



FRANCISCO HÉLIO ALVES DE ANDRADE

**MELATONINA E AIB NO ENRAIZAMENTO DE
ESTACAS DE CAFEIRO ARÁBICA**

**LAVRAS – MG
2021**

FRANCISCO HÉLIO ALVES DE ANDRADE

**MELATONINA E AIB NO ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE CAFEIRO
ARÁBICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dra. Vânia Aparecida Silva
Orientadora

Prof. Dra. Elisa Monteze Bicalho
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Andrade, Francisco Hélio Alves de.

Melatonina e AIB no Enraizamento de Estacas de Cafeeiro Arábica /
Francisco Hélio Alves de Andrade. - 2021.

97 p. : il.

Orientador(a): Vânia Aparecida Silva.

Coorientador(a): Elisa Monteze Bicalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Propagação Vegetativa. 2. Coffea arabica. 3. Alcaloide. I. Silva,
Vânia Aparecida. II. Bicalho, Elisa Monteze. III. Título.

FRANCISCO HÉLIO ALVES DE ANDRADE

**MELATONINA E AIB NO ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE CAFEIEIRO
ARÁBICA**

MELATONIN AND AIB IN ROOTING ARABIC COFFEE CUTTINGS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 de novembro de 2021.

Dra. Vânia Aparecida Silva, EPAMIG

Dra. Elisa Monteze Bicalho, UFLA

Dra. Meline de Oliveira Santos, EPAMIG

Dr. Rubens José Guimarães, UFLA

Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori, UFLA



Prof. Dra. Vânia Aparecida Silva
Orientadora

**LAVRAS – MG
2021**

A meus pais Rita de Cassia e Francisco Ivo, por serem meus pilares de sustentação. Meus irmãos Heberton Kelvi e Cicero Damião pelo apoio em minha jornada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e permitir a vivenciar a conquista do doutorado. A minha família, Rita de Cassia Alves de Andrade minha mãe, Francisco Ivo de Andrade meu pai, Heberton Kelvi Alves de Andrade e Cícero Damião Alves de Andrade meus irmãos por sempre estarem comigo em todos os momentos, e agradeço também minha companheira Maria Isabela por fazer parte de mais uma vitória e entender todos os momentos.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Biologia e Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de cursar um dos seus programas.

Este trabalho foi apoiado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Os autores agradecem o apoio financeiro do Consórcio de Pesquisa Café, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café)

As Dras. Vânia Aparecida Silva e Elisa Monteze Bicalho pela disposição para me orientar a construir novos conceitos e melhorar meu conhecimento.

Agradeço a Lillian Magalhães, Ana Maria, Lermen Forigua, João Pedro, Meline Oliveira pelo apoio na pesquisa em todos experimentos. Agradeço ainda, aos amigos Joel, Hamilton, Salete, Sacola e Walter em nome dos técnicos administrativos da UFLA e EPAMIG.

A meus colegas de moradia, Lissa Isabel e Jandeilson Pereira pelo apoio no início do doutorado, em especial Paulo Cassio, pois compartilhamos moradia até o final do curso e conhecimentos. Aos amigos que conheci durante o doutoramento Bega, Antonia, Paulo Cesar, Ludmila, Mayra, Layane, Dawison, Daniel, Marília, Josyelen, Joyce, Marina, Daniela, Alex, Catherine, Hector, Andrea, Marlon, Moises, Rosy, Alan, Breno, Rafael, Aline.

A todos os professores do programa de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos repassados. A todos os Laboratórios do setor de Fisiologia vegetal, em especial o LCDP e LEV pelo apoio e acolhimento durante o doutorado. Quero deixar meus agradecimentos a técnico Alexandre Teixeira, por ter concedido seu tempo para nos auxiliares em algumas análises.

RESUMO

A propagação vegetativa possibilita a clonagem de plantas com elevado potencial produtivo, resistentes a estresses bióticos e abióticos. A melatonina e o ácido indol-3-butírico (AIB) são moléculas com potencial para estimular a formação da raiz (FR), no entanto, pouco se sabe do efeito de ambas sobre a atividade de enzimas antioxidantes, H_2O_2 , fenóis e alcaloides na FR durante as fases do enraizamento. Objetivou-se avaliar os impactos da aplicação da melatonina e AIB sobre a formação da raiz com atividade enzimática, conteúdo de H_2O_2 , fenóis e alcaloides. O presente trabalho foi dividido em dois manuscritos, e em ambos foram utilizados delineamentos inteiramente casualizados com quatro repetições. No primeiro manuscrito, utilizaram-se os seguintes tratamentos: Controle, melatonina 43 μM (M43), melatonina 215 μM (M215) e AIB 7380 μM (AIB), nas fases do enraizamento, indução aos 0 e 7 dias após o plantio (DAP), iniciação aos 28 DAP e expressão aos 47 e 76 DAP em estacas de café arábica cultivar Catuaí IAC-144. No segundo manuscrito, foram testados quatro tratamentos (Controle, melatonina 21 μM (M21), M43 e AIB) nas fases do enraizamento, que são, indução aos 0 e 7 DAP, iniciação aos 28 DAP e expressão aos 47 e 69 DAP, utilizando-se café arábica da cultivar Mundo Novo. Em ambos os manuscritos foram realizados parâmetros de fitotécnicos e bioquímicos. Manuscrito I: Quando as estacas foram tratadas com M43 foi observado que o H_2O_2 correlacionou positivamente em todas as fases do enraizamento para maior peso da matéria seca da raiz (PMSRA). Além disso, a SOD, APX e CAT na fase de indução correlacionaram positivamente com PMSRA. Aos 28 DAP na fase de iniciação a SOD, POD e PPO também correlacionaram positivamente com PMSRA. A aplicação de AIB estimulou a PPO na indução e APX e CAT correlacionaram positivamente com PMSRA e negativamente com PEE. Evidências bioquímicas mostram que o aumento da atividade enzimática e conteúdo de H_2O_2 nas diferentes fases do enraizamento pode ser necessário para a formação da raiz induzida pela M43. O aumento da atividade enzimática esteve envolvido na formação da raiz e antecipação do enraizamento induzido pela aplicação de AIB. Artigo II: Foi constatado que os tratamentos M43 e AIB promoveram maior PEE e trigonelina na indução e na iniciação, H_2O_2 na fase de iniciação e fenóis totais na fase de indução. A M43 aumenta o conteúdo de cafeína na indução e na iniciação associada à FR. A cafeína, trigonelina, fenóis totais e H_2O_2 parecem estar envolvidos no enraizamento de café arábica associado à aplicação de M43 e AIB.

Palavras-chave: Propagação vegetativa. N -acetil-5-metoxitriptamina. *Coffea arabica*. Ácido indol-3-butírico. Alcaloide.

ABSTRACT

Vegetative propagation enables the cloning of plants with high yield potential, resistant to biotic and abiotic stresses. Melatonin and indole-3-butyric acid (IBA) are molecules with the potential to stimulate root formation (RF), however, little is known about the effect of both on the activity of antioxidant enzymes, H₂O₂, phenols and alkaloids in the stages of development. rooting. The objective was to evaluate the impacts of melatonin and IBA application on root formation with enzymatic activity, H₂O₂ content, phenols and alkaloids. The present work is divided into two manuscripts, and in both, a completely randomized design with four replications was used. In the first manuscript, the following treatments were used: Control, 43 µM melatonin (M43), 215 µM melatonin (M215) and 7380 µM AIB (AIB), in the rooting phases, induction at 0 and 7 days after planting (DAP), initiation at 28 DAP and expansion at 47 and 76 DAP in arabica coffee cultivar Catuaí IAC-144. In the second manuscript, four treatments were tested (Control, melatonin at 21 µM (M21), M43 and IBA in the rooting phases, which are, induction at 0 and 7 DAP, initiation at 28 DAP and expansion at 47 and 69 DAP, used arabica coffee of the Mundo Novo cultivar. In both manuscripts, phytotechnical and biochemical parameters were performed. Article I: When cuttings were treated with M43, it was observed that H₂O₂ positively influenced at 0, 27 and 47 DAP for higher root dry matter weight (HRDMW). Furthermore, SOD, APX and CAT at 7 DAP correlated positively with HRDMW. At 28 DAP, SOD, POD and PPO also correlated with an increase in HRDMW. IBA application stimulated PPO at 0 DAP and APX and CAT correlated positively with HRDMW and negatively with the percentage of rooted cuttings (PRC). Biochemical evidence shows that increased enzymatic activity and H₂O₂ content at different rooting stages may be necessary for M43-induced root formation. The increase in enzymatic activity was involved in root formation and anticipation of rooting induced by the application of IBA. Article II: It was found that treatments M43 and AIB promoted higher PRC and trigonelline in induction and initiation, H₂O₂ in the initiation phase and total phenols in the induction phase. M43 increases the caffeine content in the induction and initiation of an associated RF. Caffeine, trigonelline, total phenols and H₂O₂ seem to be involved in the rooting of arabica coffee associated with the application of M43 and IBA.

Keywords: Vegetative propagation. N-acetyl-5-methoxytryptamine. *Coffea arabica*. Indole-3-butyric acid. Alkaloid.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Aspectos gerais da cultura	13
2.2 Propagação vegetativa por estaquia	14
2.3 Atividade enzimática e H ₂ O ₂	15
2.4 Compostos fenólicos	18
2.5 Auxinas no enraizamento	19
2.6 Melatonina	20
2.7 Cafeína e trigonelina	22
REFERÊNCIAS	24
SEGUNDA PARTE	31
ARTIGO I - H₂O₂ e fenóis atuam diferencialmente na formação de raiz induzidas pela melatonina e pelo AIB em estacas de cafeeiro arábica	32
ARTIGO II - Trigonelina e cafeína em estacas de cafeeiro arábica durante a formação de raízes adventícias após aplicação de AIB e melatonina	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O *Coffea arabica* L. possui grande importância no cenário mundial, pois é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e a busca por tecnologias que reduzam o custo de produção e aumentem a produtividade é de suma importância para a cafeicultura. Dentre as tecnologias já existentes, a clonagem pelo método da estaquia pode ser uma eficiente opção para multiplicação de plantas com elevado potencial produtivo, resistentes a pragas e doenças e tolerantes a estresses abióticos.

A estaquia é um método de multiplicação de indivíduos, que apresenta simplicidade na técnica, além de ser economicamente viável para formação de mudas (DIAS et al., 2015; PORFIRIO et al., 2016). Na estaquia, a formação de raiz é influenciada por fatores genéticos, fisiológicos, bioquímicos e anatômicos (ILCZUK; JACYGRAD, 2016), na qual o primórdio radicular se origina próximo ao câmbio vascular (JESUS et al., 2010).

Na preparação das estacas para produção de mudas de cafeeiro arábica, dá-se um corte em ramos ortotrópicos com finalidade de produzir mudas idênticas à planta mãe. Após o corte das estacas, nutrientes e água são cessados, além de ocorrer estresse devido o corte das estacas antes mesmo da formação de raiz (ZHANG et al., 2017). Com isso, a atividade do sistema antioxidante pode agregar grande importância na eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs).

Os compostos fenólicos e H_2O_2 estão envolvidos na formação de raiz. Onde os compostos fenólicos protegem as auxinas da descarboxilação, favorecendo maior conteúdo de auxina endógena disponível para induzir as raízes (WILSON; VAN STADEN, 1990).

A polifenoloxidase (PPO) é considerada um marcador bioquímico envolvido no controle da formação de raiz adventícia (EMILE et al., 2019), onde promove a divisão celular, diferenciação, bem como a formação e desenvolvimento de primórdios de raiz (YILMAZ; TAŞKIN; OTLUDIL, 2003). PPO também acelera a formação de compostos fenólicos-AIA e, conseqüentemente, promove formação de raiz (BALAKRISHNAMURTHY; RAO, 1988; ROUT, 2006; NAG; SAHA; CHOUDHURI, 2001).

Estudos apontam que a melatonina também atua positivamente na formação de raiz (MAO et al., 2020; ZHAO et al., 2009), onde desencadeia um acúmulo de óxido nítrico (NO) combinado com a distribuição de auxina para melhorar o enraizamento adventícia (WEN et al., 2016). A melatonina regula positivamente o H_2O_2 para melhorar a formação de raiz adventícia (CHEN et al., 2018).

Os compostos alcaloides são conhecidos pela sua capacidade de defesa contra patógenos, controle de ervas daninhas e condições de estresse abióticos, como salino e déficit hídrico (PHAM et al., 2019; WINK; TWARDOWSKI 1992; IRANKHAH et al., 2020; BADI et al., 2018). Também foi descoberto na presente pesquisa que os alcaloides como cafeína e trigonelina estiveram envolvidos na formação de raiz adventícias em estacas de cafeeiro arábica na cultivar Catuaí IAC-144. A melatonina estimula a síntese de fenóis totais, H_2O_2 e alcaloides nas diferentes fases do enraizamento para promover formação de raiz. Enquanto que o AIB possui um efeito direto na formação de raiz. Com isso, objetivou-se avaliar o enraizamento e morfologia da raiz associada atividade enzimática, conteúdo de H_2O_2 , compostos fenólicos, cafeína e trigolelina sob aplicação de ácido indol-3-butírico (AIB) e melatonina em dois experimentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura

O *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. são duas espécies comercialmente importantes dentro do gênero *Coffea*, a qual produzem cafés do tipo arábica e robusta (REZENDE, 2016). Entretanto, a maioria dos plantios comerciais mundiais são do tipo arábica, principalmente, pela qualidade de sua bebida. O café arábica foi originário da Etiópia, em vales do rio Atbarah e das regiões Kaffa com latitudes de 8° a 12° N e longitude de 40° a 42° E (CHEVALIER, 1946). Nestas regiões, o *Coffea arabica* possui característica de arbusto e desenvolve sob sombreamento nas florestas tropicais com precipitação 1.200 a 2.000 mm e altitude de 1.000 a 2.500 m (CHEVALIER, 1946).

A arquitetura do cafeeiro arábica é caracterizada por possuir ramos plagiotrópicos com crescimento horizontal, ou denominado ramos produtivos, e ramos ortotrópicos que crescem na vertical e suas folhas crescem em pares opostas (GUIMARÃES; MENDES; SOUZA, 2004). Além disso, o café arábica é considerado tetraploide, autógama e possui fecundação cruzada entre 10 a 12% (GUIMARÃES; MENDES; SOUZA, 2004). As variedades mais conhecidas do café arábica são Bourbon e Typica, posteriormente a partir de ambas cultivares originara-se, cultivares como, Caturra, Mundo Novo e Tico (GUIMARÃES; MENDES; SOUZA, 2004).

No ano de 2021 a produção estimada do café arábica foi de 30.729,9 mil sacas, o que representa uma redução de 36,9% em comparação ao ano anterior (CONAB, 2021). As condições climáticas como seca aliada às geadas, e os efeitos fisiológicos da bienalidade negativa possibilitaram uma diminuição do rendimento médio (CONAB, 2021). No estado de Minas Gerais (MG) estima-se uma produção de 21.442,3 mil sacas de café beneficiado, seguido pelos estados do Espírito Santo (ES) com 14.126,00 e São Paulo (SP) com 4.009,2 mil sacas (CONAB, 2021). Estas estimativas são referentes ao terceiro levantamento entre os meses de agosto e setembro de 2021, e o quarto levante referente a colheita final será realizado no mês de novembro de 2021 (CONAB, 2021).

2.2 Propagação vegetativa por estaquia

Na atividade agrícola, um dos fatores primordiais é a propagação de plantas (HARTMANN et al., 2013), na qual, é entendida como pacotes de técnicas com intuito de perpetuar espécies vegetais de forma controlada, multiplicando os indivíduos para garantir e preservar características agrônômicas (HOFFMANN et al., 2013; VÉRAS, 2017).

A estaquia é um método da propagação vegetativa importante, por apresentar simplicidade na técnica e ser economicamente viável para formação de plantios clonais, além de produzir mudas com sistema radicular mais desenvolvido em comparação com mudas proveniente de sementes (DIAS et al., 2015; PORFIRIO et al., 2016; JESUS; CARVALHO; SOARES, (2007).

A propagação vegetativa em cafeeiro arábica, consiste na multiplicação de plantas com alto valor tecnológico, seja ele, maior produção, resistente a pragas e doenças, tolerante a estresses abióticos e etc. Além de possibilitar, uniformidade da produção e maturação de frutos (PAULINO; MATIELLO; OAULINE, 1985; TOSTA et al., 2012).

No entanto, para que um caule de cafeeiro arábica consiga ser capaz de viver de forma autônoma após ser destacado da planta matriz, a regeneração de um novo sistema radicular é crucial. Além disso, a propagação vegetativa possibilita a formação de plantas idênticas a planta clonada (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). A capacidade das plantas de se reproduzirem vegetativamente está ligado diretamente na plasticidade das células vegetais para se desdiferenciar e formar novos órgãos que irão eventualmente regenerar uma nova planta (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). A formação de raiz é influenciada por fatores genéticos, fisiológicos, bioquímicos e anatômicos (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). Em estacas

a partir de caule, o primórdio radicular é normalmente próximo à superfície do corte, ou em pontos onde os feixes vasculares se cruzam com o câmbio (ILCZUK; JACYGRAD, 2016; JESUS et al., 2010). A camada descontínua do esclerênquima facilita a formação de raiz (JESUS et al., 2010; OPEÑA et al., 2020), enquanto que uma camada contínua ou quase contínua do esclerênquima, oferece resistência a formação de raiz (LOPES, 1995; CASTRO et al., 2009; OPEÑA et al., 2020).

A formação de uma raiz ocorre em três fases, que são a indução, a iniciação e a expressão (HUSEN et al., 2015; ZHANG et al., 2017). A fase de indução envolve eventos bioquímicos que precedem mudanças morfológicas visíveis, enquanto que na fase de iniciação ocorre o início dos primórdios e meristemas. Já a fase de expressão caracteriza-se pelo crescimento intracaulinar do primórdio radicular e emergência da raiz (GUAN et al., 2015; ZHANG et al., 2017; HUSEN et al., 2017).

No cafeeiro arábica, a propagação vegetativa pelo método de estaquia é uma tecnologia viável por apresentar baixo custo, fácil manejo e rápida produção de mudas em relação a outros métodos, como a cultura de tecido. Desde a década de 50 o método vem sendo estudado, quando o pioneiro Inforzato (1950) empregou hormônios para formação de raiz de cafeeiro arábica. Várias pesquisas foram realizadas com intuito de maximizar a produção de mudas (JESUS, 2003; BALIZA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; REZENDE et al., 2010).

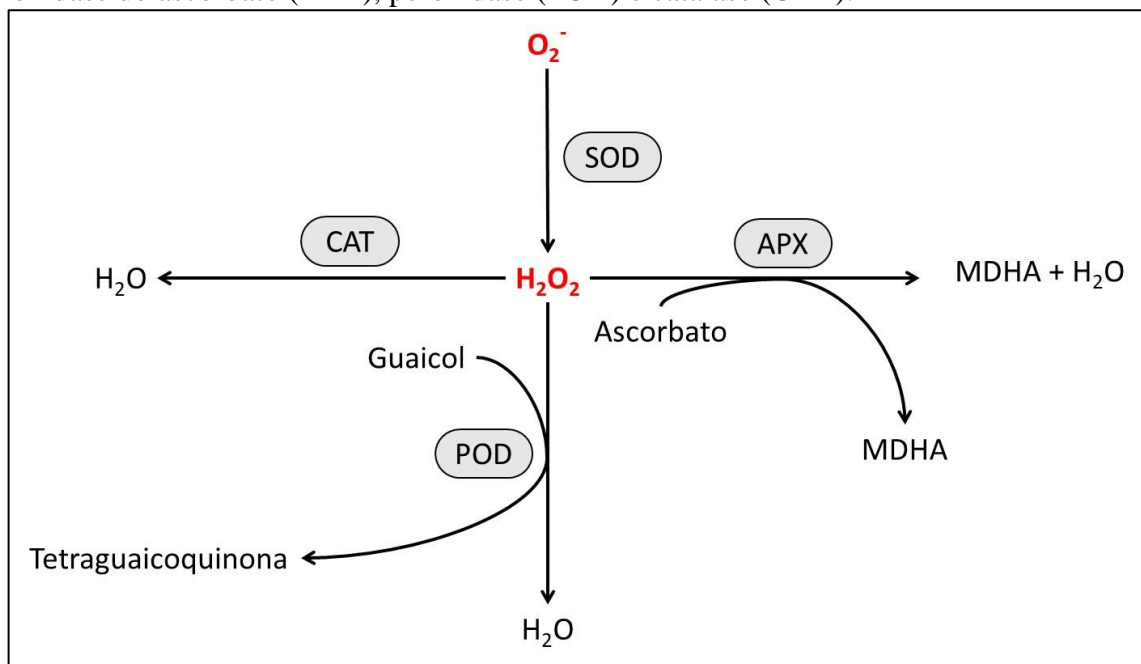
Em um estudo realizado com diferentes volumes do tubete e porções do ramo ortotrópico, concluíram que a cultivar Acaíá Cerrado MG 1474 não tem o enraizamento prejudicado em função do tamanho do tubete 50 e 120 m³ por até 120 dias, e a porção mediana do ramo ortotrópico foi a que promoveu melhor desenvolvimento de mudas (REZENDE et al., 2017). A qualidade da estaca para o enraizamento, pode variar ao longo do ramo ortotrópico, pois a composição química do tecido é alterada, e conseqüentemente cada tipo de estaca pode apresentar enraizamento diferente (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005). Enquanto que, Ono; Rodrigues; Pinho (1992) verificaram a influência da época de coleta dos ramos no enraizamento de estacas de café arábica, concluíram que, as estacas coletadas na estação chuvosa promovem maior enraizamento.

2.3 Atividade enzimática e H₂O₂

Uma vez que os caules são cortados da planta-mãe, seu suprimento de nutrientes e água é cessada e os caules estão, portanto, sob estresse antes da formação de raízes adventícias

(ZHANG et al., 2017). Porém, melhorar a resistência ao estresse e reduzir o tempo necessário para a formação de raízes são fundamentais para a sobrevivência das estacas. Com isso, atividade enzimática do sistema antioxidante pode atenuar os efeitos negativos. A dismutase do superóxido (SOD) atua na primeira linha de defesa, dismutando o radical O_2^- a H_2O_2 e O_2 nos Cloroplastos, peroxissomas e mitocôndrias evitando a formação de OH^- a partir do O_2 (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012; MORITA et al., 2011; CHEN et al., 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Representação simplificado das atividades da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POD) e catalase (CAT).



Posteriormente o H_2O_2 é reduzido a H_2O e O_2 pela enzima peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POD) e catalase (CAT) (BARBOSA et al., 2014; SHARMA et al., 2012; LOCATO et al., 2010) (Figura 1). A APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons, reduzindo a monodehidroascorbato (MDHA). Aumento da atividade da CAT na fase de indução pode influenciar positivamente o enraizamento (ELMONGY et al., 2018).

Zhang et al., (2017) notaram que a atividade da SOD aumentou continuamente até a fase de iniciação. Este achado sugere que um aumento contínuo na atividade da SOD ocorre principalmente antes da formação de raízes adventícias (ZHANG et al., 2017). Visto que, as estacas foram expostas ao estresse após o corte e a atividade da SOD poderia aumentar a resistência das estacas ao estresse (ZHANG et al., 2017). Após a emergência das raízes

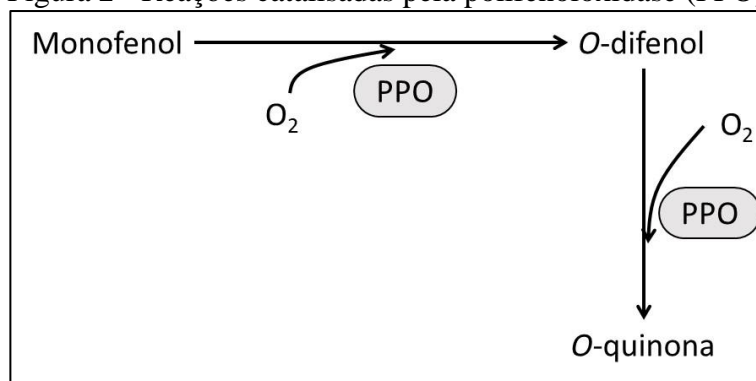
adventícias, a função de absorção das raízes é recuperada, aliviando assim a planta do estresse, enquanto a atividade de SOD começa a reduzir (ZHANG et al., 2017).

As PODs são marcadores bioquímicos de estresses abióticos, bióticos, como também na identificação de processos morfogênicos durante diferenciação celular, formação de raiz, crescimento e multiplicação de plantas (LIMA et al., 2002; PIZA et al., 2003; LOCATO, 2010; KIM & KWAN, 2010; Zhang et al., 2017). A POD estar envolvida no catabolismo da auxina, principalmente nas fases iniciais do enraizamento (HUSEN et al., 2017), além de auxiliar na biossíntese de lignina (ROUT, 2006). Pesquisa aponta que atividade da POD são menores nos primeiros dias após o plantio das estacas (HUSEN et al., 2017). Geralmente a atividade da POD é reduzida na fase de indução, e aumentada na fase de iniciação (HUSEN; PAL, 2007; HUSEN et al., 2017). A qual está envolvida na iniciação e alongamento da raiz (HUSEN et al., 2017).

Mas, Zhang et al, (2017) verificaram pico na atividade da POD aos 9 DAP durante a fase de iniciação. O aumento da atividade da POD no estágio inicial facilita a eliminação de H_2O_2 , aumenta a resistência da parede celular e, conseqüentemente, aumenta a resistência ao estresse (ZHANG et al., 2017). Em um estágio posterior, a diminuição da atividade do POD, facilita a expansão e o crescimento celular (ZHANG et al., 2017).

