



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Marta Maria Fidalgo de Sousa

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE EXTRATOS DA  
ALGA *ASCOPHYLLUM NODOSUM* NA  
ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E NO PERFIL  
DE METABOLITOS DA OLIVEIRA EM  
CONDIÇÕES DE DÉFICE HÍDRICO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e  
Biotecnologia Vegetal orientada pela Doutora Maria Celeste  
Pereira Dias e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida  
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de  
Coimbra**

julho de 2021

Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra

Efeito da aplicação de extratos da alga  
*Ascophyllum nodosum* na atividade  
fotossintética e no perfil de metabolitos da  
oliveira em condições de défice hídrico

Marta Maria Fidalgo de Sousa

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal  
orientada pela Doutora Maria Celeste Pereira Dias e apresentada ao Departamento de  
Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

julho de 2021

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## **Agradecimentos**

Começo por agradecer à minha orientadora, Doutora Celeste Dias, por me acompanhar ao longo de todo o processo, mostrando-se sempre disponível. Por ser uma pessoa muito acessível e por me transmitir todos os seus conhecimentos, foi um gosto trabalhar consigo.

Agradeço também à Márcia, por me ter auxiliado e aconselhado sempre que precisei, tanto na parte prática, como com problemas que foram surgindo ao longo do trabalho. Agradeço ao Rui, meu colega e parceiro de laboratório, pela boa disposição e apoio. Ambos tornaram o ambiente de trabalho leve e confortável. À Professora Diana Pinto, ao Professor Artur Silva e à Doutora Mónica Válega, da Universidade de Aveiro, Departamento de Química, agradeço a disponibilidade e apoio na cromatografia gasosa e líquida.

Um sincero obrigado aos viveiros Miguel Vaz - Sociedade Agrícola Lda. de Semide - Coimbra, Portugal, por cederem as oliveiras utilizadas neste trabalho.

À Inês, minha companheira e amiga de todas as horas, por acreditar sempre em mim. Obrigada por te disponibilizares a ler a minha dissertação, e a dar a tua opinião sincera, mesmo com todo o trabalho que tens tido.

Luiza e Ana obrigada por me ouvirem falar vezes sem conta sobre as tarefas a realizar em cada dia e por me fazerem gostar mais de Coimbra. Às amigas mais antigas, obrigada pelo apoio constante, e por me fazerem sentir em casa, mesmo longe. Quero agradecer também a todos os outros amigos, em especial àqueles que acompanharam a minha dedicação ao longo deste ano, e que, de alguma forma, contribuíram para o meu sucesso.

Por último agradeço à minha família, que será sempre o meu maior apoio, e que nunca deixou de me incentivar a estudar e a dar o melhor de mim em tudo o que faço. Obrigada mãe, pai e Bia.



## Índice

<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>9</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>11</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>18</b>
1.1. Alterações do clima .....	18
1.1.1. A escassez de água e a seca .....	18
1.2. A oliveira ( <i>Olea europaea</i> L.) e a sua cultura .....	19
1.3. A oliveira e o stress abiótico .....	21
1.3.1. Mecanismos de resposta a nível fisiológico e morfológico .....	21
1.3.2. Mecanismos de resposta a nível celular .....	22
1.4. Bioestimulantes .....	24
1.4.1. Bioestimulantes à base de algas .....	25
1.5. Objetivos .....	27
<b>2. Material e métodos</b> .....	<b>28</b>
2.1. Condições de cultura das oliveiras e tratamentos .....	28
2.2. Determinação da fotossíntese .....	29
2.2.1. Determinação das trocas gasosas .....	29
2.2.2. Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	29
2.3. Determinação do estado hídrico da planta .....	30
2.4. Determinação da permeabilidade da membrana .....	31
2.5. Quantificação de pigmentos fotossintéticos .....	31
2.6. Extração e análise de metabolitos por cromatografia .....	32
2.6.1. Extração de metabolitos das folhas .....	32
2.6.2. Análise de metabolitos presentes nos extratos de folhas de oliveira .....	33
2.6.2.1. Análise qualitativa e quantitativa do extrato de hexano: cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa .....	33
2.6.2.2. Análise qualitativa e quantitativa do extrato de metanol: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espetrometria de massa .....	34
2.7. Análise dos dados .....	36
<b>3. Resultados</b> .....	<b>37</b>

