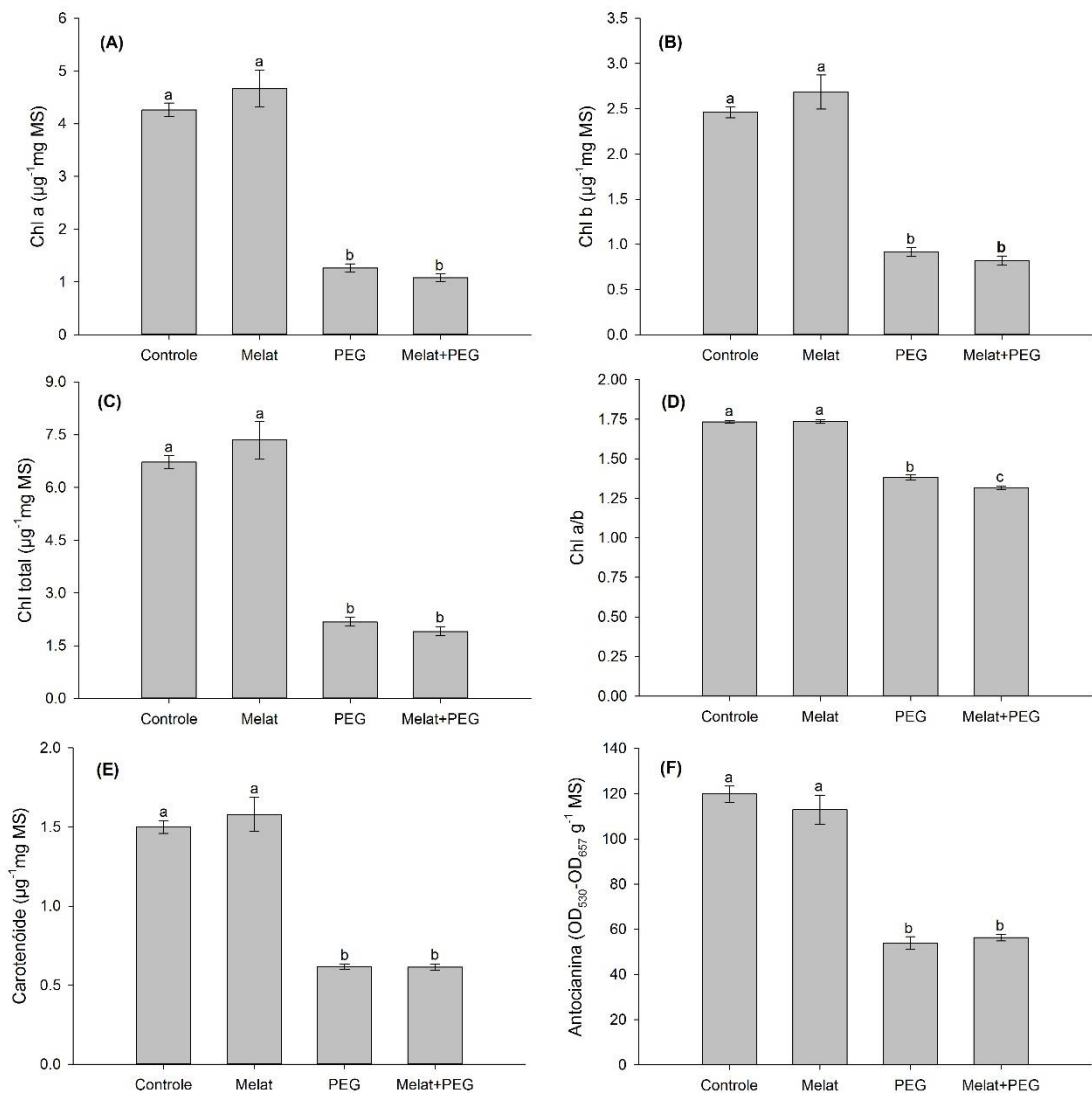
2091

2092 **Figura 1.** Plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro*, expostas à  
 2093 melatonina (Melat) e sob estresse hídrico (PEG). Barra = 5 cm.