A polifenoloxidase (PPO) catalisa duas reações importantes, tais como, hidroxilação de monofenóis em *O*-difenóis e oxidação de *O*-difenóis em *O*-quinona (TOMAS BARBERAN; ESPIN 2001) (Figura 2).

Figura 2 - Reações catalisadas pela polifenoloxidase (PPO).



A PPO é considerada um marcador bioquímico envolvido no controle da formação de raiz (EMILE et al., 2019). A qual, promove a divisão celular, diferenciação, bem como a formação e desenvolvimento de primórdios de raiz (YILMAZ; TAŞKIN; OTLUDIL, 2003). PPO também acelera a formação de compostos fenólicos-AIA e, conseqüentemente, promove

formação de raiz (BALAKRISHNAMURTHY; RAO, 1988; ROUT, 2006; NAG; SAHA; CHOUDHURI, 2001).

Zhang et al, (2017) verificaram pico na atividade da PPO, depois da fase de indução no quarto ponto crítico, a qual, indica que aumentos contínuos na atividade de PPO promovem formação de raiz adventícia ao longo de todo o processo de indução ao desenvolvimento. SOMKUWAR et al, (2011) concluíram que o maior conteúdo de fenóis, apresentou atividade aumentada da PPO aos 30 DAP, podendo estar relacionada positivamente com a formação de raízes, pela aceleração do processo de divisão celular.

H₂O₂ é formado nas células sob condições normais e condições de stress, tais como resfriamento, seca, irradiação UV, a exposição a luz intensa, invasão por patógenos e ferimento (SHARMA et al., 2012). Também está relacionado positivamente em processos biológicos, desencadeando tolerância a estresse ambientais, interações planta-patógeno e no processo de enraizamento (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002; MITTLER; ZILINSKAS, 1991; CHEN et al., 2018).

No enraizamento foi verificado, que altos teores de AIA endógeno e H₂O₂ durante os primeiros cinco dias podem estimular a indução e o desenvolvimento de primórdios radiculares em meio suplementado com auxina em *Cotinus coggygria* Scop. (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). O aumento no conteúdo de H₂O₂ durante os primeiros períodos de indução pode influenciar positivamente a formação de raízes (ELMONGY et al., 2018). O H₂O₂ é um segundo mensageiro desencadeado pelo ácido salicílico na formação de raiz (YANG et al., 2013).

2.4 Compostos fenólicos

São moléculas que apresentam ligação do grupo HO ligado ao anel aromático. O anel aromático de compostos fenólicos pode conter um, dois ou três grupos OH (KLERK et al., 2011). A quantidade e posição dos grupos OH podem ser diferentes. Assim, para difenóis existem *meta-*, *para-* e *orto-* difenóis (KLERK et al., 2011). Para mais, os trifenóis, *o*-difenóis e *m*-difenóis reduziram a descarboxilação de AIA e promoveram o enraizamento (KLERK et al., 2011).

Os compostos fenólicos protegem as auxinas da descarboxilação, favorecendo maior quantidade de auxina disponível para induzir as raízes (WILSON; VAN STADEN, 1990). A capacidade do enraizamento foi correlacionada com a presença de compostos fenólicos,

sugerindo que o enraizamento depende da inibição da descarboxilação do AIA (CURIR et al. 1990; CURIR et al. 1993; KLERK et al., 2011).

Os compostos di e polifenólicos atuam como antioxidantes protetores, efeito promotor adicional ao reduzir a resposta à ferida, a qual, o estresse provocado pela ferida pode inibir os processos de regeneração (KLERK et al., 2011). Mas aplicação de monofenol promoveu a descarboxilação do AIA em resposta a ferida (KLERK et al., 2011).

2.5 Auxinas no enraizamento

O uso de auxina exógena no enraizamento de estacas é amplamente estudado em várias culturas, com o objetivo de clonagens de plantas com características desejáveis. Seu papel no enraizamento já está bem estabelecido e foi o primeiro hormônio estudado em plantas.

As auxinas são fitormônios envolvidos em muitos processos fisiológicos, tais como, diferenciação vascular, dominância apical, diferenciação vascular, expansão celular, desenvolvimento de botões florais e formação de raízes laterais e adventícias (BANNOUD; BELLINI, 2021). Durante a indução de raízes adventícias elevadas concentrações são requeridas nas primeiras horas após o corte, mas na fase de iniciação e expressão pode tornar inibitória (COSTA et al., 2013; DRUEGE et al., 2016). As auxinas induzem a desdiferenciação e divisão celular iniciais do periciclo e parênquima (LI et al., 2009).

O ácido indol-3-acético (AIA) é comum nas plantas como o principal hormônio do grupo das auxinas e sua inativação ocorre devido à AIA-oxidase (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). A atividade da AIA-oxidase afeta negativamente a rizogênese devido a oxidação do AIA (FU et al., 2011). A descarboxilação do AIA causada pelo aumento da atividade das peroxidases em virtude dos ferimentos provocado pelo corte, também interfere negativamente nos níveis de auxinas em plantas (CHAMARRO et al., 2001). Foi observado correlação negativo entre atividade da peroxidase e níveis de auxinas (KLERK, 1996).

Auxinas exógena foram utilizadas para promover e acelerar o enraizamento em estacas de diferentes espécies (BLYTHE et al., 2007; HUSEN et al., 2017; ILCZUK; JACYGRAD, 2016). O AIA é a auxina natural mais abundante, enquanto o ácido indol-3-butírico (IBA) é usado como auxina exógena para estimular a formação de raiz adventícias na maioria das espécies (BANNOUD; BELLINI, 2021).

No entanto, a eficiência da formação de raiz em função das auxinas, pode variar entre as espécies e plantas de mesma espécie. Bergo; Mendes (2000) constataram que estacas de

cafeeiro conillon apresentou enraizamento de 97% na ausência de aplicação de AIB, por outro lado, estacas de cafeeiro arábica da cultivar Acaia apresentaram 92,9% de estacas enraizadas com aplicação de AIB. Além disso, foi observado que cultivares da mesma espécie de cafeeiro arábica obtém enraizamento diferentes com a mesma aplicação de AIB, a qual a cultivar Acaia responde satisfatoriamente, enquanto o Catuai Vermelho não respondeu de forma satisfatória ao enraizamento (BERGO; MENDES, 2000).

Já está bem estabelecido que a auxina é um indutor eficaz da formação de raiz adventícia (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). O transporte polar de auxina (TPA) desempenha um papel crucial no controle do nível de AIA sendo a principal auxina ativa, de natureza altamente dinâmica (ILCZUK; JACYGRAD, 2016; DRUEGE et al., 2019).

A regulação do TPA envolve transportadores de influxo de auxina dos tipos AUXIN1 (AUX) e LIKE-AUX1 (LAX), proteínas transportadoras de efluxo de ligação de TPA (ABC) e PIN-FORMED (PIN) e quinases da família PINOID que controlam a localização intracelular de PINs (BENNETT et al., 2014; GEISLER et al., 2017). Ahkami et al. (2013) revelaram que o acúmulo inicial de AIA na base do caule dependente de TPA foi essencial para a formação raiz adventícia em estacas de *Petunia hybrida*.

Oyarce et al. (2021) estudaram diferentes doses de AIB, e concluíram que a dose de 2500 mg L⁻¹ promoveu maior porcentagem de estacas enraizadas de 52,5% em cafeeiro arabica. Enquanto Vallejos-Torres et al. (2020) verificaram que a dose ideal para variedade de cafeeiro arábico da variedade Caturra foi de 2000 mg L⁻¹, visto que proporcionou porcentagem de estacas enraizadas de 89%.

2.6 Melatonina

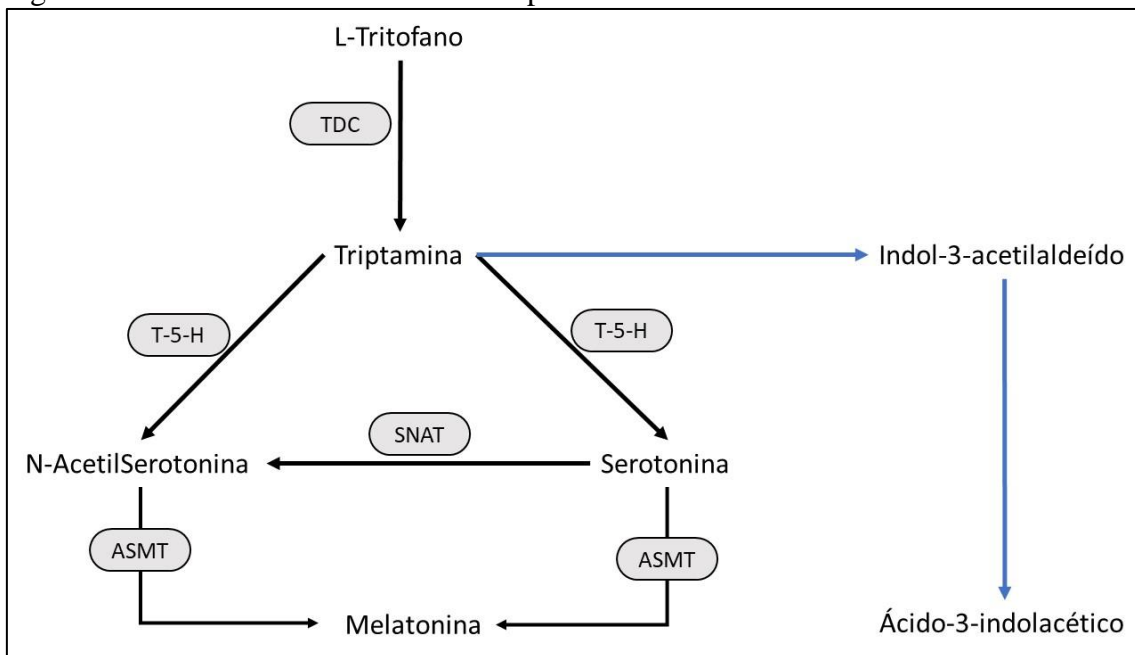
A melatonina é uma indolamina produzida endogenamente em todo o Reino Vegetal e Animal, cuja concentração nas plantas varia nos diferentes tecidos e de acordo com o estágio de desenvolvimento (REITER et al., 2015). As raízes, sementes, folhas, bulbos e flores foram consideradas ricas fontes de melatonina na maioria das espécies de plantas examinadas (NAWAZ et al., 2016).

A biossíntese de melatonina em plantas foi descrita pela primeira vez por um estudo de rastreador de radioisótopos que determinou que o precursor primário é o triptofano (MURCH et al. 2000), e A biossíntese está bem descrita, a qual ocorre a partir do triptofano, as enzimas triptofano descarboxilase (TDC), triptamina 5-hidroxilase (T5H), serotonina N-

acetiltransferase (SNAT), N-acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT) são responsáveis pela a síntese de melatonina (FUJIWARA et al. 2010; KANG et al. 2011, 2013; PARK et al. 2013). Posteriormente a TDC atua na conversão de triptofano a triptamina, enquanto a síntese de N-acetilserotonina e serotonina a partir de triptamina, sofrem ação da enzima T5H (VOLTAR; TAN; REITER, 2016; KANG et al., 2009) (Figura 3).

A serotonina, é convertida em N-acetilserotonina catalisada pela SNAT. N-acetilserotonina é convertida em melatonina pela enzima ASMT. Em plantas de arroz, a N-acetilserotonina também é produzida diretamente a partir da triptamina e a N-acetiltriptamina serve como um produto intermediário, esta é catalisada por SNAT. A melatonina pode ser produzida diretamente a partir da serotonina com 5-metoxitriptamina servindo como produto intermediário em um processo e catalisada por HIOMT / ASMT e SNAT (ARNAO; HERNANDEZ-RUIZ, 2014; BYEON et al., 2014). O AIA também é produzido a partir da triptamina e o indol-3-acetilaldeído serve como um produto intermediário (KRYSTYNA et al., 2009; ARNAO; HERNANDEZ-RUIZ, 2014).

Figura 3 - Biossíntese da melatonina em plantas.



Fonte: Modificado de Arnao e Hernandez-Ruiz, (2014).

A melatonina promove a formação de raízes adventícias (RA) principalmente na fase de indução de RA, aumentando os níveis de AIA e ativando a função de *MdWOX11* (MAO et al., 2020). O *GENE 11 DE HOMEBOX RELACIONADO A WUSCHEL (WOX11)* funciona na emergência e desenvolvimento da raiz (ZHAO et al., 2009).

A melatonina desencadeia o acúmulo de óxido nítrico (ON) pela regulação positiva da expressão de *nitrato redutase* (*NR*) e negativa da expressão de *S-nitrosoglutationa redutase* (*GSNOR*), e o acúmulo de AIA e incremento de NO, combinado com o transporte e distribuição de auxina regulada por melatonina, desempenha papéis importantes na formação de raiz (WEN et al., 2016). A melatonina regula positivamente o H₂O₂ e aumenta a expressão de dois genes envolvidos na formação de raiz lateral que são *CDKB1;1* e *CDKB2;1*, (CHEN et al., 2018).

Sarrou et al. (2014) constataram, que aplicação de melatonina proporcionou 92,7% de enraizamento em estacas de romã, eles ainda perceberam, que aplicação de com melatonina com AIB aumenta o enraizamento para 98,2% em estacas de romão. Koyama et al. (2013); Sarropoulou et al. (2012) sugerem, a melatonina age semelhante a uma auxina no enraizamento e crescimento radicular em diferentes espécies de plantas.

Na ausência de auxina, a melatonina 1 µM apresenta resposta auxínica em relação ao número e comprimento das raízes, mas a melatonina 10 µM foi inibitória para o enraizamento em todos os porta-enxertos testados (SARROPOULOU et al., 2012). Em plantas de café arábica, foi verificado que a melatonina aumenta a massa seca da raiz, melhora o sistema antioxidante, aumenta o conteúdo de açúcares e reduz a peroxidação lipídica, a qual refletiu na tolerância a estresse hídrico (CAMPOS et al., 2019).

2.7 Cafeína e trigonelina

Os alcaloides formam um grande grupo de compostos contendo nitrogênio presentes nas plantas (WINK 2004). A qual, desempenham uma variedade de funções, incluindo defesa contra insetos, bactérias e fungos e atividade alelopática (WINK; TWARDOWSKI 1992).

A Cafeína (1,3,7 N- metilxantina) e trigonelina (ácido 1 N- metilnicotínico) são alcaloides derivados de nucleotídeos de purina e piridina, respectivamente, e foi encontrado o acúmulo de grandes quantidades desses alcalóides purínicos e piridínicos em folhas jovens e cotilédones de café arábica (ZHENG; ASHIHARA, 2004).

Estudo recente revelou que a cafeína apresentou propriedades inibidoras seletiva a ervas daninhas, sugerindo um potencial no uso agrícola no manejo sustentável de ervas daninhas (PHAM et al., 2019), outra função importante da cafeína que é a proteção das colheitas e plantas ornamentais economicamente importantes de bactérias patogênicas de plantas (SLEDZ et al., 2017). No entanto, A cafeína prejudicou o processo de enraizamento em hipocótilos de feijão

mung, em função da redução da atividade da PPO e conteúdo de fenóis endógenos (BATISH et al., 2008).

A trigonelina pode estar envolvido na resistência de plantas de amendoim após irradiação com UV-B, e o estágio de desenvolvimento da planta desempenha um papel importante em resposta ao estresse, pois o estágio em R7 de amendoim proporciona maior conteúdo de trigonelina (WILLMON et al., 2017). A trigonelina também é conhecida por aumentar as concentrações dentro das folhas das plantas em resposta a muitos estresses abióticos, como estresse salino e estresse hídrico (IRANKHAH et al., 2020; BADI et al., 2018) Desta forma, a trigonelina funciona como um osmorregulador para prevenir a perda de água dentro das células vegetais (WILLMON et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- AHKAMI, A. H.; MELZER, M.; GHAFARI, M. R.; POLLMANN, S.; JAVID, M. G.; SHAHINNIA, F.; HAJIREZAEI, M. R.; DRUEGE, U. Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. **Plant**, v. 238, p. 499–517, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1907-z>
- ARNAO, M. B., AND HERNANDEZ-RUIZ, J. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress?, **Trends Plant Sci.**, v. 19, n. 12, p. 789-797, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.006>
- BADI, H. N.; MEHRAFARIN, A.; MUSTAFAVI, S. H.; LABBAFI, M. Exogenous arginine improved fenugreek sprouts growth and trigonelline production under salinity condition, **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 609-616, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.042>.
- BALAKRISHNAMURTHY, G.; RAO, V. N. M. Changes in phenols during rhizogenesis in rose (*Rosa bourboniana* Desp). **Curr Sci India**, v. 57, n. 17, p. 960–962, 1988. <https://www.jstor.org/stable/24091151>
- BALIZA, D. P.; REZENDE, T. T.; OLIVEIRA, D. H.; CARVALHO, S. P.; ÁVILA, F. W.; GUIMARÃES, R. J. Growth of stem cuttings of coffee cultivars in different environments. **Magistra**, v. 22, n. 2, p. 112–117, 2010.
- BANNOUD, F.; BELLINI, C. Adventitious Rooting in *Populus* Species: Update and Perspectives. **Front. Plant Sci.**, v. 12, p. 668837, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.668837>.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BATISH, D.R.; SINGH, H. P.; KAUR, M.; KOHLI, RK.; YADAV, SS. Caffeine affects adventitious rooting and causes biochemical changes in the hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) *Acta Physiol Plant*. N. 30, p. 401–405 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0132-4>.
- BENNETT, T. HINES, G.; LEYSER, O. Canalization: what the flux? **Trends in Genetics**, v. 30, n. 2, p. 41–48, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.11.001>
- BERGO, C. L.; MENDES, A. N. G. Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) Por meio de enraizamento de estacas. **Ciênc. agrotec.**, v.24, n.2, p.392-398, 2000.
- BLYTHE, E. K.; SIBLEY, J. L.; TILT, K. M.; RUTER, J. M. Methods of Auxin Application in Cutting Propagation: A Review of 70 Years of Scientific Discovery and Commercial Practice. **J. Environ. Hortic.**, v. 25, n. 3, p. 166–185, 2007. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-25.3.166>

BYEON, Y.; LEE, H. Y.; LEE, K.; PARK, S.; BACK, K. Cellular localization and kinetics of the rice melatonin biosynthetic enzymes SNAT and ASMT. **Journal Pineal Res.**, v. 56, n. 1, p. 107–114, 2014. <https://doi.org/10.1111/jpi.12103>

CAMPOS, C. N.; ÁVILA, R. G.; SOUZA, K. R. D.; AZEVEDO, L. M.; ALVES, J. D. Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants, **Agricultural Water Management**, v. 211, p. 37-47, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.09.025>.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. (2009) *Histologia Vegetal: Estrutura e Função de Órgãos Vegetativos*. Lavras, UFLA. 234p.

CHAMARRO, J.; OSTIN, A.; SANDBERG, G. Metabolism of indole- 3-acetic acid by orange (*Citrus sinensis*) flavedo tissue during fruit development. **Phytochemistry**, v. 57, n. 2, p.179–187, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00023-1)

CHEN, Z.; GU, Q.; YU, X.; HUANG, L.; XU, S.; WANG, R.; SHEN, W.; SHEN, W. Hydrogen peroxide acts downstream of melatonin to induce lateral root formation, **Annals of Botany**, v. 121, n. 6, p. 1127–1136, 2018. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx207>.

CHEVALIER, A. Ecologie et distribution géographique des Caféiers sauvages et cultivés. **Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'agriculture Tropicale**, Paris, v. 26, n. 281, p. 81–94, 1946.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília, DF, v.8 safra 2020/21, n. 3, setembro 2021.

COSTA, C. T.; ALMEIDA, M. R.; RUEDELL, C. M.; SCHWAMBACH, J.; MARASCHIN, F. S.; FETT-NETO, A. G. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Front. Plant Sci.**, v. 4, p. 133, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00133>

CURIR, P.; SULIS, S.; MARIANI, F.; VAN SUMERE, C. F.; MARCHESINI, A.; DOLCI, M. Influence of endogenous phenols on rootability of *Chamaelaucium uncinatum* Schauer stem cuttings. **Sci Hortic.**, v. 55, p. 303–314, 1993.

CURIR, P.; VANSUMERE, C. F.; TERMINI, A.; BARTHE, P.; MARCHESINI, A.; DOLCI, M. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. **Plant Physiol.**, v. 92, n. 4, p.1148–1153, 1990. <https://doi.org/10.1104/pp.92.4.1148>

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; FÉLIX, G. A.; PIRES, I. E. Resgate vegetativo de árvores de *Anadenanthera macrocarpa*. **Cerne**, v. 21, n. 1, p. 83-89, 2015. <https://doi.org/10.1590/01047760201521011381>

DRUEGE, U.; FRANKEN, P.; HAJIREZAEI, M. R. (2016). Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. **Front. Plant Sci.**, v. 7, p. 381, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00381>

DRUEGE, U.; HILO, A.; PÉREZ-PÉREZ, J. M.; KLOPOTEK, Y.; ACOSTA, M.; SHAHINNIA, F.; ZERCHE, S.; FRANKEN, P.; HAJIREZAEI, M. R. Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. **Annals of Botany**, v. 123, p. 929–949, 2019. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy234>.

ELMONGY, M. S.; CAO, Y.; ZHOU, H.; XIA, Y. Root Development Enhanced by Using Indole-3-butyric Acid and Naphthalene Acetic Acid and Associated Biochemical Changes of In Vitro Azalea Microshoots. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 813–825, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9776-5>

EMILE, M.; CLAUDE, S.; APOLLIN, F.; DOUNGOUS, O.; NJUKENG, J. N.; NICOLAS, N.; DENIS, O. N Influence of Exogenous Auxins on Phenolic Compounds Contents and Polyphenol oxidasic and Peroxidasic Activities in Root Differentiation in *Gnetum* spp. **Agricultural Sciences**, v.10, p. 1073-1089, 2019. <https://doi.org/10.4236/as.2019.108081>

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Pelotas: Embrapa, 2005. 221 p.

FU, Z.; XU, P.; HE, S.; SILVA, J. A. T.; Tanaka, M. Dynamic changes in enzyme activities and phenolic content during in vitro rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets. **Maejo Int. J. Sci. Technol.** v. 5, n. 2, p. 252–265, 2011.

FUJIWARA, T.; MAISONNEUVE, S.; ISSHIKI, M.; MIZUTANI, M.; CHEN, L.; WONG, H. L.; KAWASAKI, T.; SHIMAMOTO, K. Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11308–11313, 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091371>

GEISLER, M.; ARYAL, B.; DI DONATO, M.; HAO, P. C. A critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. **Plant & Cell Physiology**, v. 58, n. 10, p. 1601–1614, 2017. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx104>

GUAN, L.; MURPHY, A. S.; PEER, W. A.; GAN, L.; CHENG, Y. L. Z. (2015) Physiological and molecular of adventitious root formation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34:506-521. <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1090831>

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; SOUZA, C. A. S. **Cafecultura**. Lavras: Editora da UFLA, 2004. 317 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. Harlow: Pearson, 2013. 922p.

HOFFMANN, A.; FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C. Formas de propagação de plantas frutíferas. In.: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2013. p. 27-37.

HUSEN, A. PAL, M. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests**, v. 33, p. 309–323, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11056-006-9030-7>

HUSEN, A.; IQBAL, M.; SIDDIQUI, S. N.; SOHRAB, S. S.; MASRESHA, G. Effect of Indole-3-Butyric Acid on Clonal Propagation of Mulberry (*Morus alba* L.) Stem Cuttings: Rooting and Associated Biochemical Changes. **Proc. Natl. Acad. Sci., Índia**, Sect. B Biol. Sci., v. 87, n. 1, p. 161–166, 2017. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0597-7>.

ILCZUK, A.; JACYGRAD, D. (2016) The effect of IBA on anatomical changes and antioxidant enzyme activity during the in vitro rooting of smoke tree (*Cotinus coggygia* Scop.). **Scientia Horticulturae**, v. 210, p. 268–276, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.07.036>.

INFORZATO, R. O emprego de hormônios no enraizamento de estacas de cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 10, n. 12, p. 385–387, 1950.

IRANKHAH, S.; SILLO, F.; NERVA, L.; GANJEALI, A.; BALESTRINI, R.; CHITARRA, W. Combined Effects of Water Deficit, Exogenous Ethylene Application and Root Symbioses on Trigonelline and ABA Accumulation in Fenugreek. **Applied Sciences**, n. 10, v. 7, p. 2338, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10072338>.

JESUS, A. M. S. Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 2003. 173 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras,

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P.; SOARES, Â. M. Comparação entre sistemas de enraizamento de plantas de *Coffea arabica* L. obtidas por estacas e sementes. **Coffee Science**, 1, n. 1, pp 14–20, 2007.

JESUS, M. A. S.; CARVALHO, S. P.; CASTRO, E. M.; GOMES, C. N. (2010) Observações anatômicas em plantas de *Coffea arabica* L. obtidas por enraizamento de estacas. **Ceres**, Viçosa, v. 57, n.2, p. 175-180, 2010.