3.1. Estado hídrico das oliveiras e danos nas membranas .....	37
3.2. Fotossíntese .....	38
3.2.1. Trocas gasosas .....	38
3.2.2. Eficiência do uso intrínseco da água .....	39
3.2.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	40
3.3. Pigmentos .....	41
3.4. Metabolómica .....	43
3.4.1. Compostos lipofílicos .....	43
3.4.1.1. Polióis e açúcares .....	43
3.4.1.2. Ácidos orgânicos e ésteres .....	47
3.4.1.3. Alcanos de cadeia longa, terpenos e cumarinas .....	49
3.4.2. Compostos fenólicos .....	52
3.4.2.1. Flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico .....	53
3.4.2.2. Secoiridoides .....	57
<b>4. Discussão .....</b>	<b>60</b>
4.1. Perfil de metabolitos e resposta da oliveira ao tratamento de bioestimulante em condições de rega normal – 100% de capacidade de campo .....	60
4.2. Perfil de metabolitos e resposta da oliveira à aplicação de bioestimulante e rega deficitária – 50% de capacidade de campo.....	61
4.3. Conclusões .....	68
<b>Referências .....</b>	<b>69</b>

## Abstract

The Mediterranean region is one of the most representative in the olive sector worldwide. However, climate change, particularly extreme weather events, are a risk to olive culture. Above all, drought is one of the big challenges in this sector, as intensive olive groves depend on high levels of irrigation, and traditional rainfed ones have also been forced to use irrigation to maintain production. The demand for olive oil has been increasing, as it is beneficial to health. To respond to this increase, it is necessary to find more ecological cultivation strategies, for example, biostimulants, which are natural substances or microorganisms that improve growth and productivity of crops and help plants to overcome stress conditions.

This work aimed to study the effect of the application of a biostimulant on the tolerance of olive trees to water deficit. Olive trees of the Galega and Arbequina varieties were divided into 2 groups, one of which was treated with a *Ascophyllum nodosum* based biostimulant. After this treatment, each group was divided into 2, low-irrigation and well-irrigated. At the end of the treatments, the physiological performance (water status, membrane permeability, pigments and photosynthesis) and the profile of phenolic and lipophilic compounds were evaluated.

The biostimulant treatment had a major role in the response of olive trees to deficit irrigation. At a physiological level, the protection provided by the biostimulant under low-irrigation condition was more evident in the Galega variety, increasing net CO<sub>2</sub> assimilation rate and stomatal opening. In the metabolite profile, the two varieties presented different defense and protection strategies in response to the biostimulant under low-irrigation. Arbequina increased the production of neophytadiene, fatty acids, 1-monopalmitin, esculin and the verbascoside 1 isomer, while Galega, in addition to esculin, also accumulated the flavonoid luteolin-7-*O*-rutinoside and the secoiridoids, 10-hydroxyoleuropein and 2''-methoxyoleuropein.