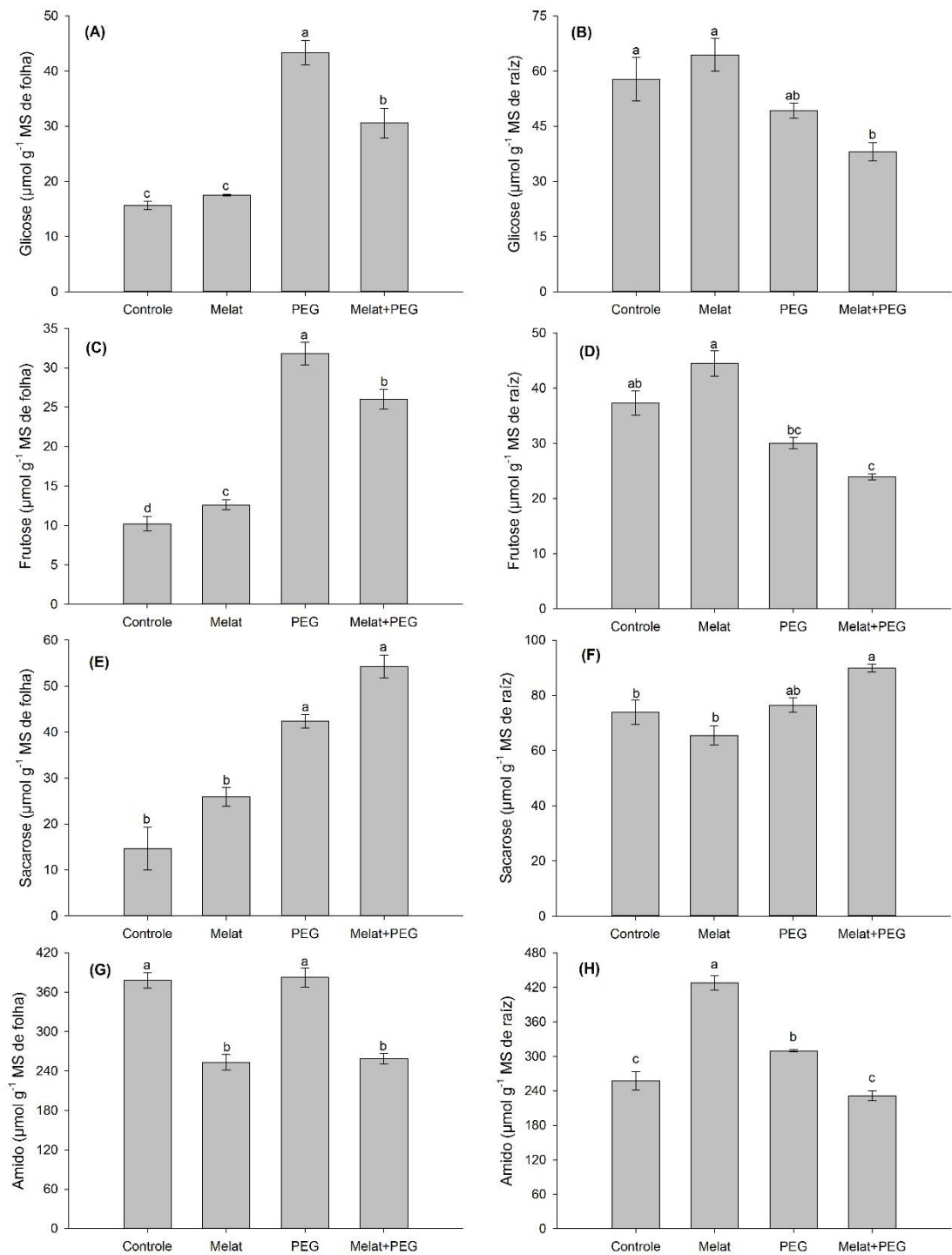
2094

2095 **Figura 2.** Análises de crescimento de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro*  
 2096 tratadas com melatonina (Melat) e sob estresse hídrico (PEG). Médias seguidas pela  
 2097 mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados  
 2098 apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n=4).  
 2099