KANG, K.; KIM, Y. S.; PARK, S.; VOLTAR, K. Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. **Plant Physiol.**, v. 150, n. 3, p. 1380 – 1393, 2009. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138552>

KANG, K.; KONG, K.; PARK, S.; NATSAGDORJ, U.; KIM, Y. S.; BACK, K. Molecular cloning of a plant N-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 3, p. 304–309, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00841.x>

KANG, K.; LEE, K.; PARK, S.; BYEON, Y. Molecular cloning of rice serotonin N-acetyltransferase, the penultimate gene in plantmelatonin biosynthesis. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 1, p.7–13, 2013. <https://doi.org/10.1111/jpi.12011>

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C., KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, 2010. p.129-150.

KLERK, G. J.; GUAN, H.; HUISMAN, P.; MARINOVA, S. Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus* 'Jork 9'. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 175–185, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9555-9>.

KLERK, G.J., 1996. Markers of adventitious root formation. *Agronomie* 16, 609–616.

KOYAMA, F. C.; CARVALHO, T. L.; ALVES, E.; DA SILVA, H. B.; AZEVEDO, M. F.; HEMERLY, A. S.; GARCIA, C. R. The Structurally Related Auxin and Melatonin Tryptophan-Derivatives and their Roles in *Arabidopsis thaliana* and in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 646-651, 2013. <https://doi.org/10.1111/jeu.12080>

KRYSTYNA, M. J.; POSMYK, M. M.; JANAS, K. M. (2009). Melatonin in plants. **Acta Physiol. Plant**, v. 31, n. 1–11, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010>

LI, S. W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; NA, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rootng. **Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12229-009-9029-9>.

LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. IBA-induced changes in antioxidant enzymes during adventitious rooting in mung bean seedlings: the role of H₂O₂. **Environ. Exp. Bot.**, v. 66, n. 3, p. 442–450, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.005>.

LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I. M. T.; CEREDA, M. P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz CV 'MCO 22') cultivada in vitro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.2, p.107-110, 2002.

LOCATO, V.; PINTO, M.C.; PARADISO, A.; GARA, L. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, 2010. p.45-64.

LOPES, M. C. (1995) Propagação vegetativa da mangueira (*Mangifera indica* L.) por estaquia. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba. 59p.

MAO, J.; NIU, C.; LI, K.; CHEN, S.; TAHIR, M. M.; HAN, M.; ZHANG, D. Melatonin promotes adventitious root formation in apple by promoting the function of MdWOX11. **BMC Plant Biol** v. 20, p. 536, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02747-z>

MITTLER, R. ZILINSKAS, B. A. “Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase,” **Plant Physiology**, v. 97, n. 3, p. 962–968, 1991.

<https://doi.org/10.1104/pp.97.3.962>

MORITA, S.; NAKATANI, S.; KOSHIBA, T.; MASUMURA, T.; OGIHARA, Y.; TANAKA, K. Differential Expression of Two Cytosolic Ascorbate Peroxidases and Two Superoxide Dismutase Genes in Response to Abiotic Stress in Rice, **Rice Science**, v. 18, n. 3, p. 157-167, 2011. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(11\)60023-1](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(11)60023-1).

MURCH, S. J.; KRISHNARA, J. S.; SAXENA, P. K. Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. **Plant Cell Rep.**, v. 19, p. 698–704, 2000.

<https://doi.org/10.1007/s002990000206>

NAG, S.; SAHA, K.; CHOUDHURI, M. A. Role of Auxin and Polyamines in Adventitious Root Formation in Relation to Changes in Compounds Involved in Rooting. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 20, n. 2, p. 182–194, 2001. <https://doi.org/10.1007/s003440010016>

NAWAZ, M. A.; HUANG, Y. BIE, Z.; AHMED, W.; REITER, R. J.; NIU, M.; HAMEED, S. Melatonin: Current Status and Future Perspectives in Plant Science. **Front. Plant Sci.**, v.6, p. 1230, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01230>

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. “Hydrogen peroxide signalling,” **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 5, p. 388–395, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00282-0)

OLIVEIRA, D. H.; BALIZA, D. P.; REZENDE, T. T.; GUIMARÃES, R. J. Influência do comprimento de estacas e ambientes no crescimento de mudas cafeeiras obtidas por enraizamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 183–189, 2010.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. Estudo da influência da época de coleta dos ramos, no enraizamento de estacas caulinares de café (*Coffea arabica* L. cv "MundoNovo"). **Scientia Agricola**, v. 49, n. 1, p. 29-35, 1992.

OPEÑA, J. M.; SOTTO, R. C.; SALAZAR, B. M.; PROTACIO, C. M. Morpho-Anatomical Investigation on the Adventitious Rooting of Hard-to-Root Excelsa Coffee (*Coffea excelsa* A. Chev.) Stem Cuttings. **Philipp Agric Scientist**, v. 103, n. 4, p. 303-310, 2020.

OYARCE, J. C.; CAMACHO, A.; BOBADILLA, L. G.; VIGO, C. N.; VÁSQUEZ, H. V.; VALQUI, G. S. Clonal Propagation of *Coffea arabica* with Indole Butyric Acid and Acclimatization Conditions in Amazonas, Peru. **International Journal of Agronomy**, v. 2021, Article ID 8590590, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2021/8590590>.

PACURAR, D. I.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiol Plant**, v. 151, n. 1, p. 83-96, 2014. doi: 10.1111/ppl.12171. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24547793.

PARK, S.; BYEON, Y.; BACK, K. (2013) Functional analyses of three ASMT gene family members in rice plants. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 4, p. 409–415, 2013.

<https://doi.org/10.1111/jpi.12088>

PAULINO, A. J.; MATIELLO, J. B.; PAULINI, A. E. Produção de mudas de café conilon por estacas. Rio de Janeiro: MIC, 1985. 12 p.

PHAM, V.T.T.; ISMAIL, T.; MISHYNA, M.; APPIAH, K.S.; OIKAWA, Y.; FUJII, Y. Caffeine: The Allelochemical Responsible for the Plant Growth Inhibitory Activity of Vietnamese Tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Agronomy**, n. 9, v. 1, p. 1-15, 2019.

<https://doi.org/10.3390/agronomy9070396>.

PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n.4, p.361-366, 2003.

PORFÍRIO, S.; SILVA, M. D. R.; MARIA, J.; CABRITA, M. J.; AZADI, P.; PEIXEA, A. Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 207-226, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.034>.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; ZHOU, Z.; CRUZ, M. H. C.; FUENTES-BROTO, L.; GALANO, A. Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7396-7437, 2015.

REZENDE, T. T. Clonagem de *Coffea arabica* L. por enraizamento de segmentos de ramos ortotrópicos. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotécnica) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, p.103, 2016.

REZENDE, T. T.; BALIZA, D. P.; OLIVEIRA, D. H.; CARVALHO, S. P.; ÁVILA, F. W.; PASSOS, A. M. A.; GUIMARÃES, R. J. Types of stem cuttings and environments on the growth of coffee stem shoots. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 5, p. 387–391, 2010.

REZENDE, T. T.; CARVALHO, S. P.; BUENO FILHO, J. S. S.; HONDA FILHO, C. P.; SIMÕES, L. C.; PAULINO, R. N. L.; OLIVEIRA, L. L.; NASCIMENTO, T. L. Costa Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) por miniestacas. **Coffee Science**, v. 12, n. 1, p. 91-99, 2017. <http://www.sbicafe.ufv.br:80/handle/123456789/8265>.

ROUT, G. R. Effect of Auxins on Adventitious Root Development from Single Node Cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and Associated Biochemical Changes. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 48, p. 111–117, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-5665-1>.

SARROPOULOU, V. N.; THERIOS, I. N.; DIMASSI-THERIOU, K. N. Melatonin promotes adventitious root regeneration in in vitro shoot tip explants of the commercial sweet cherry rootstocks CAB-6P (*Prunus cerasus* L.), Gisela 6 (*P. cerasus* × *P. canescens*), and MxM 60 (*P. avium* × *P. mahaleb*). **J Pineal Res**, v.52, n. 1, p.38–46, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00914.x>.

SARROU, E.; THERIOS, I.; DIMASSI-THERIOU, K. Melatonin and other factors that promote rooting and sprouting of shoot cuttings in *Punica granatum* cv. Wonderful. **Turkish Journal of Botany**, v. 38, p. 293-301. 2014. <https://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-14-38-2/bot-38-2-9-1302-55.pdf>.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>.

SLEDZ, B.W.; MOTYKA, A.; ZOLEDOWSKA, S.; PACZEK, A.; LOS, E.; RISCHKA, J. Influence of Exogenously Supplemented Caffeine on Cell Division, Germination, and Growth of Economically Important Plants. *Intech*, n. 6, p. 227-232, 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/67799>.

SOMKUWAR, R. G.; BONDAGE, D. D.; SURANGE, M. S.; RAMTEKE, S. D. Rooting behaviour, polyphenol oxidase activity, and biochemical changes in grape rootstocks at different growth Stages, **Turk J Agric For.**, v. 35, p. 281-287, 2011. doi:10.3906/tar-0911-62

TOSTA, M. S.; OLIVEIRA, C. V. F.; FREITAS, R. M. O.; PORTO, V. C. N.; NOGUEIRA, N. W.; TOSTA, P. A. F. Ácido indolbutírico na propagação vegetativa de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, suplemento 1, p. 2727-2740, 2012. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n6Sup1p2727>.

VALLEJOS-TORRES, G.; ARÉVALO, L. A.; RÍOS, O.; CERNA, A.; MARÍN, C. (2020) Propagation of Rust-Tolerant *Coffea arabica* L. Plants by Sprout Rooting in Microtunnels. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 933–940, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00180-7>

VÉRAS, M. L. M. Aplicação de zinco e ethephon nas plantas matrizes e enraizamento de *Spondias*. 2017. 169f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

VOLTAR, K.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. **J Pineal Res**, v. 61, n. 4, p. 426-437, 2016. <https://doi.org/10.1111/jpi.12364>.

WEN, D.; GONG, B.; SUN, S.; LIU, S.; WANG, X.; WEI, M.; YANG, F.; LI, Y.; SHI, Q. Promoting Roles of Melatonin in Adventitious Root Development of *Solanum lycopersicum* L. by Regulating Auxin and Nitric Oxide Signaling. **Front. Plant Sci.** v.7, p. 718, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00718>.

WILSON, P. J.; VAN, S. J. Rhizocaline, rooting co-factors, and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting a review. **Ann Bot.**, v. 66, n. 4, p. 479–490, 1990. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088051>

WILLMON, D.; DEVIREDDY, A. R.; INUPAKUTIKA M.; PUPPALAN, N.; CHO, Y. Stress Responses of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes as Measured by Trigonelline Content after Exposure to UV-B Radiation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 5, p. 998-1010, 2017. <http://www.scirp.org/journal/ajps>.

WINK, M Twardowski, T. Allelochemical properties of alkaloids. Efeitos nas plantas, bactérias e biossíntese de proteínas. In: Rizvi SJH, Rizvi V (eds) Alelopatia: aspectos básicos e aplicados. Chapman & Hall, Nova York, pp 129-150, 1992.

WINK, M. Propriedades aleloquímicas de alcalóides de quinolizidina. In: Macias FA, Garcia Galindo JC, Molinillo JMG, Cutler HG (eds) Alelopatia - química e modo de ação dos aleloquímicos. CRC Press, Boca Raton, pp 183–200, 2004.

YANG, W. C. MA, X.; LI, G.; GAN, L.; NG, D.; XIA, K. (2013) Hydrogen Peroxide Is a Second Messenger in the Salicylic Acid-Triggered Adventitious Rooting Process in Mung Bean Seedlings. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84580.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084580>

YILMAZ, H.; TAŞKIN, T.; OTLUDIL, B. Polyphenol oxidase activity during rooting in cuttings of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. **Jornal Turco de Botânica**, v. 27, n. 6, p. 495-498, 2003.

ZHANG, W.; FAN, J.; TAN, Q.; ZHAO, M.; ZHOU, T.; CAO, F. The effects of exogenous hormones on rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem cuttings. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 0172320, 2017. doi:10.1371/journal.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172320>.

ZHAO, Y.; HU, Y.; DAI, M.; HUANG, L.; ZHOU, D. X. The WUSCHEL-related homeobox gene WOX11 is required to activate shoot-borne crown root development in rice. **Plant Cell**, v. 21, n. 3, p. 736–48, 2009. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061655>.

ZHENG, X. Q.; ASHIHARA, H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Sci.*, n. 166, p. 807–813, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.024>.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO I - H₂O₂ e fenóis atuam diferencialmente na formação de raiz induzidas pela melatonina e pelo AIB em estacas de cafeeiro arábica

Elaborado nas normas do *Annals of Botany*

Artigo Original

H₂O₂ e fenóis atuam diferencialmente na formação de raiz induzidas pela melatonina e pelo AIB em estacas de cafeeiro arábica

Francisco Hélio Alves de Andrade^{1,*}, Ana Maria Oliveira Ferreira¹, Lillian Magalhães Azevedo¹, Meline de Oliveira Santos², Gladyston Rodrigues Carvalho², Elisa Monteze Bicalho¹, Vânia Aparecida Silva²

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; ²Empresa de pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Lavras, Minas Gerais, Brasil

**Autor correspondente. Helioalvesuepb@gmail.com*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

1 **Antecedentes e objetivo:** O enraizamento é um processo complexo que ocorre em três fases,
2 indução, iniciação e expressão. As auxinas e a melatonina já foram comprovadas como
3 fitormônios reguladores de crescimento da raiz, no entanto, ainda não se sabe do mecanismo de
4 que envolve o sistema antioxidante, compostos fenólicos e peróxido de hidrogênio nas
5 diferentes fases do enraizamento na formação de cafeeiro arábica. Com isso, objetivou-se
6 avaliar a formação de raiz (FR) sob aplicação de melatonina e AIB sobre conteúdo de H_2O_2 ,
7 atividade das enzimas do sistema antioxidantes e conteúdo de fenóis totais nas fases do
8 enraizamento (indução, iniciação e expressão) em estacas de cafeeiro arábica.

9 **Métodos:** Utilizou-se quatro tratamentos (Controle, melatonina a $43 \mu M$ (M43), melatonina a
10 $215 \mu M$ (M215) e AIB a $7380 \mu M$ (AIB)) com quatro repetições. Foram analisadas: parâmetros
11 de crescimento e bioquímicos nas diferentes fases do enraizamento indução (0 e 7 dias após o
12 plantio (DAP), iniciação aos 28 DAP e expressão aos 47 e 76 DAP.

13 **Resultados chave:** Quando as estacas foram tratadas com M43 foi observado que o H_2O_2
14 influenciou positivamente para maior peso da matéria seca da raiz (PMSRA), enquanto que os
15 níveis de fenóis totais correlacionaram positivamente com a PMSRA na indução. Além do mais,
16 a SOD, APX e CAT aos 7 DAP correlacionaram positivamente com PMSRA. Aos 28 DAP na
17 fase de iniciação a SOD, POD e PPO também correlacionaram com aumento da PMSRA.
18 Aplicação de AIB estimulou a PPO na fase de indução e APX e CAT correlacionaram
19 positivamente com PMSRA e negativamente com PEE.

20 **Conclusões:** A melatonina M43 promove a FR pelo equilíbrio do conteúdo de H_2O_2
21 orquestrada pelas atividades da SOD, CAT e APX nas fases do enraizamento, além do aumento
22 dos conteúdos de fenóis totais na fase de indução logo após aplicação dos tratamentos. As
23 atividades da PPO e POD parece estar envolvido na FR associada a proteção das estacas
24 associada à melatonina M43. A FR estimulada pelo AIB parece ser um efeito mais mecânico e
25 direto, pois o enraizamento foi antecipado.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

INTRODUÇÃO

A melatonina é uma indolamina descoberta em plantas em 1995 (Hattori *et al.*, 1995), a qual é sintetizada endogenamente em todo o Reino Vegetal, cuja concentração varia nos diferentes tecidos e de acordo com o estágio de desenvolvimento (Reiter *et al.*, 2015), sendo que as raízes, sementes, folhas, bulbos e flores foram consideradas ricas fontes de melatonina (Nawaz *et al.*, 2016). Em plantas superiores a biossíntese da melatonina ocorre em quatro etapas enzimáticas a partir do aminoácido triptofano, a qual a primeira reação é catalisada por triptofano descarboxilase (TDC), em seguida a triptamina 5-hidroxilase (T5H), serotonina N-acetiltransferase (SNAT) e N-acetilserotonina metiltransferase (ASMT) - foram caracterizadas nesta via biossintética (Byeon e Back, 2014; Arnao e Hernandez-Ruiz, 2015; Lee *et al.*, 2016).

Outros estudos apontam que a melatonina atua contra estresses abióticos como salino, déficit hídrico, frio e metais pesados (Chen *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2017; Hodžić *et al.*, 2021). A formação de raiz laterais também foi relatado com aplicação de melatonina em plantas lenhosas como romã (*Punica granatum*) (Sarrou *et al.*, 2014) e maçã (*Malus domestica*) (Mao *et al.*, 2020), além disso, conforme com Sarropoulou *et al.* (2012), sugerem que a melatonina age semelhante a uma auxina no enraizamento e crescimento radicular em diferentes espécies de plantas.

A formação de raiz (FR) ocorre em três fases do enraizamento, indução, a iniciação e a expressão (Husen *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). A fase de indução envolve eventos bioquímicos que precedem mudanças morfológicas visíveis, enquanto que na fase de iniciação ocorre o início dos primórdios e meristemas, enquanto que a fase de expressão caracteriza-se pelo crescimento intra-caulinar do primórdio radicular e emergência da raiz (Guan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Husen *et al.*, 2017).

1 Para que ocorra a FR vários metabolitos precisam atuar nas diferentes fases do
2 enraizamento, sendo que o H₂O₂ atua como sinalizador envolvidos na formação de raiz induzida
3 por auxina e melatonina. Onde as ROS promoveram a divisão celular através da aceleração da
4 entrada no ciclo celular mediada por auxina na alfafa (Feher *et al.*, 2008). A melatonina atua
5 positivamente no conteúdo de H₂O₂, a qual o mesmo regula genes envolvidos no ciclo celular
6 responsáveis pela FR (Chen *et al.*, 2018). Outro papel da melatonina no enraizamento é a
7 capacidade de indução de acúmulo de AIA endógenos (Mao *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2009;
8 Liang *et al.*, 2017), além de promover aumento no conteúdo de fenóis totais na fase de indução,
9 pois os fenóis atuam como protetores das auxinas na FR (Klerk *et al.*, 2011).

10 A presentes pesquisa levanta a hipótese de melatonina e AIB atuam diferentemente na
11 FR, pois a melatonina mante os níveis de H₂O₂ ideais orquestradas pela SOD, CAT e APX nas
12 fases do enraizamento em estacas de cafeeiro arábica, além de promover acúmulo dos fenóis
13 totais na fase de indução que pode estar envolvido na síntese de AIA (Klerk *et al.*, 2011).
14 Enquanto que o ácido indol-3-butírico (AIB) tem um efeito mais mecânico e direto na FR. Com
15 isso, objetivou-se avaliara o FR sob aplicação de melatonina e AIB no conteúdo de H₂O₂,
16 enzimas antioxidantes e conteúdo de fenóis totais nas fases do enraizamento (indução, iniciação
17 e expressão) em estacas de cafeeiro arábica.

18

19

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

21 O experimento foi conduzido de janeiro a março de 2020 no setor de Fisiologia Vegetal,
22 Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil
23 (21°13'40''S e 44°57'50'' O, altitude 960 m), com classificação climática do tipo Cwa
24 (Köppen). A casa de vegetação foi regulada com irrigação a cada 5 minutos com duração de 30

1 segundos das 6:00 até 21:00 horas com intuito de manter a umidade acima de 85% e a
2 temperatura variando entre 18 a 28 °C.

3 *Material utilizado*

4 Utilizou-se mudas da cultivar Mundo Novo com idade de dois anos e oito meses. As
5 mesmas foram podadas no ápice caulinar e envergadas para forçar a brotação de novos ramos
6 ortotrópicos. Após 40 dias do envergamento foram coletados os ramos ortotrópicos para
7 obtenção das estacas para o experimento.

8 As estacas foram preparadas para apresentarem aproximadamente 5 cm de
9 comprimento, sendo realizado corte em bisel da base e realizado o corte na metade das folhas.
10 As estacas foram tratadas com hipoclorito de sódio a 0,05% por 10 min e lavadas com água
11 para retirar o excesso de hipoclorito de sódio (Rezende *et al.*, 2017). Cada estaca possuía apenas
12 um par de folhas. Utilizou-se dois tipos de tubetes, transparentes com volume de 70 cm³ e pretos
13 com 120 cm³.

14 Os tubetes transparentes foram acondicionados no interior do tubetes preto com argola
15 de isopor, ambos tubetes estavam acoplados em bandeja com inclinação de 13,5°. Esse sistema
16 foi criado para auxiliar no enraizamento cumulativo e crescimento da raiz ao longo do tempo.
17 Utilizou-se substrato comercial BASAPLANT[®] para produção de mudas de hortaliças e areia,
18 em proporção de 3/2, respectivamente.

19 *Delineamento e tratamento*

20 Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e quatro
21 níveis de tratamentos (Controle, melatonina 43 µM (M43), melatonina 215 µM (M215) e ácido
22 indol-3-butírico 7380 µM (AIB) e cada parcela foi composta por 10 unidades experimentais
23 para as variáveis fitotécnicas. No entanto, para as variáveis bioquímicas utilizou-se esquema de
24 parcelas subdivididas, a qual os níveis da parcela foram compostos por Controle, M43, M215
25 e AIB e as subparcelas os tempos de coleta das estacas após o plantio que corresponderam as

1 três fases do enraizamento, indução (0 e 7 DAP), iniciação (28 DAP) e expressão (47 e 76
 2 DAP), empregou-se cinco estacas por parcelas experimentais. Os tratamentos foram aplicados
 3 no tempo zero, onde a porção basal das estacas foram mergulhadas em melatonina, AIB, ou
 4 água por um período de 3 minutos antes de serem transplantadas para o tubete.

5 *Variáveis fitotécnicas*

6 Para a porcentagem de estacas enraizadas (PEE) foi utilizado o número de estacas
 7 enraizadas (NEE) e o número de estacas totais (NET) conforme a equação $NEE/NET*100$. O
 8 comprimento da raiz (CR) foi mensurado com auxílio de uma régua graduada (cm). Já a taxa
 9 de crescimento relativo (TCR) foi quantificado conforme Floss (2004) pela seguinte equação:

$$10 \quad TCR = \frac{nlM2 - nlM1}{T2 - T1}$$

11 M1 = Comprimento da primeira coleta;

12 M2 = Comprimento da última coleta;

13 T1 = DAP da primeira coleta;

14 T2 = DAP da segunda coleta;

15 nl = logaritmo natural.

16 As peso da matéria secas da raiz (PMSR) e da parte área (PMSPA) foram mensuradas a
 17 partir da massa fresca, a qual permaneceu por 72 horas em estufa de circulação forçada de ar a
 18 65°C, sendo em seguida pesada em balança digital. E a relação raiz parte área (R/PA) foi obtida
 19 pela divisão da PMSR pela PMSPA.

20

21 *T50 e área de acúmulo de enraizamento (A)*

22 Para quantificar o T50 utilizou-se equação sigmoide ($\hat{y} = \alpha / (1 + e^{-((x-x_0) / b)})$) de três
 23 termos conforme descrito por Romano *et al.* (2019). O x_0 (T50) representa o ponto em que

1 acurva atinge o tempo necessário para atingir 50% do potencial máximo de estacas enraizadas.
2 A partir da mesma equação se calcula o A, sendo a área subjacente à curva sigmoide de 0 a 76
3 dias, como uma integral definida da função e representando o total estacas enraizadas em
4 porcentagem.

5

6 *Variáveis bioquímicas*

7 Os caules frescos foram descascados da base até dois cm, cortados em segmentos
8 menores, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos em -80 até a realização
9 das análises.

10

11 *Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)*

12 Adotou-se o método descrito por Velikova; Yordanov e Edreva (2000). Para extração, amostras
13 de 100 mg de caule fresco foram maceradas em nitrogênio líquido com 50% de
14 polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizadas com 1500 µL de ácido tricloroacético (TCA
15 - 0,1%). As amostras foram centrifugadas a 13000 g por 10 min a 4°C e 45 µL do sobrenadante
16 foi utilizado para a reação com 45 µL de tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0) e 90 µL
17 de iodeto de potássio (1 M). A leitura da absorbância foi realizada em 390 nm em duplicata e
18 os níveis de H₂O₂ quantificados por meio de curva padrão com a solução estoque de H₂O₂ a
19 250 µM.

20

21 *Quantificação dos fenóis totais*

22 Amostras de 100 mg de caule fresco foram maceradas em nitrogênio líquido com 50%
23 de PVPP e homogeneizadas com 500 µL de tampão de extração (metanol - 99%; HCl - 1%) em
24 tubos de *ependorf* de 2 mL. Posteriormente, o extrato foi colocado em gelo, agitado por 4
25 horas no escuro (Zarrouk *et al.* 2012) e centrifugado a 13.000 g por 30 min a 4°C. O

1 sobrenadante foi coletado e adicionado 250 μL de solução tampão ao material decantado, o qual
2 foi centrifugado novamente a 13.000 g por 30 min a 4°C e retirado o segundo sobrenadante.
3 Uma alíquota do segundo sobrenadante foi utilizada para a reação com 2 μL de folin puro, 9
4 μL de carbonato de sódio anidro (220 mg mL^{-1}) e 307 μL de água deionizada. A reação foi
5 colocada em banho-maria a 40°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro
6 a 765 nm e os níveis de ácido gálio (AG) quantificados por meio de uma curva padrão com
7 solução estoque de AG a 1 mg mL^{-1} .