**Keywords:** biostimulant, drought, metabolomics, *Olea europaea*, physiological performance





## Resumo

A região do Mediterrâneo é uma das mais representativa do setor olivícola mundial. Contudo, as alterações climáticas, particularmente os eventos climáticos extremos, representam um risco para a olivicultura. A seca, nomeadamente, impõe grandes desafios neste sector, uma vez que o olival intensivo depende de grandes níveis de rega, e o tradicional de sequeiro tem sido forçado a recorrer à rega para manter a produção. A procura de azeite tem vindo a aumentar, uma vez que este é benéfico para a saúde. De forma a responder a este aumento, é necessário encontrar estratégias de cultura mais ecológicas, por exemplo, através do uso de bioestimulantes, que são substâncias naturais ou microrganismos, que melhoram o crescimento e a produtividade das culturas, e ajudam as plantas a combater situações de stress.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da aplicação de um bioestimulante na tolerância da oliveira ao défice hídrico. Oliveiras das variedades Galega e Arbequina foram divididas em 2 grupos, onde um deles foi tratado com um bioestimulante à base de *Ascophyllum nodosum*. Após este tratamento, cada grupo foi dividido em 2, um com rega deficitária e outro bem regado. No final dos tratamentos, foi avaliada a performance fisiológica (estado hídrico, permeabilidade da membrana, pigmentos e fotossíntese) e o perfil de compostos fenólicos e lipofílicos.

A aplicação de bioestimulante teve um papel mais relevante na resposta das oliveiras à rega deficitária. A nível fisiológico, a proteção conferida pelo bioestimulante em condições de rega deficitária foi mais notória na variedade Galega, onde melhorou a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e aumentou a abertura estomática. Já no perfil de metabolitos, as duas variedades apresentaram estratégias de defesa e proteção diferentes à aplicação do bioestimulante em rega deficitária. A Arbequina aumentou a produção de neofitadieno, ácidos gordos, 1-monopalmitina, esculina e do isómero de verbascósideo 1, enquanto que a Galega para além da esculina, também acumulou o flavonoide luteolina-7-O-rutinósido e os secoiridoides, 10-hidroxioluropeína e 2''-metoxioluropeína.

**Palavras-chave:** bioestimulante, metabólomica, *Olea europaea*, performance fisiológica, seca



### **Lista de abreviaturas**

CC – Capacidade de campo

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TRA – Teor relativo em água

PM – Permeabilidade da membrana

$P_N$  - Taxa de assimilação de  $CO_2$

$g_s$  - Condutância estomática

$C_i/C_a$  - Rácio da concentração intercelular de  $CO_2$  e da concentração extracelular de  $CO_2$

EIUA – Eficiência intrínseca do uso da água

$F_v/F_m$  - Eficiência máxima do PSII

$\Phi_{PSII}$  - Eficiência efetiva do PSII

Clo *a* – Clorofila *a*

Clo *b* – Clorofila *b*



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Oliveiras a crescerem no campo .....	21
<b>Figura 2.</b> Oliveiras a crescer em vaso .....	28
<b>Figura 3.</b> Oliveiras divididas por tratamentos (C, B, S, BS) .....	29
<b>Figura 4.</b> Medidor de gases por infravermelhos LI-6400XT .....	30
<b>Figura 5.</b> Tubos para determinação do peso turgido .....	30
<b>Figura 6.</b> Frascos com folha de oliveira e água ultrapura a agitar .....	31
<b>Figura 7.</b> Leitor de microplacas EnSpire da PerkinElmer .....	32
<b>Figura 8.</b> Erlernmeyer com folhas de oliveira trituradas para extração de compostos fenólicos e lipofílicos (A). Frascos com sobrenadante para obtenção do extrato (B) .....	33
<b>Figura 9.</b> Equipamento de cromatografia gasosa GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu ....	34
<b>Figura 10.</b> Equipamento de cromatografia líquida Thermo Scientific Ultimate 3000RSLC equipado com um detetor de matriz de diodo DionexUltiMate 3000 RS acoplado a um espectrómetro de massa .....	35
<b>Figura 11.</b> Teor relativo em água (TRA) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.....	37
<b>Figura 12.</b> Permeabilidade da membrana (PM) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....	37
<b>Figura 13.</b> Taxa de assimilação de CO <sub>2</sub> (P <sub>N</sub> ) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....	38
<b>Figura 14.</b> Condutância estomática (g <sub>s</sub> ) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.....	39
<b>Figura 15.</b> Rácio entre a concentração de CO <sub>2</sub> intercelular e extracelular nas folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo;	