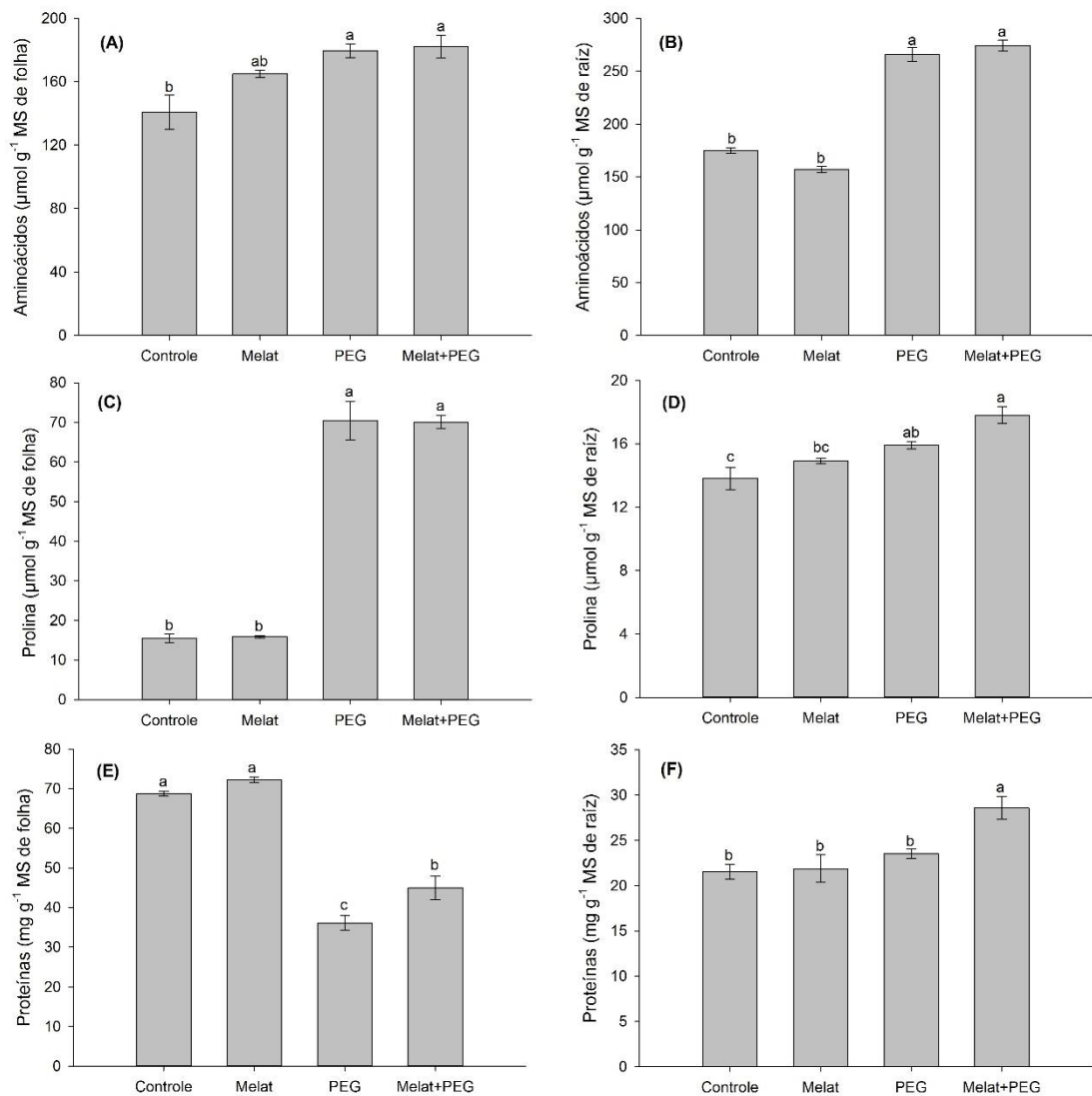
2100

2101 **Figura 3.** Teores de pigmentos em *Pfaffia glomerata* tratadas com melatonina (Melat) e  
 2102 sob estresse hídrico (PEG) após 35 dias de cultivo *in vitro*. Chl *a*, Clorofila *a*; Chl *b*,  
 2103 Clorofila *b*; Chl *a/b*, Razão entre chl *a* e chl *b*; MS, Biomassa seca. Médias seguidas  
 2104 pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados  
 2105 apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n=4).