8 *Extração e quantificação de enzimas*

9 Para as extrações enzimáticas (dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT),
10 peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), amostras de 100
11 mg de caule fresco foram maceradas em nitrogênio líquido com 50% de de PVPP e
12 homogeneizadas com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (400 mM; pH 7,8) contendo 10
13 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 200 mM de ácido ascórbico (Biemelt *et al.*
14 1998). O extrato foi centrifugado a 13000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado
15 para quantificação da atividade das enzimas. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de
16 Bradford (Bradford, 1976). As quantificações de todas as enzimas foram realizadas em
17 triplicatas de laboratório.

18 *Atividade da SOD*

19 A atividade da SOD foi quantificada de acordo com a metodologia descrita por
20 Giannopolitis e Ries (1977), a qual consiste na capacidade de inibir a fotorredução do azul de
21 nitrotetrazólio (NBT). Alíquota da amostra foi adicionada ao meio de incubação contendo 100
22 μL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,8), 40 μL de L-metionina (70 mM), 3 μL de
23 EDTA (10 mM), 15 μL de NBT (10 mM), 2 μL de riboflavina (0,2 mM) e 30 μL de água
24 deionizada.

1 A reação foi conduzida em luz fluorescente (20 W) por sete minutos, enquanto o branco
2 foi constituído de água deionizada mais o meio de incubação. A formação do azul de formazan,
3 derivado da redução do NBT, foi realizada através da leitura no espectrofotômetro a 560 nm.
4 Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50%
5 a redução do NBT.

6 *Atividade da CAT*

7 A atividade da CAT foi quantificada conforme Havir e Mchale (1987). Alíquota do
8 extrato enzimático fora adicionada ao meio de incubação, contendo 90 µL de tampão fosfato
9 de potássio (200 mM; pH 7,0) e 72 µL de água deionizada e incubadas a 30°C em banho-maria.
10 No momento da leitura foi adicionado 9 µL de H₂O₂ (250 mM). Em seguida, atividade da CAT
11 foi mensurada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, durante 3
12 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio.

13 *Atividade da APX*

14 A atividade da APX foi aferida em meio composto do extrato enzimático, 90 µL de
15 tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 6,0), 9 µL de ácido ascórbico (10 mM) e 63 µL de
16 água deionizada. Incubada a 30 °C em banho-maria, e no momento da leitura adicionou 9 µL
17 de H₂O₂ (2 mM) (Koshiba, 1993). A oxidação do ascorbato foi realizada na leitura no
18 espectrofotômetro a 290 nm, cada 15 s por 3 min (Nakano e Asada, 1981). O coeficiente de
19 extinção molar usado foi de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

20 *Atividade da POD*

21 A atividade da POD foi determinada conforme a metodologia de Neves (2003).
22 Alíquotas do extrato enzimático foram adicionadas ao meio de reação composto de 180 µL do
23 tampão fosfato de sódio (100 mM; pH 6,0), 60 µL de guaiacol (0,8%), 60 µL de H₂O₂ (0,9%)
24 e 50 µL de água deionizada. O tampão fosfato de sódio foi incubado a banho-maria a 30 °C. A
25 leitura foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm, a cada 15 segundos com duração de 2

1 minutos, e a atividade foi compreendida pelo aumento da absorbância. O coeficiente de
2 extinção molar foi de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3 *Atividade da PPO*

4 A atividade da PPO foi determinada conforme a metodologia adaptada de Kar; Mishra
5 (1976). Alíquotas do extrato enzimático foram adicionadas ao meio de reação composto de 200
6 μL do tampão fosfato de sódio (70 mM; pH 7,0), 40 μL de catecol (100 mM). O meio de reação
7 foi incubado a banho-maria a 30 °C por 5 min antes de adicionar o extrato. A leitura foi realizada
8 em espectrofotômetro a 410 nm, a cada 13 segundos com duração de 1,3 minutos, e a atividade
9 foi compreendida pelo aumento da absorbância. O coeficiente de extinção molar foi de $1,235$
10 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

11 *Análise estatística*

12 Após a obtenção dos dados, utilizou-se a plataforma R versão 4.0.5 para realizar as
13 análises estatística. Foi realizado teste de normalidade e homogeneidade Shapiro-willk, Bartlete
14 o teste F ($p < 0,05$) e o teste Duncan a 5% de probabilidade, para fazer a comparação de médias,
15 com auxílio do pacote estatístico ExpDes.pt (Ferreira *et al.*, 2021). Também foi realizado
16 correlação de Pearson (teste t, $p < 0,05$) com auxílio do pacote ggcorrplot (Kassambara, 2019).
17 Utilizou-se software SigmaPlot® versão 12.3 para ajustar o modelo sigmoide e exponencial.
18 Além da construção das Fig. 1, 2 e 4.

19

20

RESULTADOS

21 *Efeito da melatonina e AIB no estabelecimento e morfologia*

22 Foram observadas as três fases do processo de enraizamento (indução, iniciação e
23 expressão) aos 7, 28 e 47 DAP, respectivamente (Fig. 1A).

24 As estacas que foram expostas ao AIB e a melatonina M215 tiveram o enraizamento
25 antecipado na fase de iniciação, em comparação aos demais tratamentos. Já na fase de

1 expressão, a partir de 47 DAP, o AIB proporcionou uma maior porcentagem de enraizamento,
2 apresentando uma estabilização após 65 DAP. Por outro lado, estacas dos tratamentos controle,
3 M43 e M215 apresentaram estabilização do enraizamento após 76, 76 e 73 DAP,
4 respectivamente (fig. 1A).

5 A TCR melhor se ajustou a equação do modelo exponencial de três termos com R^2 de
6 0,99 (Tabela 1). Foi notório que M215 e AIB proporcionaram os maiores valores de TCR aos
7 49, 52, 55 e 58 DAP, no entanto, aos 76 DAP todos tratamentos apresentaram valores próximos
8 ao controle (Fig. 1B).

9 Das variáveis estudadas na presente pesquisa, apenas a PEE ao final do experimento não
10 sofreu efeito significativo pelos tratamentos no teste Duncan a 5% de probabilidade (Fig. 2A).
11 Já o CR apresentou maior valor no tratamento AIB, seguido de M43, nos quais foram
12 averiguados incrementos de 30 e 10% em relação ao tratamento controle, respectivamente (Fig.
13 2B).

14 O T50 teve maior valor no tratamento M215 e menor no AIB, enquanto que M43 não
15 diferiu do controle. Foi notório que o AIB antecipou em oito dias para atingir 50% do potencial
16 máximo de enraizamento, enquanto que o M215 retardou oito dias em relação ao tratamento
17 controle (Fig. 2C). Já em relação à PMSR, os tratamentos M43, M215 e AIB promoveram
18 incremento em comparação com tratamento controle de 19, 22 e 47%, respectivamente (Fig.
19 2D). O tratamento de AIB promoveu maior valor de A em comparação aos demais, com
20 incremento de 41% em relação ao tratamento controle (Fig. 2E).

21 Foi observado na PMSPA que os tratamentos M215 e AIB promoveram redução
22 significativa de 20 e 33% comparado com o controle, no entanto, os resultados foram
23 constatados no controle e M43 (Fig. 2F). Para R/PA foi observado que nas estacas submetidas
24 aos tratamentos M43, M215 e AIB houve aumento na relação de 1,2; 1,5 e 2,2 vezes em relação
25 ao controle, respectivamente (Fig. 2G).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Efeito do AIB e melatonina na atividade enzimática, fenóis totais e H₂O₂

Foi observado na coleta 0 DAP que o H₂O₂ foi maior nas estacas submetidas a M43, enquanto que, aos 7 DAP foram encontrados redução nos tratamentos M43, AIB e M215 de 30,5; 41,66 e 47,22% em relação ao controle, respectivamente (Fig. 3A). Porém, quando se observa a coleta aos 28 DAP o tratamento M43 proporcionou incremento de 80% em relação ao controle, e aos 47 DAP os tratamentos M43 e M215 apresentaram maiores conteúdo de 0,21 e 0,28 mmol g⁻¹ MF de H₂O₂, enquanto que a testemunha acarretou valor de 0,17.

Para a atividade da CAT, os tratamentos de melatonina e AIB promoveram diferença significativa (Duncan, p<0,05) em relação ao tratamento controle aos 7 DAP. Além do mais, os tratamentos M43, M215 e AIB promoveram aumento de 76, 62 e 90% em comparação com o controle, respectivamente. Foi notável aos 76 DAP que os tratamentos M43 e M215 promoveram maiores atividades da CAT com valores que corresponderam a 0,140 e 0,391 μmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Fig. 3B).

Foi observado que os tratamentos de melatonina e AIB promoveram aumento significativo (Duncan, p<0,05), dentro dos tempos de coleta 7, 28, 47 e 76 DAP na atividade da APX. Foi notório incremento em M43, M215 e AIB de 345; 379 e 490% em 7 DAP, 43; 212 e 164% em 28 DAP, 82; 65 e 65% em 47 DAP, 59 e 31% em 76 DAP em relação ao tratamento controle, respectivamente (Fig. 3C).

A atividade da POD começou a apresentar efeito significativo entre os tratamentos a partir de 28 DAP, no qual, o tratamento M215 acarretou aumento significativo de 24% em comparação com a testemunha. Já nos 47 e 76 DAP, o tratamento M43 acarretou atividade superior em relação à testemunha, onde foi constatado adição de 2,42 e 3,19 nmol de tetraguaiacol min⁻¹ mg⁻¹ de proteínas, respectivamente (Fig. 3D).

1 Já na atividade da SOD, o tratamento com melatonina M43 apresentou diferença
2 significativa em relação ao controle aos 7, 47 e 76 DAP. Onde foi testemunhado que o M43
3 proporcionou acréscimo de 120% aos 7 DAP, 81% aos 47 DAP e 41% aos 76 DAP,
4 respectivamente (Fig. 3E).

5 Os tratamentos compostos de melatonina estimularam maiores atividade da PPO aos 7,
6 47 e 76 DAP, enquanto que o AIB apresentou maior atividade da PPO em 0 DAP (Fig. 3F). Foi
7 observado incremento de 34 e 31% nos tratamentos M43 e M215, respectivamente, em
8 comparação com controle, aos 7 DAP. Enquanto que o M43 acarretou aumento nos 47 e 76
9 DAP de 59 e 20% na atividade da PPO em relação ao controle, respectivamente.

10 Já na Fig. 3G, referente ao conteúdo de fenóis totais, foi observado que no dia 0 DAP
11 o tratamento de melatonina M43, estimulou incremento de 23% em comparação com o
12 tratamento controle. No entanto, os tratamentos AIB e M43 tiveram picos aos 28 DAP,
13 enquanto que o tratamento M215 e Controle apresentaram picos aos 47 DAP.

14 *Efeito da melatonina e AIB exógena sob a formação de raiz e bioquímica*

15 Quando as estacas foram submetidas a M43 foi observado que houve correlação
16 negativa entre T50 e CR, assim como, PMSR e R/PA. As correlações variaram de -0,8 até -1 e
17 0,8 até 1 (Fig. 5).

18 Observou-se a 0 DAP correlações positivas entre a SOD e APX, CAT com PMSR e CR,
19 H₂O₂ e PMSR correlacionam-se entre si. Aos 7 DAP foi relatado que H₂O₂ correlacionou
20 negativamente com APX, POD e SOD. As atividades enzimáticas da PPO, POD e APX
21 correlacionam entre si positivamente, enquanto que a atividade da CAT correlacionou de forma
22 positiva com PPO e POD. Também aos 7 DAP foi observado que houve correlação positiva das
23 variáveis de crescimento e bioquímica, a qual a PMSR correlacionou com POD, APX e SOD,
24 enquanto que o CR teve correlação positiva com a CAT.

1 A presente pesquisa, procurou-se compreender o possível papel do AIB e melatonina
2 exógena na FR em estacas de cafeeiro arábica sob as diferentes fases do enraizamento, e
3 verificou-se que ambas as moléculas atuam diferentemente, visto que, o AIB possui um papel
4 direto na FR, uma vez que o enraizamento foi antecipado ao reduzir o T50 (Fig. 2C), além de
5 estimular a biossíntese de AIA nas fases de indução e expressão do enraizamento (Fig. 6)
6 (Elmongy *et al.*, 2018), por outro lado, a melatonina atua possivelmente de forma secundária,
7 onde estimulou eventos bioquímicos nas diferentes fases do enraizamento para favorecer a FR,
8 a qual justifica o atraso do enraizamento em comparação ao AIB (Fig. 1A e 4), e um dos eventos
9 importantes na presente pesquisa, foi o aumento do conteúdo de H₂O₂ em estacas tratadas com
10 M43, pois apresentou correlação positiva com o PMSR e/ou CR nas fases do enraizamento, tais
11 como, na indução logo após aplicação dos tratamentos, na fase de iniciação e expressão (Fig.
12 4). A atividade da SOD também pode ter contribuído para o acúmulo de H₂O₂ na fase de
13 indução e expressão pela dismutase do O₂⁻ a H₂O₂, como também, a menor atividade da CAT
14 na iniciação.

15 Estudo anterior verificou que estacas lenhosas de *Malus hupehensis* tratadas com AIA,
16 que a SOD possui atividade aumentada até a fase de expressão, associando a função da SOD a
17 defesa antioxidante de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Zhang *et al.*, 2017). No entanto, a
18 presente pesquisa incorpora mais um papel importante da SOD no enraizamento em estacas
19 tratadas com M43, que é justamente a capacidade de acumular H₂O₂. Embora a atividade da
20 APX e CAT tenha sido elevadas nas diferentes fases do enraizamento em estacas tratadas com
21 M43 (Fig. 3B e C), o conteúdo de H₂O₂ manteve alto em relação ao tratamento controle. Então,
22 estas atividades orquestradas pela SOD, APX e CAT sob aplicação de melatonina M43, pode
23 estar associada ao equilíbrio de H₂O₂ a níveis ideais para favorecer a FR. Entretanto, a ideia de
24 que o H₂O₂ atua na FR em estacas de cafeeiro arábica mediada pela melatonina também foi
25 comprovado em *Medicago sativa* (Chen *et al.*, 2018), pois verificaram que o H₂O₂ regula

1 positivamente dois genes (*AtCDKB1;1* e *AtCDKB2*) envolvidos no ciclo celular responsável
2 pela FR mediado pela melatonina (Fig 6), e quando o H₂O₂ foi eliminado ou redução em sua
3 síntese com uso de difenileniodônio (DPI) como inibidor da NADPH oxidase e dimetiltiourea
4 (DMTU) como eliminador de H₂O₂, a expressão dos genes foram reguladas para baixo e a FR
5 prejudicada.

6 Já a atividade da CAT e APX apresentaram papel importante para antecipar o
7 enraizamento, a qual, ambas enzimas reduziram do H₂O₂ a água na fase de indução, pois tanto
8 APX e CAT correlacionaram negativamente com conteúdo de H₂O₂ (Fig. 4) em estacas tratadas
9 com AIB, pois provavelmente ambas enzimas atuaram na varredura do H₂O₂ (Fig. 4). A ação
10 do H₂O₂ na presente pesquisa, confirma a ideia que o AIB e melatonina atuam de forma
11 diferente na FR, pois sob aplicação de AIB o H₂O₂ correlacionou negativamente com PMSR e
12 sob aplicação de M43 o H₂O₂ correlacionou positivamente com a PMSR (Fig. 4).

13 Os fenóis totais parecem estar envolvidos na FR mediada pela melatonina, visto que,
14 houve um incremento na fase de indução logo após a aplicação dos tratamentos (Fig. 3G). E o
15 aumento no conteúdo de fenóis na presente pesquisa mediada a aplicação de M43,
16 possivelmente esteja associado menor atividade da PPO, onde se observa correlação negativa
17 dos fenóis totais com a PPO (Fig. 4). A ligação entre os compostos fenólicos e a FR é justamente
18 a capacidade dos di e polifenóis protegerem o AIA contra a descarboxilação e favorecendo o
19 acúmulo de AIA (Fig. 5) (Klerk *et al.*, 2011). Provavelmente o maior conteúdo de fenóis totais
20 estimulada pelo tratamento de M43 tenha estimulado um acúmulo de AIA, sendo justificado
21 pela correlação positiva dos fenóis totais com PMSR (Fig. 4).

22 As atividades da PPO e POD também foram correlacionadas com a FR na fase de
23 expressão (Fig. 4), nesta fase o processo de emergência da raiz já ocorreu, e atividade de ambas
24 enzimas podem estar associadas a proteção da estaca contra patógenos. Tanto a PPO, quanto a

1 POD podem estar relacionadas ao processo de lignificação, pois ambas enzimas podem usar
2 como substrato compostos fenólicos percussores de ligninas (Bolaños; Silva, 2004; Rout,
3 2006). Sendo que, o aumento da síntese de lignina facilita a formação da parede celular e
4 melhora resistência (Jackson et al., 2001). O aumento da POD nos primeiros dias, poderia
5 reduzir o conteúdo de auxinas e lignificar a base das estacas dificultando formação de raízes,
6 pois a POD auxilia o catabolismo da auxina, principalmente nas fases iniciais do enraizamento
7 (Husen et al., 2017). Pesquisas apontam que a atividade da POD foi menor nos primeiros dias
8 após o plantio das estacas (Husen et al., 2017; Zhang et al., 2017).

9 Em conclusão, a melatonina M43 promove a FR pelo incremento do conteúdo de H₂O₂
10 orquestrada pelas atividades da SOD, CAT e APX nas fases do enraizamento, além do aumento
11 dos conteúdos de fenóis totais na fase de indução logo após aplicação dos tratamentos. As
12 atividades da PPO e POD parece estar envolvido na FR associada a proteção das estacas
13 associada à melatonina M43. A FR estimulada pelo AIB parece ser um efeito mais mecânico e
14 direto, pois o enraizamento foi antecipado.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Os autores agradecem o apoio financeiro do Consórcio de Pesquisa Café, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café)

LITERATURA CITADA

- 1
2 Arnao MB; Hernandez-Ruiz J. 2015. Function of melatonin in plants: a review. Journal
3 of Pineal Research, 59: 133–150. doi.org/10.1111/jpi.12253
- 4 Biemelt S, Keetman U e Albrecht G. 1998. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads
5 to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. Plant Physiol 116:
6 651–658. doi.org/10.1104/pp.116.2.651
- 7 Bolaños EMA; Silva EM. 2004. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity,
8 phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. Postharvest Biology and
9 Technology, 33: 275–283. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.03.009
- 10 Bradford MMA. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
11 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry
12 72:248-254. [doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 13 Byeon Y; Back K. 2014. Melatonin synthesis in rice seedlings in vivo is enhanced at high
14 temperatures and under dark conditions due to increased serotonin N-acetyltransferase and N-
15 acetylserotonin methyltransferase activities. Journal of Pineal Research, 56: 189–195.
16 doi.org/10.1111/jpi.12111
- 17 Campos CN, Ávila RG, Souza KRD, Azevedo LM, Alves JD. 2019. Melatonin reduces
18 oxidative stress and promotes drought tolerance in young Coffea arabica L. plants, Agricultural
19 Water Management, 211:37-47. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.09.025>.
- 20 Chen Q, Qi WB, Russel J, Wei W, Wang BM. 2009. Exogenously applied melatonin
21 stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings
22 of Brassica juncea. J Plant Physiol. 2009:324–328. doi.org/10.1016/j.jplph.2008.06.002
- 23 Chen Z, Gu Q, Yu X, Huang L, Xu S, Wang R, Shen W, Shen W. 2018. Hydrogen
24 peroxide acts downstream of melatonin to induce lateral root formation, Annals of Botany
25 121:1127–1136. doi.org/10.1093/aob/mcx207

- 1 Chen Z, Xie Y, Gu Q et al. 2017. The AtrbohF-dependent regulation of ROS signaling is
2 required for melatonin-induced salinity tolerance in Arabidopsis. *Free Radical Biology and*
3 *Medicine*108: 465–477. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.009
- 4 Elmongy Ms, Cao Y, Zhou H, Xia Y. 2018. Root Development Enhanced by Using
5 Indole-3-butyric Acid and Naphthalene Acetic Acid and Associated Biochemical Changes of
6 In Vitro Azalea Microshoots. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37:813–825,
7 doi.org/10.1007/s00344-017-9776-5
- 8 Feher A, Ötvös K, Pasternak TP, Pettkó-Szandtner A. 2008. The involvement of reactive
9 oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. *Plant*
10 *Signaling & Behavior*, 3: 823–826. doi.org/10.1007/s10725-006-9152-0
- 11 Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA. 2021. *ExpDes.pt: Pacote Experimental*
12 *Designs (Portugues)*. <https://cran.rproject.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>.
- 13 Floss, E. L. 2004. *Fisiologia das plantas cultivadas Passo Fundo: Ed. da UPF*.
- 14 Garrido G, Guerreo JR, Cano EA, Acosta M, Sánchez-Bravo, J. 2002. Origin and
15 basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiol. Plantar*.
16 114, 303–312. doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140217.x
- 17 Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants.
18 *Plant Physiol* 59: 309–314. doi.org/10.1104/pp.59.2.309
- 19 Guan L, Murphy AS, Peer WA, Gan L, Li Y. 2015. Physiological and molecular
20 regulation of adventitious root formation. *Crit Rev Plant Sci*. 2015; 34: 506–521.
21 doi.org/10.1080/07352689.2015.1090831
- 22 Han QH, Huang B, Ding CB et al. 2017. Effects of melatonin on anti-oxidative systems
23 and photosystem II in cold-stressed rice seedlings. *Frontiers in Plant Science*8: 785.
24 doi.org/10.3389/fpls.2017.00785

- 1 Hattori A, Migitaka H, Iigo M et al. 1995. Identification of melatonin in plants and its
2 effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates.
3 *Biochemistry and Molecular Biology International*, 35: 627–634.
4 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7773197/>
- 5 Havir EA, MChale NA. 1987. Biochemical and developmental characterization of
6 multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*. 84:450-455.
7 doi.org/10.1104/pp.84.2.450
- 8 Hodžić E, Galijašević S, Balaban M, Rekanović S, Makić H, Kukavica B, Mihajlović D.
9 2021. The protective role of melatonin under heavy metal-induced stress in *Melissa Officinalis*
10 L. *Turkish journal of chemical*, 45:737-748. doi.org/10.3906/kim-2012-7. 10.3906/kim-2012-7
- 11 Husen A, Iqbal M, Siddiqui SN, Sohrab SS, Masresha G. 2017. Effect of Indole-3-Butyric
12 Acid on Clonal Propagation of Mulberry (*Morus alba* L.) Stem Cuttings: Rooting and
13 Associated Biochemical Changes. *Proc. Natl. Acad. Sci., Índia, Seção B Biol. Sci.* 87: 161–
14 166. doi.org/10.1007/s40011-015-0597-7
- 15 Jackson PA, Galinha CI, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amâncio SB, Pinto
16 Ricardo CP. 2001. Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus
17 cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiol* 127:1065-1076.
18 [doi/10.1104/pp.010192](https://doi.org/10.1104/pp.010192)
- 19 Kar M, Mishra D. 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during
20 Rice Leaf Senescence. *Plant Physiol* 57: 315–319. doi.org/10.1104/pp.57.2.315
- 21 Kassambara A, 2019. ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using 'ggplot2'.
22 <https://cran.r-project.org/web/packages/ggcorrplot/index.html>.
- 23 Klerk GJ, Guan H, Huisman P, Marinova S. 2011. Effects of phenolic compounds on
24 adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus*
25 'Jork 9'. *Journal Plant Growth Regulation* 63:175–185. doi.org/10.1007/s10725-010-9555-9

- 1 Koshihara T, 1993. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea*
2 *mays*). *Plant Cell Physiol* 34: 713–721. doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078474
- 3 Lee K, Zawadzka A, Czarnocki Z, Reiter RJ, Back K. 2016. Molecular cloning of
4 melatonin 3-hydroxylase and its production of cyclic 3-hydroxymelatonin in rice (*Oryza*
5 *sativa*). *Journal of Pineal Research*, 61: 470–478. doi.org/10.1111/jpi.12361
- 6 Liang C, Li A, Yu H, Li W, Liang C, Guo S, Zhang R, Chu C. 2017. Melatonin Regulates
7 Root Architecture by Modulating Auxin Response in Rice. *Frontiers Plant Science* 8: 134.
8 doi.org/10.3389/fpls.2017.00134
- 9 Liu B, Wang L, Zhang J, Li J, Zheng H, Chen J, Lu M. 2014. WUSCHEL-related
10 Homeobox genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional
11 similarity in adventitious root formation. *BMC Genomics*. 15:296. [doi.org/10.1186/1471-2164-](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-296)
12 [15-296](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-296)
- 13 Mao J, Niu C, Li K, Chen S, Tahir MM, Han M, Zhang D. 2020. Melatonin promotes
14 adventitious root formation in apple by promoting the function of MdWOX11. *BMC Plant Biol*
15 20: 1-19. doi.org/10.1186/s12870-020-02747-z
- 16 Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific
17 peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867–880.
18 [10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232)
- 19 Nawaz Ma, Huang Y, Bie Z, Ahmed W, Reiter Rj, Niu M, Hameed S. 2016. Melatonin:
20 Current Status and Future Perspectives in Plant Science. *Front. Plant Sci.*, 6:1230, 2016.
21 doi.org/10.3389/fpls.2015.01230
- 22 Neves LLM. 2003. Envolvimento de Enzimas Oxidativas no Escurecimento do Quiabo
23 [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa,
24 Viçosa.