B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....39

**Figura 16.** Eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....40

**Figura 17.** Eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária ..... 40

**Figura 18.** Eficiência efetiva do PSII ( $\Phi$ PSII) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....41

**Figura 19.** Teor em pigmentos das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....42

**Figura 20.** Exemplo de cromatograma obtido por GC-MS para o perfil lipofílico na variedade Arbequina, tratamento B, réplica 1. Legenda: 1- D-eritrose, 2- D(-)-tagatofuranose, 3- neofitadieno, 4 – ácido quinico, 5 – gluconolactona, 6-  $\beta$ -D-glucopirranose, 7 – D-manitol, 8 - D(+)-galactopirranose, 9 – ácido palmítico, 10 – mioinositol, 11 - D(+)-turanose, 12 – ácido linoleico, 13 – ácido oleico, 14 – ácido esteárico, 15 – ácido eicosanóico, 16 – 1-monopalmitina, 17 – sacarose, 18 – glicerol, 19 – esqualeno, 20 – alcano 1, 21 – esculina, 22 – alcano 2, 23 – alcano 3, 24 – alcano 4, 25 – alcano 5, 26 -  $\beta$ -amirina, 27 -  $\alpha$ -amirina, 28 – alcano 6, 29 - olean-12-ene-3,28-diol, 30 - Derivado de Lup-20(29)-en-28-al, 31 – ácido ursólico .....43

**Figura 21.** Polióis e açúcares (A e B) presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: D(-)-Tagato. – D(-)-Tagatofuranose; Gluconolac. – Gluconolactona;  $\beta$ -D-Glucop. -  $\beta$ -D-Glucopirranose; D(+)-Galactop. - D(+)-Galactopirranose; D(+)-Turan. - D(+)-Turanose; C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....45

**Figura 22.** Polióis e açúcares (A e B) presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: D(-)-Tagato. – D(-)-Tagatofuranose; Gluconolac. –

Gluconolactona;  $\beta$ -D-Glucop. -  $\beta$ -D-Glucopiranosose; D-(+)-Galactop. - D-(+)-Galactopiranosose; D-(+)-Turan. - D-(+)-Turanose; C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....46

**Figura 23.** Ácidos orgânicos e éster presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: Ác. – ácido; 1-Monopalm. – 1-Monopalmitina; C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....48

**Figura 24.** Ácidos orgânicos e éster presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: Ác. – ácido; 1-Monopalm. – 1-Monopalmitina; C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....48

**Figura 25.** Alcanos de cadeia longa presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....49

**Figura 26.** Alcanos de cadeia longa presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....50

**Figura 27.** Terpenos e cumarina presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: amir. – amirina; Olean.diol - Olean-12-ene-3,28-diol; Deriv. Do Lup.al - Derivado de Lup-20(29)-en-28-al, Ác. – ácido, C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....51

**Figura 28.** Terpenos e cumarina presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: amir. – amirina; Olean.diol - Olean-12-ene-3,28-diol; Deriv. Do Lup.al - Derivado de Lup-20(29)-en-28-al, Ác. – ácido, C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....52

**Figura 29.** Cromatograma parcial do perfil fenólico (UHPLC-MS) a 230 nm, modo de ião negativo, folhas da variedade Galega, tratamento B, réplica 1. Legenda: 1- isômero de oleósido 1, 2- isômero de oleósido 2, 3- galocatequina, 4 – isômero de glucosídeo de ácido elenólico 1, 5 – isômero de  $\beta$ -hidroxiverbascósido 1, 6- isômero de  $\beta$ -hidroxiverbascósido 2, 7 – isômero de glucosídeo de ácido elenólico 2, 8 - rutina, 9 –



luteolina-7-*O*-rutinósido, 10 – 10-hidroxioluropeína, 11 - isómero de glucósido de luteolina 1, 12 – verbascósido, 13 – apigenina-7-glucósido, 14 – isómero de glucósido de luteolina 2, 15 – 2"-metoxioluropeína isómero 1, 16 – 2"-metoxioluropeína isómero 2, 17 – oluropeína isómero 1, 18 – oluropeína isómero 2. Também foi usado o comprimento de onda 330 nm para a quantificação dos compostos .....52