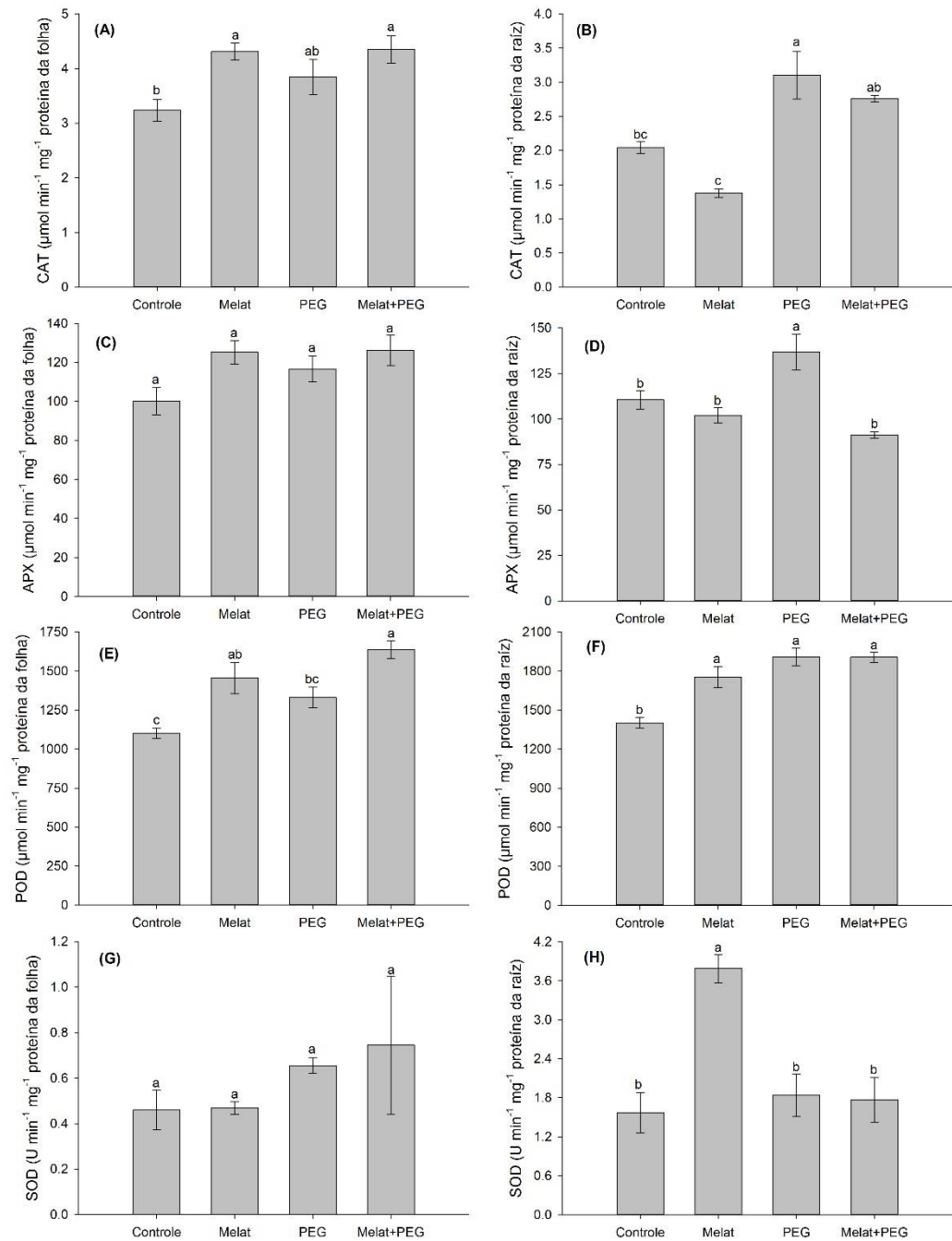
2106

2107 **Figura 4.** Concentração de metabólitos primários em folhas (A, C, E, G) e raízes (B, D,  
 2108 F, H) de *Pfaffia glomerata* tratadas com melatonina (Melat) e sob estresse hídrico  
 2109 (PEG) após 35 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 2110 entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores  
 2111 médios  $\pm$  erro padrão (n=4).