- 1 Ramo´ n Pelagio-Flores, Edith Mun˜ oz-Parra, Randy Ortiz-Castro, pez-Bucio JL. 2012.
2 Melatonin regulates Arabidopsis root system architecture likely acting independently of auxin
3 signaling. *J Pineal Res.* 53:279–288. [10.1111/j.1600-079X.2012.00996.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00996.x)
- 4 Reiter RJ, Tan DX, Zhou Z, Cruz MHC, Fuentes-Broto, L, Galano A. 2015.
5 Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules*, 20: 7396-7437.
6 [10.3390/molecules20047396](https://doi.org/10.3390/molecules20047396)
- 7 Rezende TT, Carvalho SP, Bueno Filho JSS, et al. 2017. Costa Propaga¸ ˜ao vegetativa do
8 cafeeiro (*Coffea arabica* L.) por miniestacas. *Coffee Science* 12:91-99.
- 9 Romano A, Stevanato P, Sorgona A, Cacco G, Abenavoli MR. 2019. Dynamic Response
10 of Key Germination Traits to NaCl Stress in Sugar Beet Seeds. *Sugar Tech* 21:661–671.
11 doi.org/10.1007/s12355-018-0660-9
- 12 Rout GR. 2006. Effect of auxins on adventitious root development from single node
13 cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Journal Plant*
14 *Growth Regulation* 48: 111–117. doi.org/10.1007/s10725-005-5665-1
- 15 Sarropoulou VN, Therios IN, Dimassi-Theriou KN. 2012. Melatonin promotes
16 adventitious root regeneration in in vitro shoot tip explants of the commercial sweet cherry
17 rootstocks CAB-6P (*Prunus cerasus* L.), Gisela 6 (*P. cerasus* × *P. canescens*), and MxM 60 (*P.*
18 *avium* × *P. mahaleb*). *Journal Pineal Research*, 52:38-46. [doi.org/10.1111/j.1600-](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00914.x)
19 [079X.2011.00914.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00914.x)
- 20 Sarro E, Therios I, Dimassi-Theriou K. 2014. Melatonin and other factors that promote
21 rooting and sprouting of shoot cuttings in *Punica granatum* cv. Wonderful. *Turkish Journal of*
22 *Botany*, 38: 293-301. [https://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-14-38-2/bot-38-2-9-](https://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-14-38-2/bot-38-2-9-1302-55.pdf)
23 [1302-55.pdf](https://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-14-38-2/bot-38-2-9-1302-55.pdf)

1 Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems
2 in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Science.
3 151:59–66. [doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)

4 Zarrouk O, Francisco R, Pinto-Marijuan, M, et al. 2012. Impact of irrigation regime on
5 berry development and flavonoids composition in Aragonez (Syn. Tempranillo) grapevine.
6 Agricultural Water Management 114: 18–29. [10.1016/j.agwat.2012.06.018](https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.06.018)

7 Zhang W, Fan J, Tan Q, Zhao M, Zhou T, Cao F. 2017. The effects of exogenous
8 hormones on rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem
9 cuttings. PLoS ONE 12: e0172320. doi.org/10.1371/journal.pone.0172320

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 LEGENDA DAS FIGURAS

2 **Fig. 1:** Enraizamento cumulativo (A) e TCR - taxa de crescimento relativo (B) de *Coffea*
3 *arabica* L. cultivar Mundo Novo sob aplicação de melatonina e AIB em função dos DAP. A
4 fase de indução e iniciação estão representadas pela degrade verde e amarelo, respectivamente,
5 já a fase de expressão está representada pela cor laranja. Quanto mais intenso for a cor, mais
6 representado é a fase.

7 **Fig. 2:** PEE - porcentagem de estacas enraizadas (A), CR – comprimento da raiz (B), T50 -
8 tempo necessário para atingir 50% do potencial máximo (C), PMSR – peso da matéria seca da
9 raiz (D), A – área acumulado do enraizamento (E), PMSPA – peso da matéria seca da parte
10 aérea (F) e R/PA – relação raiz parte aérea (G) em função aplicação de exógena de melatonina
11 e AIB em estacas de cafeeiro arábica cultivar Mundo Novo.

12 **Fig. 3:** H₂O₂ – peróxido de hidrogênio, SOD - dismutase do superóxido, CAT - catalase, APX
13 - peroxidase do ascorbato, POD - peroxidase e PPO - polifenoloxidase em função aplicação de
14 melatonina e AIB aos 0, 7, 28, 47 e 76 DAP em estacas de cafeeiro arábica cultivar Mundo
15 Novo. Letras minúsculas compara os tratamentos dentro de cada dia após o plantio (DAP).
16 Letras maiúsculas compara os DAP dentro de cada tratamento pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

17 **Fig. 4:** Análise de correlação entre as variáveis, PEE - porcentagem de estacas enraizadas, CR
18 – comprimento da raiz, T50 - tempo necessário para atingir 50% do potencial máximo, PMSR
19 – peso da matéria seca da raiz, A – área acumulado do enraizamento, PMSPA – peso da matéria
20 seca da parte aérea, R/PA – relação raiz parte aérea, H₂O₂ – peróxido de hidrogênio, SOD -
21 dismutase do superóxido, CAT - catalase, APX - peroxidase do ascorbato, POD - peroxidase e
22 PPO - polifenoloxidase em função aplicação de exógena de melatonina e AIB em estacas de
23 cafeeiro arábica cultivar Mundo Novo. Círculos verdes e vermelhos significa correlação
24 positiva e negativa, respectivamente e efeito significativo pelo teste t ($p < 0,05$).

1 **Fig. 5:** Possível mecanismo integrativo do conteúdo de fenóis, H₂O₂, atividade enzimática do
2 sistema antioxidante na formação de raiz sob aplicação de melatonina e AIB nas fases do
3 enraizamento (Indução, iniciação e expressão). Setas azuis e pretas indicam o efeito positivo da
4 melatonina e AIB, respectivamente, setas tracejadas laranja indicam as informações baseadas
5 na literatura.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **TABELA**

Tabela 1. Equações ajustadas para as características de porcentagem de estacas enraizadas (Fig. 1A) e taxa de crescimento relativo (TCR, Fig. 1B) de *Coffea arabica* L. sob aplicação de melatonina e AIB em função dos DAP.

Porcentagem de estacas enraizadas			
Tratamentos	Equação		Valor-p
Controle	$\hat{y} = 1,19 + 117,47/(1+\exp(-(x-15,16)/ 14,88))^{138,65}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M43	$\hat{y} = 1,36+81,17/(1+\exp(-(x-52,98)/ 7,10))^{1,42}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M215	$\hat{y} = -1,44+88,94/(1+\exp(-(x-72,07)/ 0,134))^{0,008}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
AIB	$\hat{y} = -0,68+94,86/(1+\exp(-(x-60,02)/ 4,17))^{0,34}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
Taxa de crescimento relativo (TCR)			
Tratamentos	Equação		Valor-p
Controle	$\hat{y} = 3,74-11,49 (1-\exp(-0,0244x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M43	$\hat{y} = 4,02-10,60 (1-\exp(-0,0214x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M215	$\hat{y} = 2,297-30,66 (1-\exp(-0,0572x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001
AIB	$\hat{y} = 2,339-39,207 (1-\exp(-0,0622x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001

2

3

4

5

6

7

8

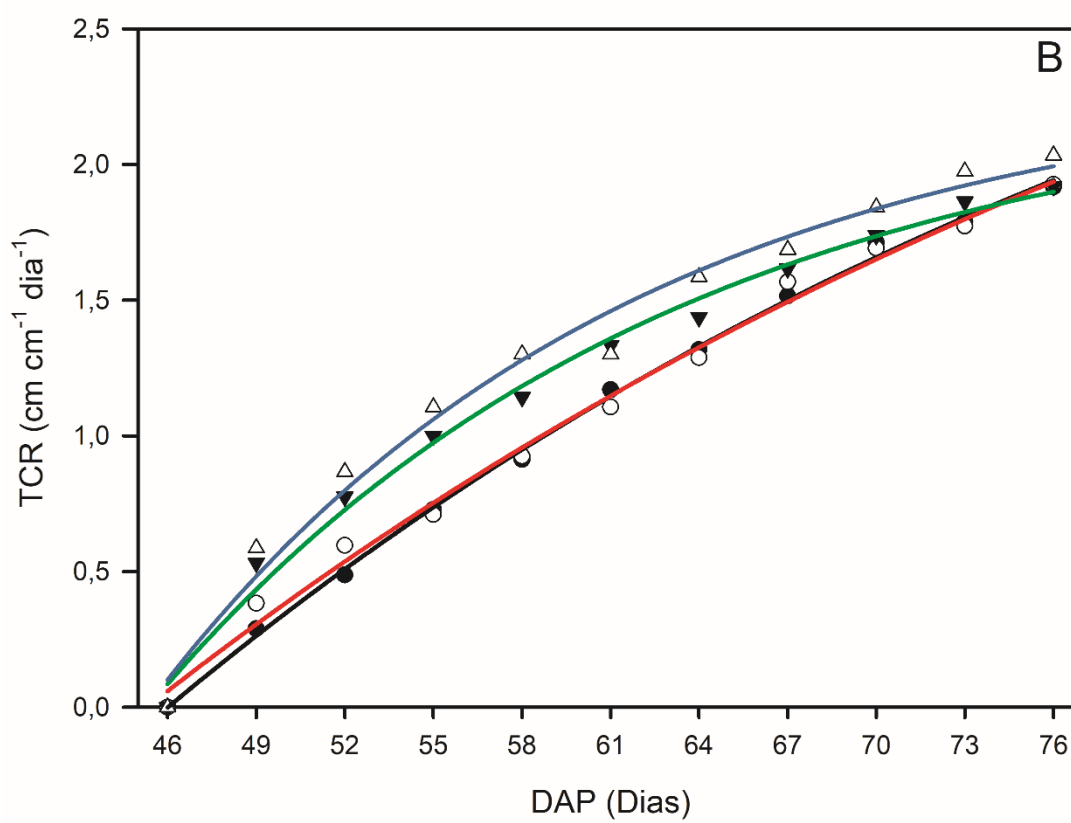
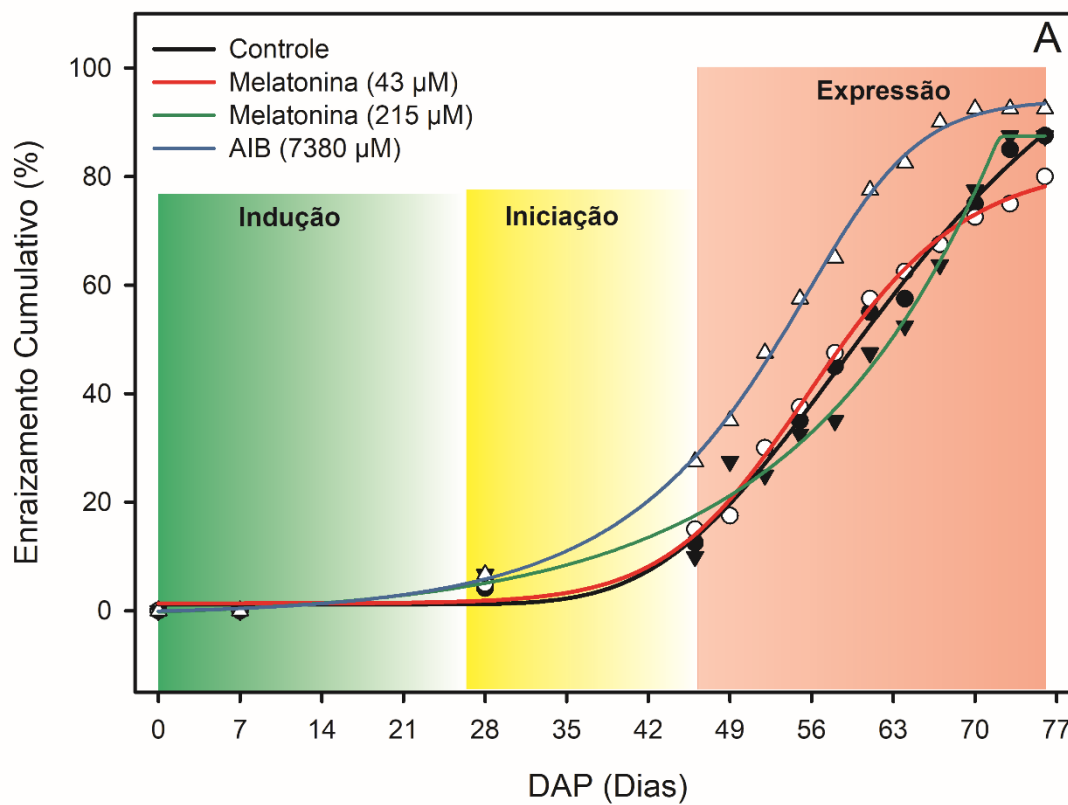
9

10

11

1

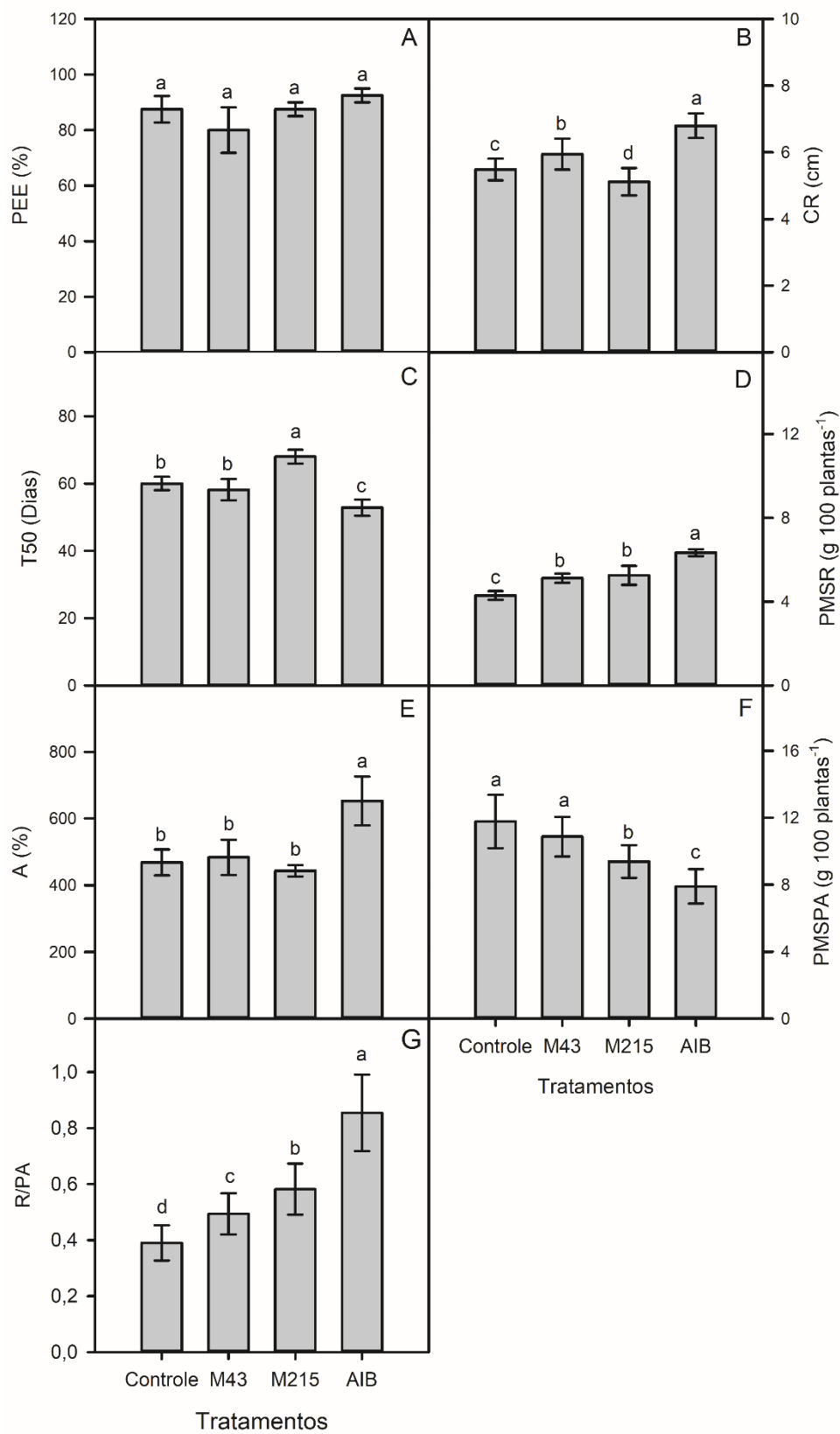
Figura 1



2

1

Figura 2

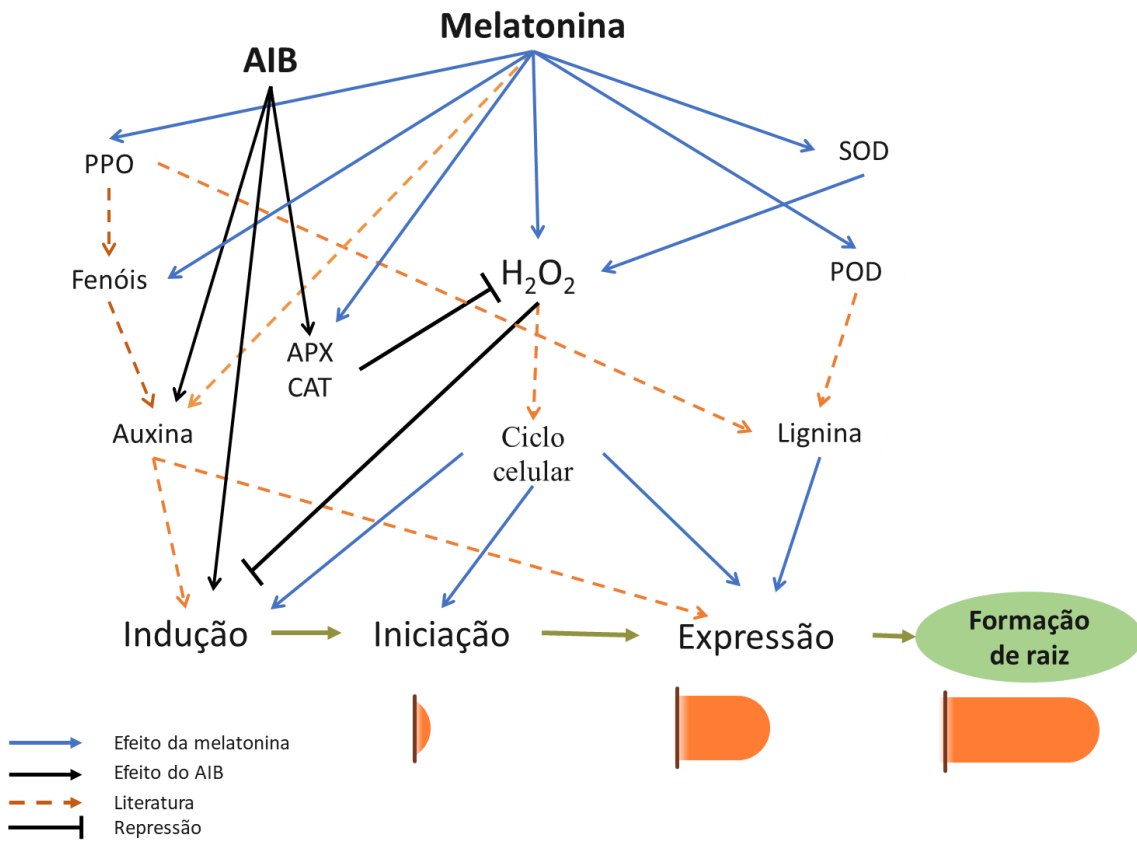


2

3

1

Figura 5



2

ARTIGO II - Trigonelina e cafeína em estacas de cafeeiro arábica durante a formação de raízes adventícias após aplicação de AIB e melatonina

Elaborado nas normas do Journal of Plant Growth Regulation

1 **Trigonelina e cafeína em estacas de café arábica durante a formação de raízes adventícias**
2 **após aplicação de AIB e melatonina**

3

4 Francisco Hélio Alves de Andrade^{1*}, Ana Maria Oliveira Ferreira¹, Lillian Magalhães
5 Azevedo¹, Meline de Oliveira Santos², Gladyston Rodrigues Carvalho², Mário Lucio Vilela
6 de Resende¹, Elisa Monteze Bicalho¹ e Vânia Aparecida Silva²

7

8 **Afiliação**

9 1Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

10 2Empresa de pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Lavras, Minas Gerais, Brasil

11 *Autor correspondente. Helioalvesuepb@gmail.com

12

13 **Acknowledgements:** Este trabalho foi apoiado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de
14 Minas Gerais (EPAMIG). Os autores agradecem o apoio financeiro do Consórcio de Pesquisa
15 Café, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação
16 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001), Conselho
17 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional de Ciência
18 e Tecnologia do Café (INCT-Café)

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **Resumo**

2 A cafeína e trigonelina são encontrados em cafeeiro arábica, e apresentam funções antioxidante
3 e proteção contra patógenos, no entanto, não há relatos sobre da trigonelina e cafeína no
4 enraizamento em cafeeiro. Objetivou-se avaliar a cafeína e trigonelina, fenóis totais, H₂O₂,
5 atividade enzimática em correlação com o enraizamento de estacas de cafeeiro arábica sob
6 aplicação de ácido indol-3-butírico (AIB) e melatonina nas fases do enraizamento. Utilizou-se
7 quatro tratamentos (Controle, melatonina 21 µM (M21), melatonina 43 µM (M43) e AIB 7380
8 µM (AIB)) e quatro repetições. Foram analisados parâmetros de crescimento e bioquímicos do
9 sistema antioxidante nas diferentes fases do enraizamento, indução, iniciação e expressão. Foi
10 constatado que os tratamentos M43 e AIB promoveram maior PEE e trigonelina no tempo 0
11 DAP e na iniciação, H₂O₂ na fase de iniciação e fenóis totais na fase de indução apresentaram
12 correlação com a PEE. A M43 melhorou conteúdo de cafeína no tempo 0 e na iniciação. A
13 formação de raízes adventícias foi induzida pelo AIB e M43 e correlacionou com a trigonelina,
14 cafeína. O H₂O₂, fenóis e atividade enzimática revelaram diferentes perfis, em função das fases,
15 evidenciando a complexidade de processos que podem estar envolvidos no balanço redox
16 durante o desenvolvimento das raízes adventícias.

17

18 Palavras-chave: *Coffea arábica*. Alcaloide. Formação de raiz. Ácido indol-3-butírico. N-acetil-
19 5-metoxitriptamina.

20

21 **Introdução**

22 O *Coffea arabica* L. é uma espécie comercialmente importante no cenário brasileiro e
23 mundial, pelo seu elevado consumo. E para garantir elevadas produções combinadas com
24 qualidade de bebida, a produção de mudas é sumo importância para formação de plantios de
25 cafeeiro arábica. Onde, a propagação vegetativa possibilita a formação de pomares com
26 cafeeiros com elevada produção combinada a qualidade de bebida, uma vez que, ocorre a
27 clonagem de planta que apresentem elevada produção e qualidade de bebida.

28 Mas o grande impasse para formação de mudas pelo método de estaquia é a capacidade
29 de enraizamento do cafeeiro arábica, pois ainda não se chegou a um método consistente e
30 apurado. Os alcaloides como a trigonelina e cafeína são importantes na qualidade de bebida de
31 café arábica (Zheng; Ashihara, 2004). Há ampla variação entre cultivares quanto à capacidade
32 de enraizamento de cafeeiro arábica, além da variação genética quanto à concentração de
33 metabólitos secundários (Chen. 2019). O efeito dos metabólitos secundários já foi comprovado

1 como moléculas antioxidante e proteção das auxinas contra a descarboxilação (Klerk et al.
2 2011), no caso dos compostos fenólicos e, portanto, podem estar associados ao enraizamento
3 adventício. Contudo não há informações sobre o papel da cafeína e trigonelina no
4 desenvolvimento de raízes adventícias em cafeeiro arábica.

5 A Cafeína (1,3,7 N- metilxantina) e trigonelina (ácido 1 N- metilnicotínico) são
6 metabólitos secundários decorrentes de nucleotídeos de purina e piridina, respectivamente
7 (Zheng; Ashihara, 2004). As concentrações são variáveis em função do tipo e idade do órgão
8 da planta. A trigonelina se encontra em todos os órgãos de cafeeiro arábica, mas altas
9 concentrações são encontradas em caules jovens, já o conteúdo de cafeína é maior em
10 cotilédones e folhas e baixa concentração em caule em mudas de seis meses de idade e baixas
11 concentrações nas raízes (Zheng; Ashihara, 2004).

12 A maioria dos trabalhos associam esses compostos a variações na qualidade de bebida
13 dos grãos por suas propriedades antioxidantes (Caprioli et al. 2014; Heo et al. 2020; Torres.
14 2014). Há relatos também sobre a função da cafeína e trigonelina como defesa antioxidante de
15 plantas sob estresses, contra agentes patógenos e herbívora (Farah; Donangelo, 2006; Ashihara
16 et al. 2017; Sugiyama et al. 2016; Ashihara; Watanabe, 2014; Pinheiro et al. 2021; Zamani;
17 Amiri; Ismaili, 2020). Em especial a trigonelina, pode ser considerado um composto de reserva
18 para biossíntese de nicotinamida adenosina dinucleotídeo (NAD) durante a embebição e
19 germinação de sementes de cafeeiro arábica (Shimizu; Mazzafera; 2000) e desintoxicação do
20 ácido nicotínico que em altas concentrações tornam tóxicos para as plantas (Barz, 1985).