**Figura 30.** Cromatograma parcial do perfil fenólico (UHPLC-MS) a 230 nm, modo de ião negativo, folhas da variedade Arbequina, tratamento B, réplica 1. Legenda: 1- isómero de oleósido 1, 2- luteolina diglucosídeo, 3- glicosídeo de ácido ferúlico, 4 – derivado do ácido ferúlico, 5 – isómero de glucosídeo de ácido elenólico 1, 6- derivado da aglicona de oluropeína, 7 – isómero de glucosídeo de ácido elenólico 2, 8 - rutina, 9 – luteolina-7-*O*-rutinósido, 10 – 10-hidroxioluropeína, 11 - isómero de glucósido de luteolina 1, 12 – isómero de verbascósido 1, 13 – isómero de verbascósido 2, 14 – oluropeína diglucósido, 15 – isómero de glucósido de luteolina 2, 16 - derivado do ácido cumárico, 17 - isómero de glucósido de luteolina 3, 18 - 2"-metoxioluropeína isómero 1, 19 – 2"-metoxioluropeína isómero 2, 20 – oluropeína isómero 1, 21 – oluropeína isómero 2, 22 - luteolina. Também foram usados os comprimentos de onda 330 nm e 280 nm para a quantificação dos compostos .....53

**Figura 31.** Flavonoides presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: Lut.-7-*O*-rut. - luteolina-7-*O*-rutinósido, Apigen.-7-gluc. – Apigenina-7-glucósido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....54

**Figura 32.** Flavonoides presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: Lut.-7-*O*-rut. - luteolina-7-*O*-rutinósido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....55

**Figura 33.** Derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: Iso. – Isómero,  $\beta$ -hidroxiverb. -  $\beta$ -hidroxiverbascósido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....56

**Figura 34.** Derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: Ác. - ácido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....56

**Figura 35.** Secoiridoides (A e B) presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega.  
Legenda: Ác. – ácido, 10-Hidroxiol. – 10-Hidroxiioleuropeína, 2''-metoxiol. – 2''-metoxioleuropeína, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....58

**Figura 36.** Secoiridoides (A e B) presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina.  
Legenda: 10-Hidroxiol. – 10-Hidroxiioleuropeína, 2''-metoxiol. – 2''-metoxioleuropeína, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária .....59

## **1. Introdução**

### **1.1 Alterações do clima**

As alterações climáticas são um problema presente no nosso dia-a-dia, e implicam diretamente a agricultura. Este problema é global, mas afeta de forma mais pronunciada a região mediterrânica (IPCC, 2014). Esta região é caracterizada por invernos amenos e húmidos, e verões quentes e secos (Brito, 2018). Contudo, devido às alterações do clima é cada vez mais frequente a ocorrência de eventos meteorológicos extremos, como períodos de seca prolongados acompanhados por ondas de calor e radiação UV muito elevada (Garcia-Herrera *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019). Estas condições afetam o crescimento, desenvolvimento e produtividade de muitas culturas típicas desta região (Moriondo e Bindi, 2008). A oliveira, por exemplo, é uma das principais culturas na região do Mediterrâneo, nomeadamente em Portugal, e apesar de apresentar grande tolerância à seca, o efeito das alterações do clima emergentes tem vindo a afetar a produtividade e qualidade da azeitona e do azeite (Brito *et al.*, 2019).