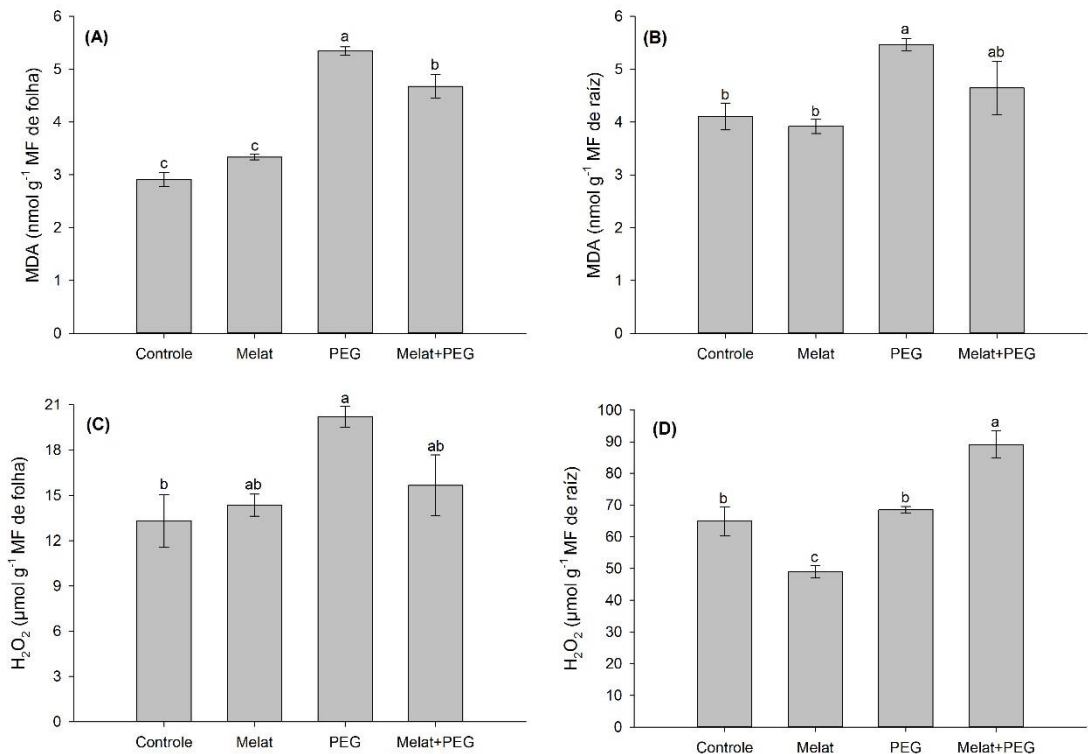
2112

2113 **Figura 5.** Concentração de aminoácidos, prolina e proteínas em folhas (A, C, E) e raízes  
 2114 (B, D, F) de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* expostas à melatonina  
 2115 (Melat) e sob estresse hídrico (PEG). Médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 2116 entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores  
 2117 médios  $\pm$  erro padrão (n=4).