21 As estacas de cafeeiro arábica contempla três fases do enraizamento, sendo eles,
22 indução, iniciação e expressão do primórdio radicular. A fase de indução, envolve eventos
23 bioquímicos que precedem mudanças morfológicas visíveis, enquanto que a iniciação,
24 compreende o início dos primórdios e meristemas, e a expressão é entendida pelo crescimento
25 intra-caulinar do primórdio radicular e emergência da raiz (Guan et al. 2015; Zhang et al. 2017;
26 Husen et al. 2017).

27 A multiplicação por estacas de cafeeiro, requer aplicação em sua maioria de reguladores
28 de crescimento. O mais utilizado é o AIB em estacas de cafeeiro arábica e mais recentemente a
29 melatonina em estacas lenhosas de romão também tem sido proposta como alternativa
30 (Vallejos-Torres et al. 2020; Sarrou et al. 2014).

31 A presente pesquisa levanta a hipótese de que cafeína e trigonelina estão envolvidas no
32 enraizamento de cafeeiro arábica. Com isso, objetivou-se avaliar a correlação entre as
33 concentrações de trigonelina e cafeína na base de estacas tratadas com AIB e melatonina e a
34 formação de raízes adventícias em estacas de cafeeiro arábica. Além disso, estudar a correlação

1 entre esses metabólitos e H₂O₂, fenóis e enzimas antioxidantes em diferentes fases do
2 desenvolvimento das raízes adventícias

3

4 **Material e Métodos**

5 *Local do experimento*

6 O experimento foi conduzido de janeiro a março de 2020 no setor de Fisiologia Vegetal,
7 Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil
8 (21°13'40''S e 44°57'50'' O, altitude 960 m), com classificação climática do tipo Cwa (Köppen
9 e Geiger). A casa de vegetação foi regulada com irrigação a cada 5 minutos com duração de 30
10 segundos das 6:00 até 21:00 horas com intuito de manter a umidade acima de 85% e a
11 temperatura variou de 18 a 28 °C.

12

13 *Material utilizado*

14 Utilizou-se mudas da cultivar Catuai IAC-144 com idade de aproximadamente ano e
15 oito meses. As mesmas foram podadas o ápice caulinar e envergadas para forçar a brotação de
16 novos ramos ortotrópicos. As estacas apresentaram aproximadamente 5 cm de comprimento,
17 sendo realizado corte em bisel da base e realizado o corte na metade das folhas. As estacas
18 foram tratadas com hipoclorito de sódio a 0,05% por 10 min e lavada com água (Rezende et al.
19 2017). Cada estaca possuía apenas um par de folhas. Utilizou-se dois tipos de tubetes,
20 transparentes com volume de 70 cm³ e pretos com 120 cm³. Os tubetes transparentes foram
21 acondicionados no interior do tubetes preto com argola de isopor, ambos tubetes estavam
22 acoplados em bandeja com inclinação de 13,5°. Esse sistema foi criado para auxiliar no
23 enraizamento cumulativo e crescimento da raiz periodicamente. Utilizou-se substrato comercial
24 BASAPLANT[®] (Hortaliças) e areia, em proporção de 6/4, respectivamente.

25

26 *Delineamento e tratamento*

27 Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e quatro
28 níveis de tratamentos (Controle, melatonina a 21 µM (M21), melatonina a 43 µM (M43) e ácido
29 indol-3-butírico a 7380 µM (AIB) e cada parcela foram compostas por 10 unidades
30 experimentais para as variáveis fitotécnicas. No entanto, para as variáveis bioquímicas utilizou-
31 se esquema de parcelas subdividida, a qual os níveis da parcela foram compostos por Controle,
32 M5, M43 e AIB e as subparcelas os tempos de coleta das estacas dos dias após o plantio (0, 7,
33 28, 47 e 69 DAP) e utilizou-se cinco estacas por parcelas experimentais. Os tratamentos foram

1 aplicados no tempo zero e mergulhadas em melatonina nas concentrações desejadas e AIB com
2 duração de 3 minutos.

3

4 *Variáveis fitotécnicas*

5 Para a porcentagem de estacas enraizadas (PEE) foi utilizada os números de estacas
6 enraizadas (NEE) e número de estacas totais (NET) conforme a equação $NEE/NET*100$. O
7 comprimento raiz foi mensurado com auxílio de uma régua graduada (cm). Já a taxa de
8 crescimento relativo (TCR) foi quantificado conforme Floss (2004) pela seguinte equação:

$$9 \quad TCR = \frac{nlM2 - nlM1}{T2 - T1}$$

10 M1 = Comprimento da primeira coleta;

11 M2 = Comprimento da última coleta;

12 T1 = DAP da primeira coleta;

13 T2 = DAP da segunda coleta;

14 nl = logaritmo natural.

15 A peso da matéria seca da raiz (PMSR) e parte área (PMSPA) foram mensuradas a partir
16 da massa fresca, a qual permaneceu 72 horas em estufa de circulação forçada de ar em 65°C,
17 em seguida a massa seca foi pesada em balança digital. E a relação raiz parte área (R/PA) foi
18 obtida pela divisão da PMSR pela PMSPA.

19

20 *T50 e área de acúmulo de enraizamento (A)*

21 Para quantificar o T50 utilizou-se equação sigmoide ($\hat{y} = \alpha / (1 + e^{-((x-x_0)/b)})$) de três termos
22 conforme descrito por Romano et al. (2019). O x_0 (T50) representa o ponto em que a curva atinge
23 50% do potencial máximo de estacas enraizadas. A partir da mesma equação se calcula o A,
24 sendo a área subjacente à curva sigmoide de 0 a 76 dias, como uma integral definida da função
25 e representando o total estacas enraizadas em porcentagem.

26

27 *Variáveis bioquímicas*

28 Os caules frescos foram descascados da base até dois cm, cortados em segmentos
29 menores, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas em -80 até a realização
30 das análises.

31

1 *Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)*

2 Adotou-se o método descrito por Velikova; Yordanov e Edreva (2000). Para extração, amostras
3 de 100 mg de caule fresco foram maceradas em nitrogênio líquido com 50% de
4 Polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizadas com 1500 µL de ácido tricloroacético (TCA
5 - 0,1%). As amostras foram centrifugadas a 13000 g por 10 min a 4°C e 45 µL do sobrenadante
6 foi utilizado para a reação com 45 µL de tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0) e 90 µL
7 de iodeto de potássio (1 M). A leitura da absorbância foi realizada em 390 nm em duplicata e
8 os níveis de H₂O₂ quantificados por meio de curva padrão com a solução estoque de H₂O₂ a
9 250 µM.

10

11 *Quantificação dos fenóis totais*

12 Amostras de 100 mg de caule fresco foram maceradas em nitrogênio líquido com 50%
13 de PVPP e homogeneizadas com 500 µL de tampão de extração (metanol - 99%; HCl - 1%) em
14 tubos de *ependorf* de 2 mL. Posteriormente, o extrato foi colocado em gelo e agitado por 4
15 horas no escuro (Zarrouk et al. 2012) e centrifugado a 13.000 g por 30 min a 4°C, e o
16 sobrenadante coletado e adicionado 250 µL de solução tampão ao material decantado, a qual
17 foi centrifugado novamente a 13.000 g por 30 min a 4°C e retirado o segundo sobrenadante. O
18 segundo sobrenadante (2 µL) foi utilizado para a reação com 2 µL de folin puro, 9 µL de
19 carbonato de sódio anidro (220 mg mL⁻¹) e 307 µL de água deionizada. A reação passou 30
20 minutos incubada a banho-maria a 40°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 765 nm
21 e os níveis de ácido gálio (AG) quantificados por meio de uma curva padrão com solução
22 estoque de AG a 1 mg mL⁻¹.

23

24 *Extração e quantificação de enzimas*

25 Para as extrações enzimáticas (dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT),
26 peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), amostras de 100
27 mg de caule fresco foram maceradas em nitrogênio líquido com 50% de de PVPP e
28 homogeneizadas com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (400 mM; pH 7,8) contendo 10
29 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 200 mM de ácido ascórbico (Biemelt et al.
30 1998). O extrato foi centrifugado a 13000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado
31 para quantificação da atividade das enzimas. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de
32 Bradford (Bradford, 1976). Todas as enzimas foram realizadas em triplicatas.

33

34 *Atividade da SOD*

1 A atividade da SOD foi quantificada de acordo com a metodologia descrita por
2 Giannopolitis; Ries (1977), a qual consiste na capacidade de inibir a fotorredução do azul de
3 nitrotetrazólio (NBT). Alíquota da amostra foi adicionada ao meio de incubação contendo 100
4 μL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,8), 40 μL de L-metionina (70 mM), 3 μL de
5 EDTA (10 mM), 15 μL de NBT (10 mM), 2 μL de riboflavina (0,2 mM) e 30 μL de água
6 deionizada.

7 A reação foi conduzida em luz fluorescente (20 W) por sete minutos, enquanto o branco
8 foi constituído de água deionizada mais o meio de incubação. A formação do azul de formazan,
9 derivado da redução do NBT, foi realizada através da leitura no espectrofotômetro a 560 nm.
10 Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50%
11 a redução do NBT.

12

13 *Atividade da CAT*

14 A atividade da CAT foi quantificada conforme Havir; Mchale (1987). Alíquotas do
15 extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação, contendo 90 μL de tampão fosfato de
16 potássio (200 mM; pH 7,0) e 72 μL de água deionizada e incubadas a 30°C em banho-maria.
17 No momento da leitura foi adicionado 9 μL de H_2O_2 (250 mM). Em seguida, atividade da CAT
18 foi mensurada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, durante 3
19 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio.

20

21 *Atividade da APX*

22 A atividade da APX foi aferida em meio composto do extrato enzimático, 90 μL de
23 tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 6,0), 9 μL de ácido ascórbico (10 mM) e 63 μL de
24 água deionizada. Incubada a 30 °C em banho-maria, e no momento da leitura adicionou 9 μL
25 de H_2O_2 (2 mM) (Koshiba, 1993). A oxidação do ascorbato foi realizada na leitura no
26 espectrofotômetro a 290 nm, cada 15 s por 30 min (Nakano; Asada, 1981). O coeficiente de
27 extinção molar usado foi de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

28

29 *Atividade da POD*

30 A atividade da POD foi determinada conforme a metodologia de Neves (2003).
31 Alíquotas do extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação composto de 180 μL do
32 tampão fosfato de sódio (100 mM; pH 6,0), 60 μL de guaiacol (0,8%), 60 μL de H_2O_2 (0,9%)
33 e 50 μL de água deionizada. O tampão fosfato de sódio foi incubado a banho-maria a 30 °C. A
34 leitura foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm, a cada 15 segundos com duração de 2

1 minutos, e a atividade foi compreendida pelo aumento da absorvância. O coeficiente de
2 extinção molar foi de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3

4 *Atividade da PPO*

5 A atividade da PPO foi determinada conforme a metodologia adaptada de Kar; Mishra
6 (1976). Alíquotas do extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação composto de 200 μL
7 do tampão fosfato de sódio (70 mM; pH 7,0), 40 μL de catecol (100 mM). O meio de reação
8 foi incubado a banho-maria a 30 °C por 5 min antes de adicionar o extrato. A leitura foi realizada
9 em espectrofotômetro a 410 nm, a cada 13 segundos com duração de 1,3 minutos, e a atividade
10 foi compreendida pelo aumento da absorvância. O coeficiente de extinção molar foi de $1,235$
11 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

12

13 *Compostos bioativos*

14 A cafeína e trigonelina foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência
15 (CLAE), segundo metodologia de Malta; Chagas (2009). O extrato foi realizado com 300 mg
16 de caule fresco macerado em nitrogênio com 50% de PVPP, e colocadas em 10 mL água
17 destilada, posteriormente incubadas a banho-maria por 3 min. O extrato foi filtrado em papel
18 de filtro comum e membrana de 0,45 μm . A quantificação foi realizada em cromatógrafo da
19 marca Shimadzu[®], com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD-M43A),
20 coluna cromatográfica Discovery C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e comprimento de onda de 272
21 nm. A fase móvel constituiu-se de metanol:água:ácido acético (20:80:1), com fluxo de 1 mL
22 min^{-1} .

23

24 *Análise estatística*

25 Os dados foram trabalhados na plataforma R versão 4.0.5 para realizar as análises
26 estatística. Foi realizado teste de normalidade e homogeneidade Shapiro-willk, Bartlete o teste
27 F ($p < 0,05$) e o teste Duncan a 5% de probabilidade, para fazer a comparação de médias, com
28 auxílio do pacote estatístico ExpDes.pt (Ferreira et al. 2021). Também foi realizado análise de
29 componentes principal (PC) com a função prcomp do software R e o pacote factoextra
30 (Kassambara; Mundt, 2020). Utilizou-se software SigmaPlot[®] versão 12.3 para ajustar o
31 modelo sigmoide e exponencial.

32

33 **Resultados**

34 *Morfologia e enraizamento em função de melatonina e AIB exógena*

1 A PEE cumulativa se ajustou-se a função sigmoide com R^2 de 0,99 (Tabela 1). O
 2 resultado da fig. 1a, mostraram que aplicação exógena de AIB antecipou o processo de
 3 enraizamento. Visto que aos 47 DAP, as estacas que foram submetidas a AIB apresentaram
 4 maior PEE de 82% enquanto que, M5, M43 e controle não passaram de 58%. No entanto, a
 5 estabilização dos tratamentos AIB, M43 e Controle ocorreu aos 59 DAP com valores de 94, 94
 6 e 87%, respectivamente. A TCR se ajustou a função exponencial com R^2 de 0,99 para todos os
 7 tratamentos. Foi notório que o AIB estimulou maior TCR em comparação aos demais
 8 tratamentos (Fig 1b). Todas equações sofreram efeito significativo a 1%.

9

Tabela 1. Equações referente a fig. 1 (a) e (b)

Porcentagem de estacas enraizadas			
Tratamento	Equação		p-valor
Controle	$\hat{y} = -0,54 + 87,73/(1+\exp(-(x-50,56)/ 2,09))^{0,21}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M5	$\hat{y} = -1,81+95,59/(1+\exp(-(x-53,07)/ 4,04))^{0,31}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M43	$\hat{y} = -4,05+98,60/(1+\exp(-(x-55,95)/ 1,55))^{0,09}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
AIB	$\hat{y} = -2,98+98,09/(1+\exp(-(x-44,52)/ 4,42))^{0,37}$	$R^2 = 0,99$	0,0001
Taxa de crescimento relativo			
Tratamento	Equação		p-valor
Controle	$\hat{y} = -94,17+96,14(1-\exp(-0,0976x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M5	$\hat{y} = -33,25+35,45(1-\exp(-0,0697x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001
M43	$\hat{y} = -14,37+16,70(1-\exp(-0,0494x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001
AIB	$\hat{y} = -265,74+267,75(1-\exp(-0,1227x))$	$R^2 = 0,99$	0,0001

10

11

12 Os dados mostraram que aplicação de melatonina e AIB promoveram efeito
 13 significativo pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. A melatonina M43 e AIB incrementaram
 14 11 e 8,6% em relação a testemunha na PEE, respectivamente (Fig 2a).

15 Já o CR, PMSR e A foram influenciadas positivamente pela aplicação de AIB, a qual
 16 foi notório aumento de 1,4 cm; 0,84 g e 81% em relação a testemunha, respectivamente (Fig 2
 17 b. d. e). O AIB na concentração de 1500 ppm, apresentou menor T50 (Fig 2 c). A melatonina
 18 M43 está envolvida também na formação da parte aérea. Onde a PMSPA foi influenciada
 19 positivamente pela aplicação de M43, com aumento de 1,52 g em relação ao controle,
 20 respectivamente (Fig 2 f). A relação da massa seca da raiz e parte aérea (R/PA) foi maior quando
 21 se aplicou o AIB, enquanto que, o menor valor foi constatado na aplicação de M43 (Fig 2 g),
 22 em virtude da maior PMSPA provocado pelo tratamento (Fig 2f).

1

2 *Mudanças na atividade enzimática, conteúdo de H₂O₂ e fenóis durante as fases do*
3 *enraizamento*

4 Durante as fases de enraizamento foi observado mudanças significativas nas atividades
5 enzimática, conteúdos de H₂O₂, fenóis totais e alcaloides pelo teste Duncan a 5% de
6 probabilidade (Fig 3 e 4). A aplicação de AIB, M5 e M43 promoveu redução no conteúdo de
7 H₂O₂ aos 7 DAP de 26, 15 e 16% em comparação com o controle, respectivamente (Fig 3a).

8 Já na fase de iniciação aos 28 DAP os dados mostraram que aplicação de AIB, M5 e
9 M43 estimularam incremento no conteúdo de H₂O₂ de 31, 20 e 58% em comparação ao
10 controle, respectivamente. A atividade da CAT foi influenciada positivamente pela aplicação
11 de melatonina e AIB nas diferentes fases do enraizamento (Fig 3b). Aplicação exógena de
12 melatonina M5 apresentou valores de 64, 65 e 46%, superior ao controle a 0 DAP, na indução
13 e iniciação, respectivamente. Enquanto que a M43 ocasionou aumento na atividade da CAT de
14 58, 87 e 133% comparado com controle na indução, expressão aos 47 e 69 DAP,
15 respectivamente. Já o AIB promoveu maior atividade da CAT em relação ao controle a 0, 7 e
16 69 DAP de 27, 27 e 197%, respectivamente.

17 Aplicação de AIB influenciou positivamente a atividade da APX, a qual revelou valores
18 de 16, 11, 37 e 23 de $\mu\text{mol ácido ascórbico min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína superior ao controle, aos 7,
19 28, 47 e 69 DAP, respectivamente (Fig 3c). No entanto, aplicação de M43 em estacas da cultivar
20 Catuai IAC-144, promoveu atividade da APX superior ao controle na fase de expressão aos 47
21 e 69 DAP.

22 Os tratamentos AIB e M43 promoveram efeito significativo na atividade da POD aos
23 47 e 69 DAP (Fig 3 d). Foi observado incremento do AIB e M43 de 50 e 23% aos 47 DAP, 52
24 e 34% aos 69 DAP comparado ao controle, respectivamente. O resultado da atividade da SOD
25 sofreu efeito significativo pelo teste Duncan a 5% de probabilidade (Fig 3e). As maiores
26 atividades da SOD foram relatadas no tratamento AIB na fase de expressão da raiz aos 47 e 69
27 DAP.

28 Os compostos fenólicos, alcaloides e atividade da PPO foram influenciadas pela
29 aplicação de melatonina e AIB nas diferentes fases do enraizamento (Fig 4).

30 A melatonina M43 estimulou incremento no conteúdo de cafeína a 0 DAP e na iniciação
31 da raiz aos 28 DAP de 197 e 19% em relação ao tratamento controle, respectivamente (Fig 4a).
32 O AIB e M43 influenciou positivamente o conteúdo de trigonelina a 0 DAP e na iniciação da
33 raiz aos 28 DAP. O AIB promoveu incremento de trigonelina de 53 e 32% a 0 e 28 DAP, em
34 relação ao controle, enquanto que a M43 estimulou valores superiores ao controle de 61 e 42%

1 a 0 e 28 DAP, respectivamente (Fig 4b). Já o M5 proporcionou pico da trigonelina aos 7 DAP
2 na fase de indução.

3 O resulta da fig. 4c, revelou que aos tratamentos AIB, M5 e M43 promoveram maior
4 conteúdo de fenóis totais na fase de indução do enraizamento. Onde foi observado valores
5 superiores ao controle, e os valores corresponderam a 6,7; 5,77; 6,32 e 4,81 mg g⁻¹ de MF em
6 AIB, M5, M43 e controle, respectivamente. Já atividade da PPO foi influenciada pelo AIB e
7 M43 na fase de expressão da raiz (Fig. 4d). Aplicação de AIB promoveu maiores valores aos
8 47 e 69 DAP e M43 aos 47 DAP, quando comparado com tratamento controle.

9

10 *Análise de componentes Principais*

11 Na fig. 5, estão representadas as análises dos componentes principal (PCA) aos 0, 7, 28,
12 47 e 69 DAP. Utilizou-se a PEE, CR, A, T50, TCR, CAT, SOD, APX, POD, PPO, Fenóis totais,
13 cafeína, trigonelina, H₂O₂, PMSPA, PMSR e R/PA sob aplicação de melatonina M5, M43, AIB
14 e Controle aos 0, 7, 28, 47 e 69 DAP.

15 A PCA a 0 DAP revelou que o PC1 deteve 48,8% e o PC2 28,6% da variância
16 acumulada, a qual os dois PCs somam 77,4%. Observa-se que houve uma separação dos
17 tratamentos pela PC1, onde o tratamento AIB está mais relacionada com as variáveis CR, RPA,
18 A, PMSR, TCR. Enquanto que, a M43 esteve mais relacionada com trigonelina, PEE, cafeína,
19 PMSPA. A trigonelina apresentou correlação positiva com PEE no tratamento M43.

20 Na fase de indução aos 7 DAP, foi observado que houve uma separação dos tratamentos
21 pela PC 1. As variáveis APX, CR, A, PMSR, RPA e TCR foram associadas ao tratamento AIB,
22 enquanto que o tratamento M43 estimulou maiores escores de PPO, CAT e PMSR. As setas na
23 mesma direção indicaram correlação positiva entre PPO, CAT e PMSPA, Além Fenóis totais e
24 PEE que foram associadas aos tratamentos M43 e AIB (Fig 5).

25 Já na fase de iniciação aos 28 DAP, existe correlação positiva entre PEE, H₂O₂ e
26 Trigonelina, além da cafeína com PMSPA quando se aplicou M43. Quando se observou a CP
27 2, foi notório que a Trigonelina, PEE e H₂O₂ estão associadas aos tratamentos AIB e M43 (Fig
28 5).

29 Na fase de expressão aos 47 DAP, a CP1 revelou dois grupos de variáveis associadas
30 ao tratamento AIB, que foram, a TCR, RPA, PMSR, CR e A, além da PPO, POD, SOD e APX.
31 Enquanto que, a CAT e PMSPA foram agrupadas ao tratamento M43 (Fig 5).

32 Aos 69 DAP notou-se que a maioria das variáveis foram associadas ao tratamento AIB
33 pela CP1, tais como, Trigonelina, TCR, RPA, PMSR, A, CR, PPO, H₂O₂, SOD, APX, POD e
34 CAT. Enquanto a PMSR esteve associada ao tratamento M43.

1 *Efeito de melatonina e AIB na dinâmica de substâncias endógenas e atividade enzimática nas*
2 *fases do enraizamento e morfologia*

3 Para analisar a dinâmica de substâncias endógenas nas fases do enraizamento, avaliou-se
4 se cinco pontos, a qual foi compreendido pelo tempo zero a 0 DAP, indução aos 7 DAP,
5 iniciação aos 28 DAP e expressão aos 47 até 69 DAP (Fig. 6). Quando as estacas da cultivar
6 Catuaí 144 foram submetidas a AIB, foi notório maior PMSR, CR, PEE e menor T50 (Fig 6 a).
7 Enquanto que o tratamento com melatonina M43 promoveu maior PEE e PMSPA (Fig 6 b).

8 Aplicação de AIB estimulou picos dos fenóis totais na indução e H₂O₂ na iniciação,
9 além da trigonelina no tempo zero e iniciação. Atividade da APX foi observado na indução,
10 iniciação e expressão da raiz. A PPO, SOD, POD foram estimuladas na expressão aos 47 e 69
11 DAP, enquanto que a CAT mostrou maior atividade aos 69 DAP (Fig 6a).

12 Os resultados do tratamento com melatonina M43 estimularam picos da cafeína e
13 trigonelina logo no tempo zero e na iniciação aos 28 DAP. Os fenóis totais apresentaram pico
14 na fase de indução, enquanto que H₂O₂ na iniciação. A atividade da CAT foi relatada na fase
15 da iniciação e expressão. A APX, PPO e POD apresentaram maiores atividades na fase de
16 expressão da raiz (Fig 6b).

17

18 **Discussão**

19 A aplicação de M43 e AIB promoveram maior PEE acima de 90%. Os resultados de
20 enraizamento são considerados eficaz, pois conforme Vallejos-Torres et al. (2020), uma
21 conversão acima de 85% possibilita a produção em larga escala de mudas de cafeeiro arábica.

22 A formação de raízes adventícias é um processo que envolve mudanças morfológicas,
23 fisiológicas e bioquímicas, a qual divide-se nas seguintes fases indução, iniciação e expressão
24 (Zhang et al. 2017). Nas diferentes fases do enraizamento, as concentrações de trigonelina e
25 cafeína foram variáveis importantes na discriminação dos tratamentos que receberam a
26 aplicação de reguladores AIB e M43 daqueles que não receberam, ou seja, dos controles,
27 indicando que esses alcalóides podem estar envolvidos no metabolismo que resultou em maior
28 PEE verificados nesses tratamentos. Entretanto, houve diferentes padrões de correlação entre
29 trigonelina e cafeína com aspectos morfológicos, fenóis totais e também com peróxido de
30 hidrogênio e as enzimas antioxidantes.