Apesar da crescente sensibilização e preocupação da população para o problema das alterações globais do clima, e dos esforços mundiais para reduzir as fontes responsáveis por estas alterações, é necessário fazer muito mais pois as projeções do painel internacional para as alterações climáticas (IPCC, 2014) apontam para uma continuação e até agravamento da frequência e da intensidade de fenómenos climáticos extremos. A seca e a escassez de água já são consideradas os principais problemas sócios ecológicos do século XXI (Pereira, 2017; Bulgari *et al.*, 2019). Perante este cenário é urgente adotar estratégias de adaptação às alterações climáticas que podem passar, por exemplo, em mudanças na forma como os recursos hídricos são utilizados e no tipo de culturas que são selecionadas, de modo a gerir melhor a utilização da água e promover práticas agrícolas mais sustentáveis.

#### **1.1.1 A escassez de água e a seca**

Neste contexto de alterações climáticas, a seca, que resulta da diminuição da precipitação, é um dos principais problemas que se impõe a nível mundial para as culturas agrícolas. Em Portugal, nas últimas décadas, tem-se vindo a observar uma diminuição da precipitação, e são cada vez mais raros os anos com muita precipitação em todo o território. A esta situação de seca soma-se o aumento significativo do consumo de água

face à disponibilidade existente, resultando em situações de escassez de água, particularmente grave no sul do país, com impactos significativos na produção agrícola (ANP e WWF, 2019).

A seca tem várias consequências no desenvolvimento e na produtividade das culturas (Brito *et al.*, 2019). Pode levar, por exemplo, a carências nutricionais, que comprometem o ciclo de vida das plantas, uma vez que cada elemento é específico e insubstituível (Cetinkaya *et al.*, 2016). A falta de água influencia negativamente a área foliar, diminuindo o desenvolvimento das folhas e provocando a sua senescência. Consequentemente a fotossíntese é afetada, fazendo com que haja uma diminuição da biomassa e da produção (Brito *et al.*, 2019). No entanto, o déficit hídrico não afeta todos os indivíduos de igual forma. Os seus efeitos diferem com a espécie ou mesmo com a variedade, como é o caso da oliveira. Não sendo possível generalizar os meios utilizados para combater este problema, a investigação na resposta das plantas ao déficit hídrico é essencial (Cetinkaya *et al.*, 2016; Edziri *et al.*, 2018).

## 1.2 A oliveira (*Olea europaea* L.) e a sua cultura

A oliveira pertence à família Oleaceae e é uma árvore perene, de porte médio (Figura 1). A espécie cultivada é a *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* (Chiappetta e Muzzalupo, 2012), e pode ser encontrada em países como Espanha, Itália, Portugal, França, Albânia, Montenegro, Turquia, Tunísia, Grécia e Chipre (Therios, 2009). O sistema radicular da oliveira é fasciculado e superficial. A sua casca é acinzentada, e os ramos cobertos por pequenas escamas. As folhas são simples, pequenas e verde-acinzentadas, sendo brilhantes na página superior devido às ceras, e esbranquiçadas na página inferior, que possui estomas rodeados de tricomas permitindo assim menores perdas de águas. Os gomos florais desenvolvem-se na zona axilar de cada folha. As inflorescências podem apresentar entre 15 e 30 flores brancas e hermafroditas. Os frutos são drupas oleaginosas, constituídas por um exocarpo fino, um mesocarpo carnudo formado por células do parênquima ricas em óleo e um endocarpo. Os frutos são verdes quando jovens, e mais escuros (negros ou verde-acastanhados) depois de maduros (Chiappetta e Muzzalupo, 2012; Tamasi *et al.*, 2016). Sendo esta uma cultura muito antiga, e o azeite, obtido a partir dos frutos desta árvore, um dos pilares da dieta mediterrânica, a oliveira assume um papel económico e social muito importante (Tamasi *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2019). Por isso, a procura e o consumo de azeite, a nível mundial,