2118

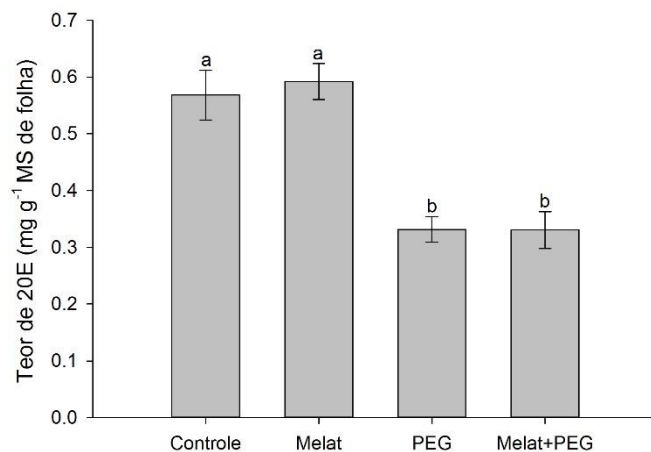
2119 **Figura 6.** Atividade das enzimas do estresse oxidativo em folhas (A, C, E, G) e raízes  
 2120 (B, D, F, H) de *Pfaffia glomerata* tratadas com melatonina (Melat) e sob estresse hídrico  
 2121 (PEG) após 35 dias de cultivo *in vitro*. CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase;  
 2122 POD, peroxidase oxidoreductase; SOD, desmutase do superóxido. Médias seguidas pela  
 2123 mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados  
 2124 apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n=4).



2125

2126 **Figura 7.** Concentração de malondialdeído (MDA) e de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
 2127 em folhas (A, C) e raízes (B, D) de *Pfaffia glomerata* tratadas com melatonina (Melat) e  
 2128 sob estresse hídrico (PEG) após 35 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela  
 2129 mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados  
 2130 apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).

2131



2132

2133 **Figura 8.** Teor de 20-hidroxicidisona (20E) em folhas de *Pfaffia glomerata* tratadas  
 2134 com melatonina (Melat) e sob estresse hídrico (PEG) após 35 dias de cultivo *in vitro*.  
 2135 Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de  
 2136 probabilidade. Dados apresentados como valores médios ± erro padrão (n=4).

## 2137 CONCLUSÕES GERAIS

2138           Altas concentrações de melatonina afetam negativamente o desenvolvimento de  
2139 *P. glomerata* cultivada *in vitro*, reduzindo o comprimento do caule e raiz, o acúmulo de  
2140 biomassa e o teor de pigmentos, como clorofilas, carotenoides e antocianinas.

2141           Melatonina induz mecanismos de resposta antioxidantes através do aumento da  
2142 atividade de enzimas como CAT, APX e POD, redução da peroxidação lipídica e do  
2143 acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ademais, na concentração de 1000 µM, elevou os teores de  
2144 aminoácidos, prolina e proteínas da raiz. A melatonina também modulou o metabolismo  
2145 primário e a biossíntese de 20E, além de influenciar no comportamento de hormônios  
2146 importantes nas respostas de tolerância ao estresse em plantas.

2147           O estresse hídrico reduz o crescimento e acúmulo de biomassa, eleva a produção  
2148 de MDA e ROS, e afeta o metabolismo primário e secundário das plantas. Entretanto,  
2149 plantas de *P. glomerata* apresentaram estratégias adaptativas de tolerância ao déficit  
2150 hídrico.

2151           A melatonina induziu respostas importantes para atenuar os efeitos do estresse  
2152 hídrico em plantas de *P. glomerata*, reduzindo a peroxidação lipídica, evitando a  
2153 degradação de proteínas, e aliviando o estresse oxidativo.

2154           Este trabalho fornece novas evidências sobre as consequências do déficit hídrico  
2155 e do papel da melatonina nas respostas fisiológicas e metabólicas de plantas e seus  
2156 efeitos nas respostas de tolerância ao estresse.