31 As maiores concentrações de trigonelina e cafeína verificadas no tempo 0 DAP foram
32 correlacionadas positivamente com maior PEE final. Uma vez que essa quantificação foi
33 realizada em amostras coletadas logo após a aplicação dos reguladores AIB e melatonina,
34 verifica-se que esses reguladores podem ter efeitos relativamente rápidos sobre o metabolismo

1 secundário associado ao desenvolvimento de raízes adventícias. A trigonelina e cafeína, podem
2 aumentar a resistência ao estresse e agir também contra agentes patogênicos na área do corte
3 na base das estacas, contribuindo para a sobrevivência das estacas. De acordo Ashihara et al.
4 (2017), os alcaloides como cafeína e trigonelina promovem defesa química contra patógenos e
5 herbívoros. Além disso, esses alcaloides também são considerados moléculas antioxidantes
6 (Farah; Donangelo, 2006). Ressalta-se que o pico de trigonelina ocorre mais rapidamente
7 quando se aplica AIB e M43 e o da cafeína quando se aplica M43. De fato, a biossíntese de
8 alcaloides observadas *in vitro* em *Leucojum aestivum* é estimulada por melatonina e auxina e a
9 qualidade do perfil metabólico dos alcaloides pode variar conforme o tipo de estimulante (Ptak
10 et al. 2013; Patak et al. 2019).

11 Constata-se que ocorreu um aumento nas concentrações de trigonelina e cafeína também
12 nos tratamentos controle e M5, porém somente aos 7 dias da fase de indução. Houve um atraso
13 nos picos de alcaloides, que não foram correlacionados com maior PEE e características
14 morfológicas das raízes. Isso indica que picos de trigonelina e cafeína estão envolvidos na fase
15 de indução do desenvolvimento de raízes adventícias nas plantas controle, porém a aplicação
16 de AIB e M43 acelerou esses picos e influenciou positivamente na fase de inicial da indução.
17 De acordo com (Wink; Witte, 1985), os alcaloides são metabolizados e seu nitrogênio é
18 utilizado. Portanto a trigonelina e cafeína podem ter sido rapidamente induzidos após
19 aplicação, e ao longo da fase de indução mobilizados como reservas energéticas, o que justifica
20 os menores valores de trigonelina e cafeína aos 7 dias nos tratamentos AIB e M43.

21 Na fase de iniciação, aos 28 DAP, as maiores concentrações de trigonelina e cafeína
22 também contribuíram para discriminação dos tratamentos AIB e M43 em relação ao controle e
23 M5, correlacionadas positivamente com maior PEE e demais variáveis morfológicas da raiz e
24 PMSPA. Nessa fase, em que ocorre o início dos primórdios e meristemas há intensa divisão
25 celular e, portanto, a trigonelina e a cafeína (ácido 1 N- metilnicotínico) podem afetar o ciclo
26 celular. Esses alcalóides são metabólitos secundários cujos precursores são os nucleotídeos de
27 purina e piridina. As purinas são componentes-chave do sistema energético celular (p. ex.,
28 ATP, NAD), dos sinalizadores (p. ex., GTP, cAMP, cGMP), e, juntamente com as
29 pirimidinas, participam da produção do RNA e DNA (Ashihara, 2006).

30 Já na fase de expressão, verifica-se que aplicação de M43 e AIB, não influenciaram o
31 conteúdo de trigonelina, quando o processo de enraizamento já tinha ocorrido por completo.
32 Contudo, maiores concentrações de trigonelina e cafeína, contribuíram para formação da
33 componente na discriminação do controle em relação ao AIB e M43. Na final da expressão,
34 somente a trigonelina, pois a cafeína estava em baixas concentrações.

1 O presente trabalho destaca também a correlação positiva entre trigonelina e cafeína
2 com H₂O₂ em todas as fases de desenvolvimento das raízes adventícias. Corroborando com
3 esses resultados, Chen et al. (2018), constataram que a melatonina promoveu formação de raiz
4 lateral desencadeada pelo aumento do H₂O₂, e que este atuou na sinalização induzindo a
5 expressão de genes regulatórios do ciclo celular responsáveis pela formação de raiz adventícias
6 em *Medicago sativa*. Evidências genéticas mostraram que dois genes responsáveis pela
7 formação de raízes laterais e envolvimento no ciclo celular (AtCDKB1; 1 e AtCDKB2) foram
8 regulados positivamente pelo H₂O₂, no entanto, quando se usou inibidor da NADPH oxidase
9 (Difenilenoiodônio – DPI) e/ou eliminador de H₂O₂ (Dimetiltiourea – DMTU) a expressão
10 ambos genes e formação de raiz laterais foram prejudicadas (Chen et al. (2018).

11 Li, et al. (2017) também demonstrou que o H₂O₂ atua como um promotor durante a
12 formação de raízes adventícias em estacas de *Vigna radiata*, através da regulação da expressão
13 genes envolvidos em muitos processos celulares associadas às resposta ao estresse, homeostase
14 celular redox e resposta ao estresse oxidativo, metabolismo secundário, afrouxamento e
15 modificação da parede celular, nutrientes e processos metabólicos de energia, celulares
16 movimento de componentes, transcrição, síntese de DNA, ciclo celular e fatores de transcrição
17 (TFs), bem como vias de sinalização de hormônios vegetais.

18 De maneira geral, observa-se variações das correlações entre os alcaloides trigonelina e
19 cafeína com as enzimas antioxidantes de acordo com a fase de desenvolvimento das raízes.
20 Logo após aplicação dos tratamentos, observa-se o pico dos alcaloides após aplicação de AIB
21 e M43, o que não se verifica nas enzimas. Consequentemente, há uma correlação negativa
22 observada aos 0 DAP entre trigonelina e cafeína e as enzimas SOD, POD, PPO e CAT. Ao que
23 isso indica parece haver uma resposta mais rápida dos alcaloides do que as enzimas
24 antioxidantes a aplicação de AIB e M43. Essa correlação negativa discriminando AIB e M43
25 dos demais tratamentos também é observada na iniciação 28 DAP e no início da expressão, 47
26 DAP. É possível que a atuação antioxidante desses alcaloides, haja uma menor atividade das
27 enzimas antioxidantes nessas fases. Os alcaloides possuem atividade antioxidante e eliminação
28 de radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio e elétrons os quais atuam como agente
29 redutores e quelantes de íons metálicos oxidantes (Chen, 2019).

30 Contudo, ressalta-se também correlação positiva ao final da expressão, aos 68 DAP,
31 discriminando o AIB dos demais tratamentos, indicando atuação conjunta desses antioxidantes
32 já ao final da fase de expressão está correlacionada com maior PEE e maior desenvolvimento
33 radicular. De maneira geral, constatamos que o aumento na atividade das enzimas
34 antioxidantes, principalmente a partir da iniciação induzido por ABA e M43 também está

1 associado ao melhor desenvolvimento radicular. O sistema de defesa antioxidante pode
2 modular o processo de formação de raízes adventícias controlando o estado redox celular. Essa
3 afirmação, segue o proposto por Vilasboa et al. (2021) que mostrou que a maior capacidade
4 para enraizar da espécie de *Eucalyptus grandis* está associada a maiores atividades de enzimas
5 antioxidantes e também maior conteúdo de flavonoides. Essas características podem influenciar
6 a sinalização baseada em ROS e a homeostase de fitohormônios nas estacas, impactando assim
7 no desenvolvimento de raízes adventícias.

8 O presente trabalho evidenciou também que os compostos fenólicos na fase de indução
9 auxiliam a formação de raiz sob aplicação de melatonina M43 e AIB. Uma vez que o M43 e
10 AIB promoveram incremento de 32 e 39%, respectivamente em comparação ao tratamento
11 controle na fase de indução aos 7 DAP. E a ligação dos compostos fenólicos com enraizamento
12 já foi relatado em pesquisa anterior, a qual os di e polifenóis atuaram na defesa antioxidante e
13 proteção das auxinas contra a descarboxilação (Klerk et al. 2011). Em cafeeiro arábica, a ação
14 dos compostos fenólicos frente ao enraizamento ainda não foi bem estabelecida. Considerando
15 a correlação entre os alcalóides, trigonelina e fenólicos, essa foi em sua maioria negativa nas
16 fases de desenvolvimento radicular, com destaque

17 Os resultados da presente pesquisa, sugeriu que melatonina apresenta potencial na
18 biossíntese de cafeína em estacas de cafeeiro arábica, além do mais, a cafeína foi correlacionada
19 a maior massa seca da parte aérea, indicando que este estimular uma maior realocação de massa
20 seca para parte aérea do que para raiz, evidenciado também pela menor relação de R/PA.
21 Conforme Behling et al. (2018) a relação entre massa seca da folha e massa seca da raiz, reflete
22 uma relação aproximada de fonte e dreno. O que aos 69 DAP o tratamento M43 proporcionou
23 maior área de fonte que pode refletir em maior conteúdo de CO₂ fixado e redistribuído entre a
24 planta inteira. Além do mais, aos 69 DAP a muda não está pronta pra ir a campo, mais estudos
25 necessitam serem realizados para ver a consistência a relação R/PA até o momento em que a
26 muda estará pronta para ser transplantada para campo.

27 Em relação a atividade enzimática na fase de indução, a CAT correlacionou
28 positivamente com a PEE, sugerindo que em estacas de cafeeiro arábica sua atividade pode ser
29 importante sob aplicação de melatonina M43 para formação de raiz adventícia. Já APX foi
30 estimulada pelo tratamento de AIB a partir da fase de indução até a fase de expressão. Até o
31 momento, ainda são poucos os estudos relatando a relação entre as mudanças na atividade CAT
32 e APX e suas funções durante a formação de raízes adventícias (Li et al. 2009). Racchi et al.
33 (2001) encontraram uma forte atividade da isoforma CAT-2 em microestacas enraizadas de
34 oaks, sugerindo que esta isoforma é uma proteína especificamente relacionada ao enraizamento.

1 Mas na presente pesquisa a atividade da CAT e APX correlacionaram negativamente com
2 conteúdo de H₂O₂ na fase de indução, sugerindo ambas enzimas possuem papel importante na
3 eliminação do H₂O₂ nessa fase.

4 Os resultados do presente trabalho, mostraram que a cafeína, trigonelina estão
5 envolvidos nas fases indução e na iniciação da formação de raízes adventícias em estacas de
6 cafeeiro e são induzidos pelo M43 e AIB. Assim propõe-se que esses alcaloides poderiam
7 explicar pelo menos em parte as variações quanto a capacidade de enraizamento entre cultivares
8 de café e a inconsistência no sucesso das técnicas disponíveis. Diante disso, esse estudo abre
9 possibilidade de explorar a correlação desses parâmetros com a capacidade de enraizamento, o
10 que poderá contribuir para o estabelecimento de modelos de previsão antecipada de
11 recalcitrância de enraizamento, contribuindo assim para a seleção e propagação clonal em
12 programas de melhoramento.

13

14 **Conclusões**

15 A formação de raízes adventícias em estacas de café arábica induzidas pela aplicação
16 de AIB e M43 está correlacionado com maiores concentrações de trigonelina e cafeína
17 principalmente logo após a aplicação e na fase da iniciação. Ademais, a correlação entre esses
18 metabólitos e H₂O₂, fenóis e enzimas antioxidantes revelam diferentes perfis, em função das
19 fases, evidenciando a complexidade de processos que podem estar envolvidos no balanço redox
20 durante o desenvolvimento das raízes adventícias em estacas de cafeeiro arábica.

21

22 **Declarações:**

23 **Disponibilidade de dados e materiais:**

24 Os conjuntos de dados gerados durante e/ou analisados durante o presente estudo não estão
25 disponíveis ao público por razões de segurança de dados, mas são disponibilizados pelo autor
26 correspondente mediante solicitação razoável.

27 **Conflito de interesses:**

28 Conflito de interesse em nome de todos os autores, o autor correspondente
29 afirma que não há conflito de interesses.

30

31

32

33

34

1 Referências

- 2 Ashihara H, Watanabe S (2014). Accumulation and function of trigonelline in non-leguminous
3 plants. *Natural Products Communications*, 9(6), 795–798.
4
- 5 Ashihara H. 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, v. 18, n. 1,
6 p.1-8. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100001>.
7
- 8 Ashihara H., Mizuno K., Yokota T., Crozier A. (2017) Xanthine Alkaloids: Occurrence,
9 Biosynthesis, and Function in Plants. Em: Kinghorn A., Falk H., Gibbons S., Kobayashi J. (eds)
10 *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 105. *Progress in the Chemistry of*
11 *Organic Natural Products*, vol 105. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49712-](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49712-9_1)
12 [9_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49712-9_1).
13
- 14 Barz W (1985) Metabolism and degradation of nicotinic acid in plant cell culture, in: KH
15 Neumann, W. Barz, E. Reinhard (Eds.), *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell*
16 *Cultures*, Springer-Verlag, Berlin, 1985, pp 186–195.
17
- 18 Behling M, Felipe RTA, Farias JB, Carvalho G, Neves JCL. 2018. Relações entre parte aérea e
19 raízes em povoamentos de teca1. *Revista Ceres*, 65:463-473. [https://doi.org/10.1590/0034-](https://doi.org/10.1590/0034-737X201865060001)
20 [737X201865060001](https://doi.org/10.1590/0034-737X201865060001).
21
- 22 Biemelt S, Keetman U, Albrecht G (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to
23 activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiology*
24 116: 651–658. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.651>.
25
- 26 Bradford MMA (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
27 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*
28 72:248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
29
- 30 Caprioli G, Cortese M, Maggi F, Minnetti C, Odello L, Sagratini G, Vittori S 2014
31 Quantification of caffeine, trigonelline and nicotinic acid in espresso coffee: the influence of
32 espresso machines and coffee cultivars, *International Journal of Food Sciences e Nutrição*, 65:
33 465-469, <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.873890>.
34

- 1 Chen X. 2019. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications,
2 Critical Reviews In Food Science And Nutrition, 59: 1008–1025.
3 <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546667>.
4
- 5 Chen Z, Gu Q, Yu X, Huang L, Xu S, Wang R, Shen W, Shen W (2018) Hydrogen peroxide
6 acts downstream of melatonin to induce lateral root formation, *Annals of Botany*, 121:1127–
7 1136, <https://doi.org/10.1093/aob/mcx207>.
8
- 9 Farah A, Donangelo CM (2006) Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 2006;
10 18 : 23–36. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>.
11
- 12 Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2021) *ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs*
13 (Portugues). Disponível em <[https://cran.rproject.org/web/packages/ExpDes.pt](https://cran.rproject.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf)
14 /ExpDes.pt.pdf>. Acessado em 27 de agosto de 2021.
15
- 16 Floss, E. L. *Fisiologia das plantas cultivadas* Passo Fundo: Ed. da UPF, 2004.
17
- 18 Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant*
19 *Physiology* 59: 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
20
- 21 Guan L, Murphy AS, Peer WA, Gan L, Li Y (2015) Physiological and molecular regulation of
22 adventitious root formation. *Crit Rev Plant Sci.* 2015; 34: 506–521.
23 <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1090831>.
24
- 25 Havir EA, MChale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple
26 forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology.* 84:450-455.
27 <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>.
28
- 29 Heo J, Adhikari K, Choi KS, Lee J (2020) Analysis of Caffeine, Chlorogenic Acid,
30 Trigonelline, and Volatile Compounds in Cold Brew Coffee Using High-Performance Liquid
31 Chromatography and Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry.
32 *Foods*, v .9, n. 12, p. 1746. <https://doi.org/10.3390/foods9121746>.
33

- 1 Husen A, Iqbal M, Siddiqui SN, Sohrab SS, Masresha G (2017) Effect of Indole-3-Butyric Acid
2 on Clonal Propagation of Mulberry (*Morus alba* L.) Stem Cuttings: Rooting and Associated
3 Biochemical Changes. *Proc. Natl. Acad. Sci., Índia, Seção B Biol. Sci.* 87: 161–166.
4 <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0597-7>.
5
- 6 Kar M, Mishra D (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice
7 Leaf Senescence. *Plant Physiology* 57: 315–319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>.
8
- 9 Kassambara A, Mundt F (2020) Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses
10 (Package: factoextra). Disponível em <[https://cloud.r-](https://cloud.r-project.org/web/packages/factoextra/factoextra.pdf)
11 [project.org/web/packages/factoextra/factoextra.pdf](https://cloud.r-project.org/web/packages/factoextra/factoextra.pdf)> acessado em 09 de agosto de 2021.
12
- 13 Klerk GJ, Guan H, Huisman P, Marinova S (2011) Efeitos de compostos fenólicos na formação
14 de raízes adventícias e descarboxilação oxidativa de ácido indolacético aplicado em *Malus* 'Jork
15 9'. *Plant Growth Regul.* (63) 175–185. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9555-9>.
16
- 17 Koshiha T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*).
18 *Plant Cell Physiol* 34: 713–721. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078474>.
19
- 20 Li S, Xue L, Xu S, Feng H, An L (2009) IBA-induced changes in antioxidant enzymes during
21 adventitious rooting in mung bean seedlings: The role of H₂O₂. *Environmental and*
22 *Experimental Botany* 66: 442–450.
23
- 24 Li SW, Leng Y, Shi RF (2017) Transcriptomic profiling provides molecular insights into
25 hydrogen peroxide-induced adventitious rooting in mung bean seedlings. *BMC Genomics.*
26 18:188. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3576-y>.
27
- 28 Malta MR, Chagas SJR (2009) Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares
29 de cafeeiro produzidas na região Sul de Minas Gerais. *Acta Sci Agron.* 31:57-61.
30 <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i1.6629>.
31

- 1 Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase
2 in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867–880.
3 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
4
- 5 Neves LLM (2003) Envolvimento de Enzimas Oxidativas no Escurecimento do Quiabo
6 [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
7
- 8 Pinheiro FA, Elias LF, Jesus Filho M, Modolo UM, Rocha JCG, Lemos MF, Scherer R,
9 Cardoso WS (2021) Arabica and Conilon coffee flowers: Bioactive compounds and
10 antioxidante capacity under different processes. *Food Chemistry* 336: 127701.
11 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127701>.
12
- 13 Ptak A, Simlat M, Morańsk E, Skrzypek E, Warchoń M, Tarakemeh A, Laurain-Mattar D,
14 (2019) Exogenous melatonin stimulated Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis in in vitro
15 cultures of *Leucojum aestivum* L. *Industrial Crops & Products*, 138: 111458.
16 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.06.021>.
17
- 18 Ptak A, Tahchy Ae, Skrzypek E, Wójtowicz T, Laurain-Mattar D (2013) Influence of auxins
19 on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus *Centr. Eur.*
20 *J. Biol.*, 8 (2013), pp. 591-599.
21
- 22 Racchi ML, Bagnoli F, Danti S (2001) Differential activity of catalase and superoxide
23 dismutase in seedlings and in vitro micropropagated oak (*Quercus robur* L.). - *Plant Cell Rep.*
24 20: 169-174, <https://doi.org/10.1007/s002990000300>.
25
- 26 Rezende TT, Carvalho SP, Bueno Filho JSS, Honda Filho CP, Simões LC, Paulino RNL,
27 Oliveira LL, Nascimento TL. Costa Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) por
28 miniestacas. *Coffee Science*, 12:91-99 2017.
29 <http://www.sbicafe.ufv.br:80/handle/123456789/8265>.
30
- 31 Romano A Stevanato P Sorgona A Cacco G Abenavoli MR (2019) Dynamic Response of Key
32 Germination Traits to NaCl Stress in Sugar Beet Seeds. *Sugar Tech* 21:661–671.
33 <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0660-9>.
34

- 1 Sarrou E Therios I Dimassi-Theriou K. 2014. Melatonin and other factors that promote rooting
2 and sprouting of shoot cuttings in *Punica granatum* cv. Wonderful. Turkish Journal of Botany
3 38: 293-301. <https://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-14-38-2/bot-38-2-9-1302-55.pdf>.
4
- 5 Shimizu MM Mazzafera P (2000) A role for trigonelline during imbibition and germination of
6 coffee seeds Plant Biol. 2 (2000) pp. 605-611
7
- 8 Sugiyama A Sano CM Yazaki K Sano H (2016) Caffeine fostering of mycoparasitic fungi
9 against phytopathogens. Plant Signaling & Behavior 11:e1113362.
10 <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1113362>
11
- 12 Torres LM. 2014. Compostos bioativos ácidos orgânicos atividades antioxidante e suas
13 correlações com a qualidade de bebida. Thesis Universidade Federal de Lavras Brasil.
14
- 15 Vallejos-Torres G Arévalo LA Ríos O Cerna A Marín C (2020) Propagation of Rust-Tolerant
16 *Coffea arabica* L. Plants by Sprout Rooting in Microtunnels. Journal of Soil Science and Plant
17 Nutrition 20: 933–940 <https://doi.org/10.1007/s42729-020-001807>.
18
- 19 Velikova V Yordanov I Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid
20 rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Science. 151:59–66.
21 [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1).
22
- 23 Vilasboa J da Costa CT Ransan LG Mariath JEA Fett-Neto AG. 2021. Microcutting Redox
24 Profile and Anatomy in *Eucalyptus* spp. With Distinct Adventitious Rooting Competence.
25 Front. Plant Sci. v. 11 p. 620832. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.620832>.
26
- 27 Wink M Witte L. 1985. Quizalizidine alkaloids as nitrogen source for lupine seedlings and cell
28 suspension cultures. Z Naturforsch C. n. 40 p.767-775.
- 29 Zamani Z Amiri H Ismaili A (2020) Improving drought stress tolerance in fenugreek
30 (*Trigonella foenum-graecum*) by exogenous melatonin Plant Biosystems - An International
31 Journal Lidando com todos os Aspectos da Biologia Vegetal 154: 643-
32 655 <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1674398>.

- 1 Zarrouk O Francisco R Pinto-Marijuan M et al. (2012) Impact of irrigation regime on berry
2 development and flavonoids composition in Aragonez (Syn. Tempranillo) grapevine).
3 *Agricultural Water Management* 114: 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.06.018>.
4
- 5 Zhang W Fan J Tan Q Zhao M Zhou T Cao F (2017) The effects of exogenous hormones on
6 rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem cuttings. *PLoS*
7 *ONE* 12: e0172320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172320>.
8
- 9 Zheng XQ Ashihara H (2004) Distribution biosynthesis and function of purine and pyridine
10 alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Sci* 166:807–813.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

1 **Legendas das Figuras**

2 **Fig 1** Enraizamento cumulativo (a), TCR - taxa de crescimento relativo (b) e fases do
3 enraizamento (c) de *Coffea arabica* L. sob aplicação de melatonina e AIB em função dos DAP.

4 A fase de indução e iniciação estão representadas pela degrade azul e verde, respectivamente,
5 já a fase de expressão está representada pela cor vermelha. Quanto mais intenso for a cor, mais
6 representado é a fase.

7 **Fig 2** PEE - porcentagem de estacas enraizadas (a), CR – comprimento da raiz (b), T50 - tempo
8 necessário para atingir 50% do potencial máximo (c), PMSR – peso da matéria seca da raiz (d),
9 A – área acumulado do enraizamento (e), PMSPA – peso da matéria seca da parte aérea (f) e
10 R/PA – relação raiz parte aérea (g) em função aplicação de exógena de melatonina e AIB em
11 estacas de cafeeiro arábica.

12 **Fig 3** H₂O₂ – peróxido de hidrogênio (a), CAT – catalase (b), APX - peroxidase do ascorbato
13 (c), POD – peroxidase (d), SOD - dismutase do superóxido (e), em função aplicação de
14 melatonina e AIB aos 0, 7, 28, 47 e 69 DAP em estacas de cafeeiro arábica cultivar Catuai IAC-
15 144. Letras minúsculas compara os estimulantes (melatonina e AIB) dentro de cada dia após o
16 plantio (DAP). Letras maiúsculas compara os DAP dentro de cada estimulante pelo teste de
17 Duncan ($p < 0,05$).

18 **Fig 4** cafeína (a), trigonelina (b), fenóis totais (c) e PPO -polifenoloxidase (d) em função
19 aplicação de melatonina e AIB aos 0, 7, 28, 47 e 69 DAP em estacas de cafeeiro arábica. Letras
20 minúsculas compara os estimulantes (melatonina e AIB) dentro de cada dia após o plantio
21 (DAP). Letras maiúsculas compara os DAP dentro de cada estimulante pelo teste de Duncan (p
22 $< 0,05$).

23 **Fig 5** Análise de componentes principais a 0 DAP, na indução (7 DAP), iniciação (28 DAP),
24 expressão (47 e 69 DAP) e média de todos as fases (média) em função de aplicação de AIB e

1 melatonina (M5 e M43), em cafeeiro arábica Catuai IAC-144. PEE - porcentagem de estacas
2 enraizadas, CR – comprimento da raiz, T50 - tempo necessário para atingir 50% do potencial
3 máximo, PMSR – peso da matéria seca da raiz, A – área acumulado do enraizamento, PMSPA
4 – peso da matéria seca da parte aérea, R/PA – relação raiz parte aérea, TCR - taxa de
5 crescimento relativo, H₂O₂ – peróxido de hidrogênio, SOD - dismutase do superóxido, CAT -
6 catalase, APX - peroxidase do ascorbato, POD – peroxidase, PPO – polifenoloxidase,
7 trigonelina e cafeína.

8 **Fig 6** Dinâmica de substâncias endógenas, atividade enzimática nas fases do enraizamento e
9 morfologia nos tratamentos de AIB (a) e melatonina M43 (b). PEE - porcentagem de estacas
10 enraizadas, CR – comprimento da raiz, T50 - tempo necessário para atingir 50% do potencial
11 máximo, PMSR – peso da matéria seca da raiz, PMSPA – massa seca da parte aérea, H₂O₂ –
12 peróxido de hidrogênio, SOD - dismutase do superóxido, CAT - catalase, APX - peroxidase do
13 ascorbato, POD – peroxidase, PPO – polifenoloxidase, trigonelina e cafeína.