tem vindo a aumentar. Em especial, devido aos seus benefícios para a saúde, como é o caso das propriedades antioxidantes que possui (Brito *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020a). Os dados provisórios de 2019/20 mostram que a produção mundial de azeite atingiu um total de 3 207 000 toneladas, sendo que 93,8% dessa produção corresponde aos países membros do International Olive Council (IOC). A Europa produziu no total 1 924 100 toneladas, com Espanha como maior produtor, seguido da Itália, Grécia e Portugal (140 500 toneladas). Apesar da produção de azeite a nível mundial ter triplicado nos últimos 60 anos, as estimativas apontam para uma redução de 0,3% em 2020/2021, acompanhada por uma ligeira descida no seu consumo mundial (1,5%) relativamente a 2019/2020, em que houve um aumento do consumo de 11,4 % em países não membros do IOC e 3,4% em países membros do IOC (IOC, 2020; IOC, 2021). Pensa-se que estas descidas estejam relacionadas com vários fatores, entre os quais se encontram a contra safra, a falta de água em momentos cruciais ao desenvolvimento da azeitona, práticas agrícolas pouco adequadas, e ainda a pandemia de Covid-19 (Dawson, 2020).

Atualmente existem muitas variedades de oliveira, resultantes de cruzamentos espontâneos, mutações genéticas, dispersão natural de sementes e frutos, e domesticação, que ocorrem desde há muitos anos (Mota-Barroso *et al.*, 2014). Consultando o catálogo nacional de variedades de 2016 da DGAV, que inclui apenas as variedades com aptidão para produção de fruto, percebemos que existe um leque muito variado de opções. A variedade de oliveira mais utilizada em Portugal é a Galega vulgar. Esta variedade portuguesa é caracterizada por árvores de porte médio a grande e normalmente a produção de azeitona é alternada (Dgard, 2010). Esta variedade é sensível ao frio, mas é muito tolerante à seca (Maia, 2010). A azeitona da variedade Galega é essencialmente usada na produção de azeite de grande estabilidade (Leitão *et al.*, 1986). Para além da Galega, outras variedades portuguesas, tais como a Cobrançosa e a Madural, são também muito usadas nos olivais nacionais (Cordeiro, 2014). Estas variedades são muito utilizadas no olival tradicional, que é um olival de sequeiro, presente essencialmente na região de Trás-os-Montes e na Beira Interior. Este tipo de olival é extensivo, com baixa densidade de plantação, e pouca aplicação de produtos fitofarmacêuticos. São olivais antigos, apresentando, normalmente, árvores com vários anos, onde as operações culturais realizadas geralmente são não mecanizadas (Reis, 2014).

Em Portugal podemos ainda encontrar o olival intensivo, com maior expressão no Ribatejo e Alentejo. Este segundo tipo de exploração recorre a quantidades de água para

rega muito elevadas, possui elevada densidade, sistemas mecanizados, e necessita de grandes fertilizações sendo, por exemplo, a variedade espanhola Arbequina uma das mais utilizadas neste sistema (Sanzani *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2018; Araújo *et al.*, 2019). Esta variedade provém da localidade Arbeca (Lérida, Catalunha em Espanha) adapta-se bem a terrenos pobres e é muito resistente ao frio (Criado *et al.*, 2004). Possui uma copa pequena o que permite fazer plantações com uma maior densidade. Para além disso é muito precoce e tem uma elevada produtividade, mas o seu azeite apesar de apresentar um bom rendimento de gordura é pouco estável (Drapc, 2013; Cordeiro *et al.*, 2014).

No atual contexto de alterações climáticas, caracterizado por períodos prolongados de seca e temperaturas elevadas, também o olival tradicional (normalmente de sequeiro) começa a necessitar de rega para garantir a produção. Estima-se que atualmente cerca de 70% dos olivais a nível mundial são regados (Romero-Trigueros *et al.*, 2019), e apesar da rega aumentar a produção de azeitona, afeta também a qualidade do azeite, reduzindo em muitos casos a suas qualidades nutritivas (redução do seu conteúdo em polifenóis e ácidos gordos) (Gucci *et al.*, 2019).