14

15

16

17

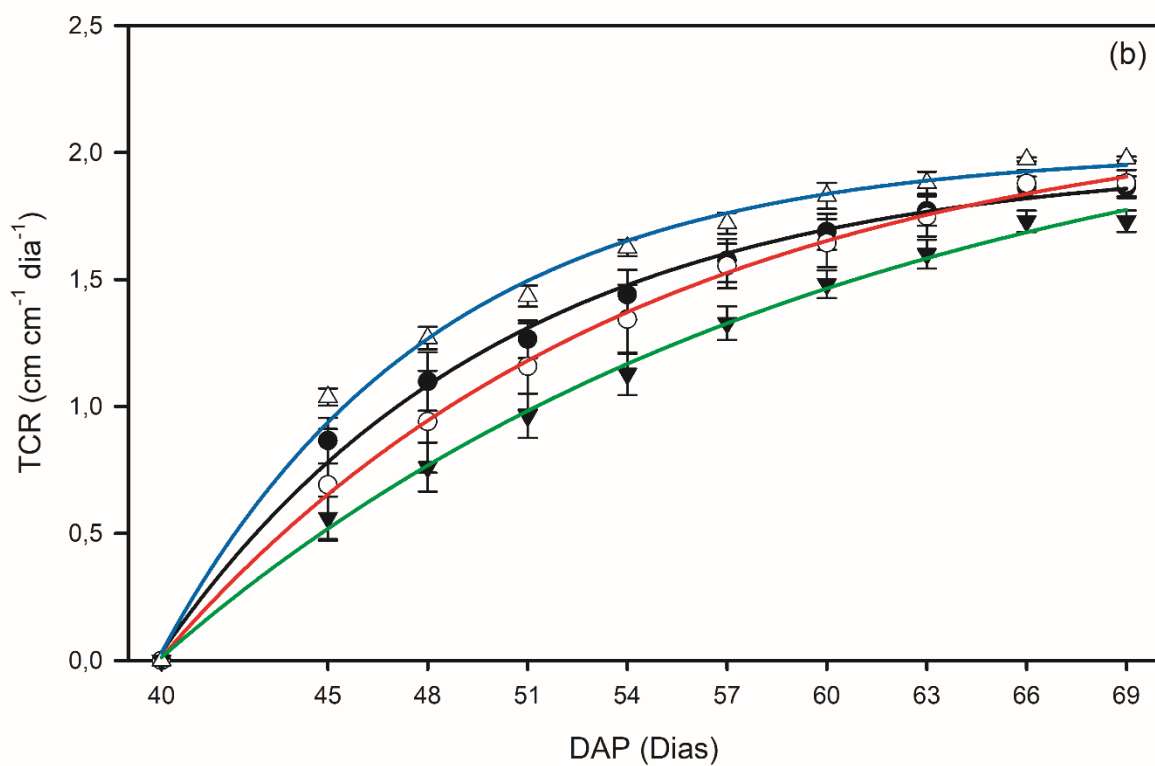
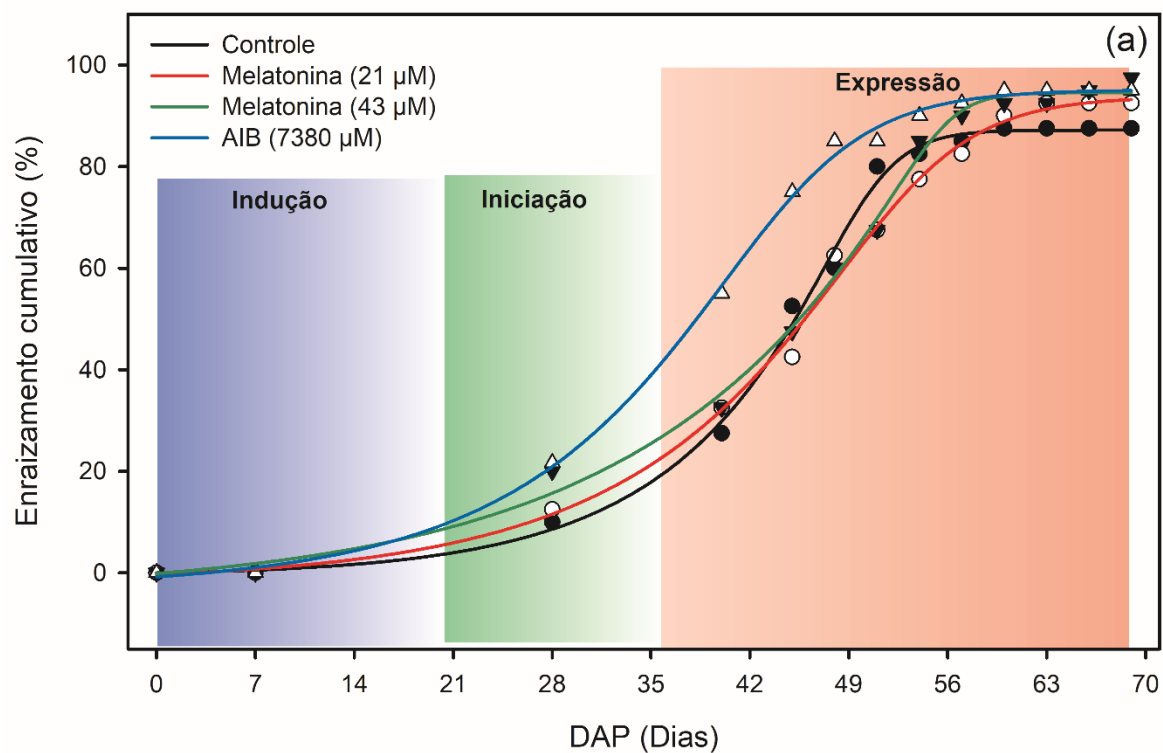
18

19

20

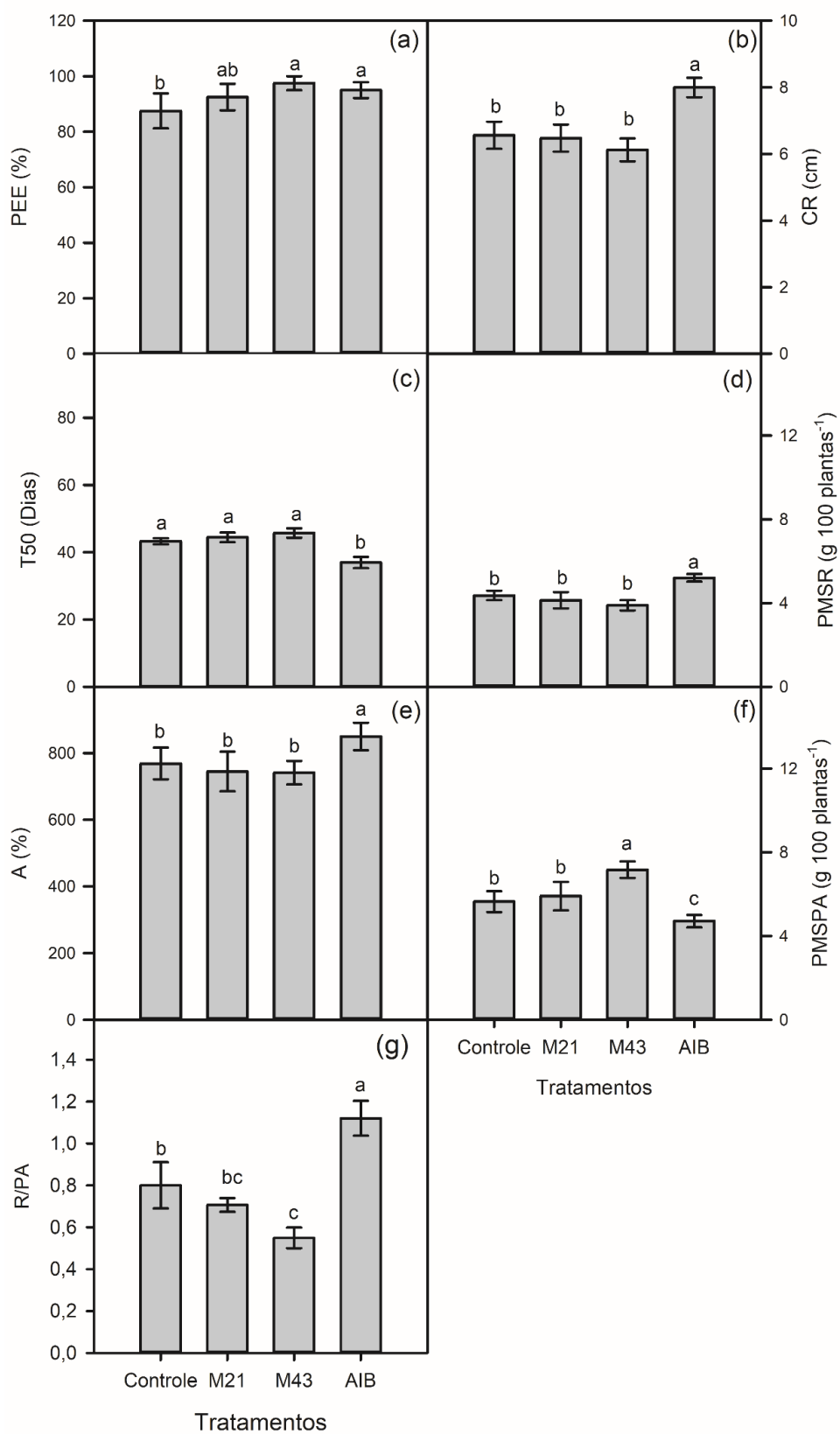
21

22

1 **Figura 1**

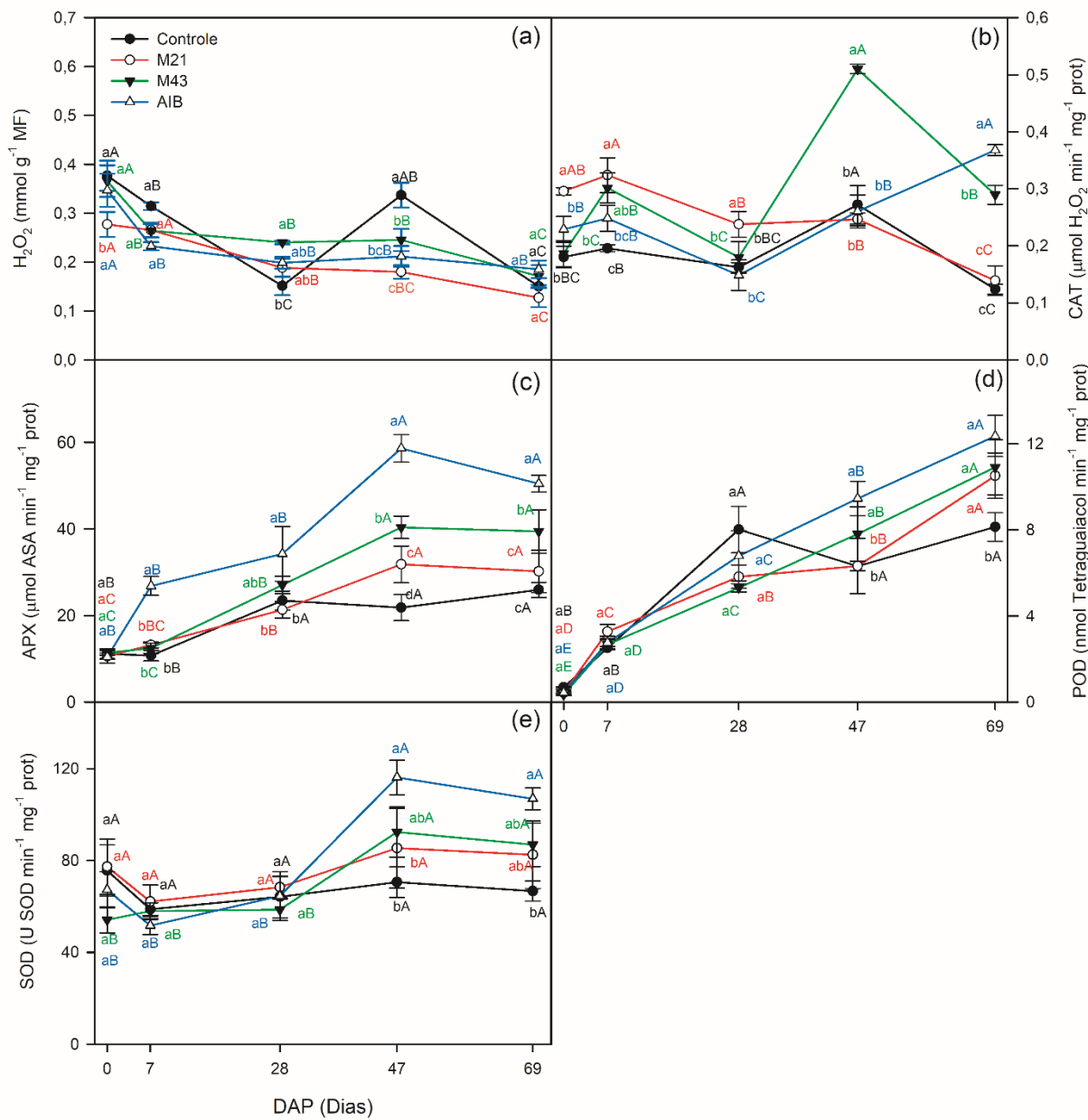
2
3
4
5

1 **Figura 2**



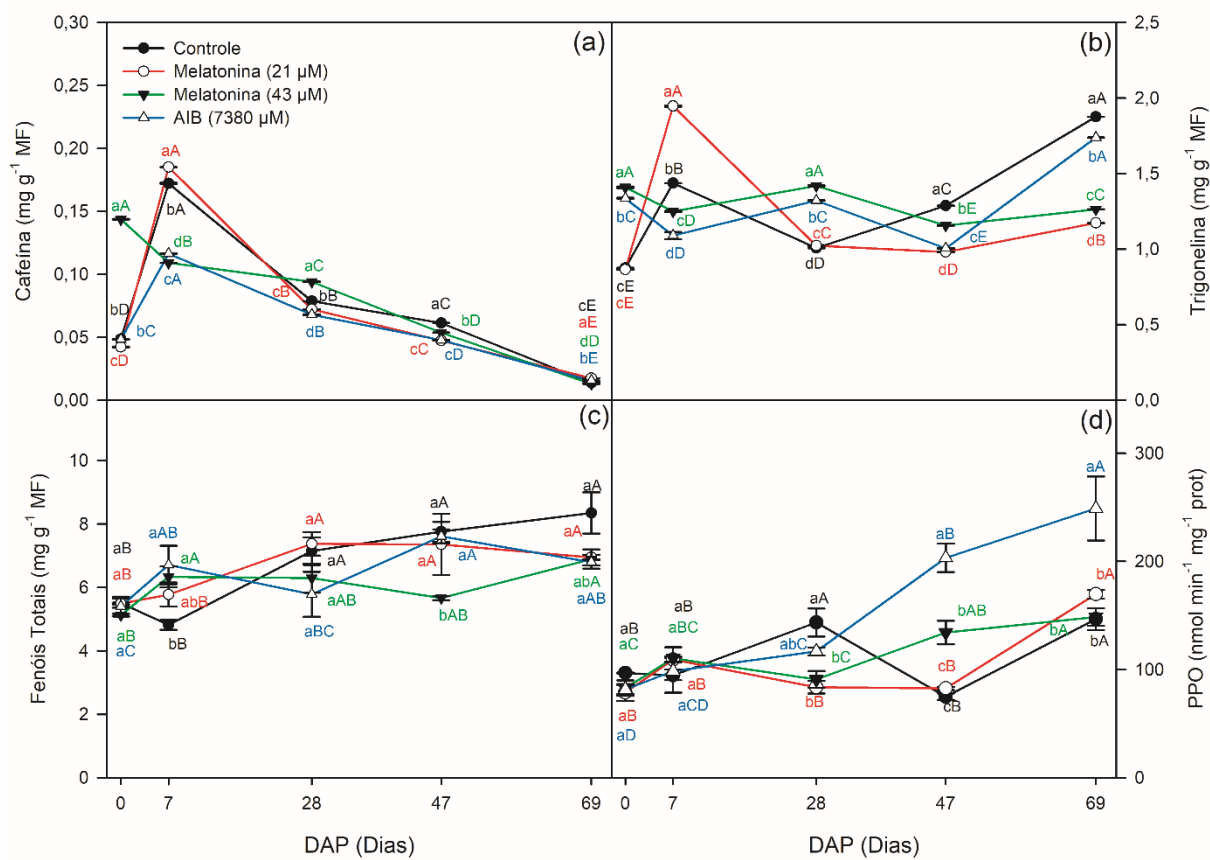
2
3
4

1 **Figura 3**



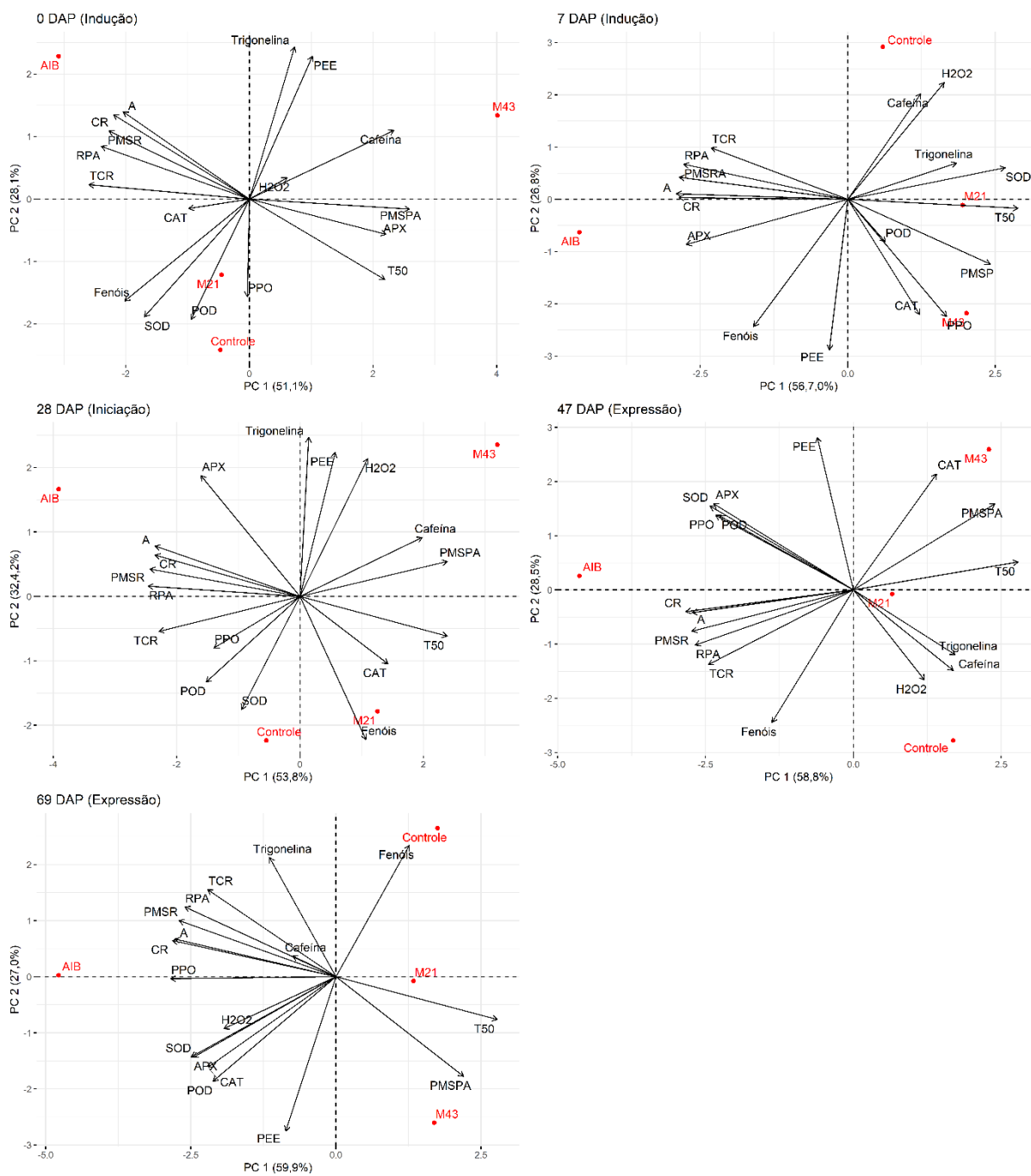
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

1 **Figura 4**



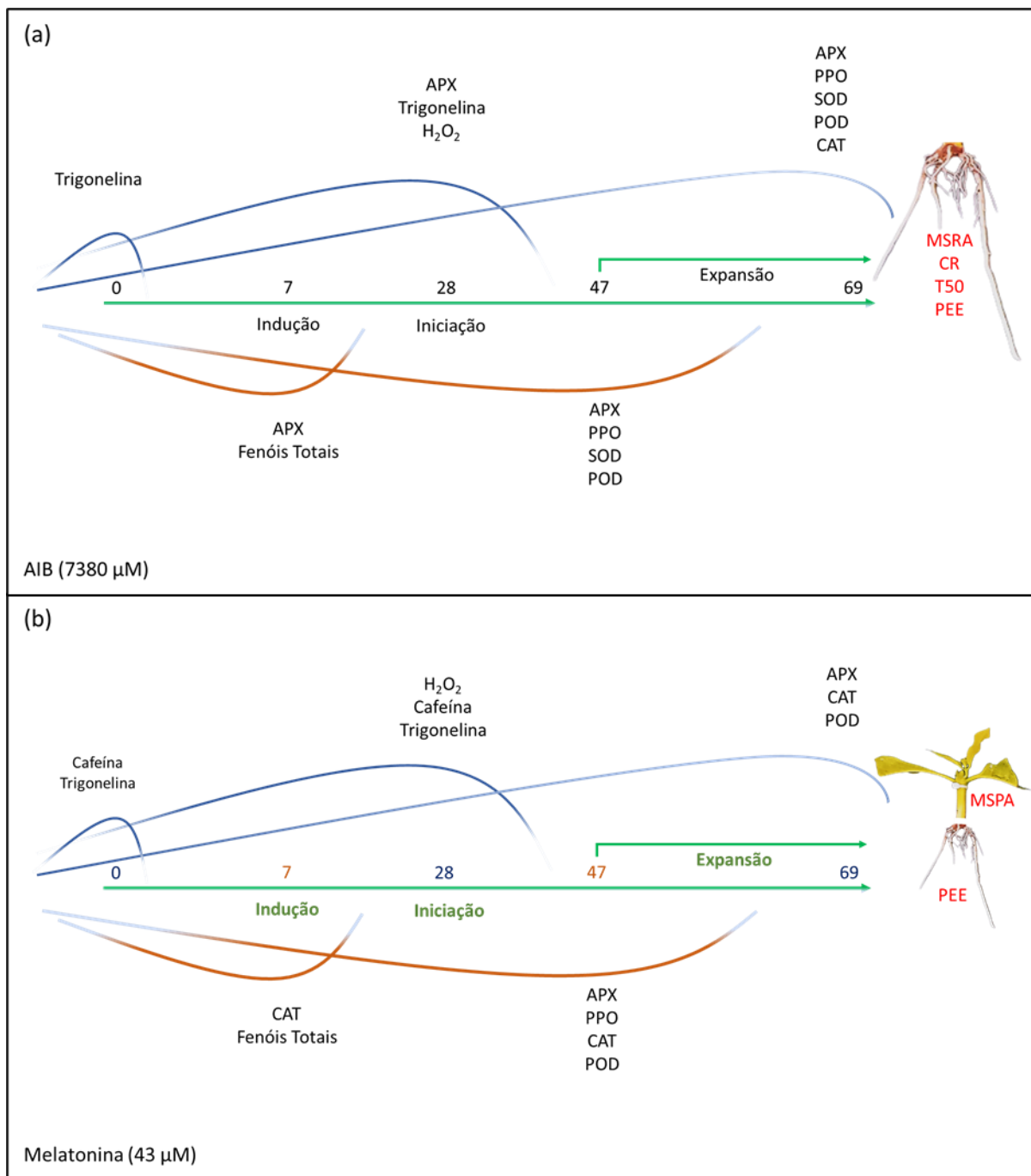
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

1 **Figura 5**



2
3
4
5
6
7
8
9

1 **Figura 6**



- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

A melatonina M43 promove a FR pelo incremento do conteúdo de H_2O_2 orquestrada pelas atividades da SOD, CAT e APX nas fases do enraizamento, além do aumento dos conteúdos de fenóis totais na fase de indução logo após aplicação dos tratamentos. As atividades da PPO e POD parece estar envolvido na FR associada a proteção das estacas associada à melatonina M43. A FR estimulada pelo AIB parece ser um efeito mais mecânico e direto, pois o enraizamento foi antecipado.

A formação de raízes adventícias em estacas de café arábica induzidas pela aplicação de AIB e M43 está correlacionado com maiores concentrações de trigonelina e cafeína principalmente logo após a aplicação e na fase da iniciação. Ademais, a correlação entre esses metabólitos e H_2O_2 , fenóis e enzimas antioxidantes revelam diferentes perfis, em função das fases, evidenciando a complexidade de processos que podem estar envolvidos no balanço redox durante o desenvolvimento das raízes adventícias em estacas de cafeeiro arábica.

Trabalhos anteriores apontam que a melatonina atua contra estresse abiótico, no entanto, mudas produzidas a partir pelo método de estaquia pode possibilitar a formação de mudas resistentes. Também abre a possibilidade de explorar a correlação desses parâmetros com a capacidade de enraizamento, o que poderá contribuir para o estabelecimento de modelos de previsão antecipada de recalcitrância de enraizamento, contribuindo assim para a seleção e propagação clonal em programas de melhoramento.