Figura 1- Oliveiras a crescerem no campo

### **1.3 A oliveira e o stress abiótico**

#### **1.3.1 Mecanismos de resposta a nível fisiológico e morfológico**

A oliveira é uma espécie bastante resistente e adaptada a cenários de escassez de água e temperaturas elevadas, sendo tipicamente mediterrânea (Silva *et al.*, 2018). Contudo, essa resistência está dependente de vários fatores, como por exemplo a variedade. É o caso da Cobrançosa, que segundo estudos prévios, possui melhores mecanismos de adaptação do que as variedades Cordovil de Castelo Branco e Cordovil

de Serpa (Dias *et al.*, 2018a). Outro aspeto importante, e que influencia a resposta da oliveira em condições de stress, é o tipo de olival. Segundo Silva *et al.* (2018), as oliveiras de sequeiro, adquirem mecanismos de defesa e adaptação que lhes permitem responder melhor a stresses abióticos, e ainda recuperar melhor após esses episódios de stress. Assim sendo, podemos afirmar que a oliveira possui uma plasticidade fisiológica e morfológica que torna possível a sua adaptação a estes ambientes. Alguns desses mecanismos estão relacionados com o aumento da espessura da cutícula folear (deposição de ceras sobre a superfície folear) e da capacidade de expansão das raízes para captar mais água, eficiente controlo do fecho dos estomas, e ajuste osmótico (Fernández, 2014).

Um dos primeiros alvos dos stresses abióticos em plantas, é o aparelho fotossintético. Também na oliveira, apesar da sua grande tolerância à seca, a redução da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e o fecho estomático (trocas gasosas) são das principais respostas ao stress. Já a fase luminosa da fotossíntese é mais resistente, apresentando apenas, em geral, alterações (descida) ao nível da eficiência efetiva do fotossistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) e aumento do quenching não fotoquímico (NPQ) (Brito, 2018; Araújo *et al.*, 2019).

Os carotenoides estão envolvidos nos mecanismos de dissipação da energia nas membranas fotossintéticas. Estes pigmentos possuem um papel antioxidante, impedindo a foto-degradação das clorofilas, ou por dissipação do excesso de energia gerado com a fotossíntese sob a forma de calor, ou por neutralização de espécies reativas de oxigénio (ROS) e diminuição da peroxidação lipídica (Gill e Tuteja, 2010). Em oliveira, o aumento do teor de carotenoides, assim como o rácio entre carotenoides e clorofila, em resposta a stress abiótico, representa uma estratégia de defesa para proteção do aparelho fotossintético (Brito *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020c).

### **1.3.2 Mecanismo de resposta a nível celular**

Em paralelo, e quando os mecanismos de dissipação do excesso de energia absorvida (ex.: NPQ) diminuem ou não são suficientes, a continuação da captura de energia e a diminuição da sua utilização na fotossíntese, promove o aumento das ROS e consequente stress oxidativo que vai danificar várias moléculas, como é o caso dos lípidios, proteínas e pigmentos fotossintéticos (Gill e Tuteja, 2010; Ying *et al.*, 2020). Por exemplo, na oliveira e em outras espécies, a descida da  $\Phi_{PSII}$  normalmente está associada à perda do conteúdo em pigmentos fotossintéticos resultante do stress oxidativo (Bacelar *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2018b). Para combater e lidar melhor com estes efeitos negativos,

a oliveira consegue ativar várias estratégias bioquímicas de defesa e proteção. Estas estratégias incluem o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (ex.: catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)) (Dias *et al.*, 2018b), a acumulação de açúcares solúveis e outros osmólitos (ex.: prolina) para manter a hidratação celular (Silva *et al.*, 2018) e folhas com cutículas mais espessas (ex.: aumento de alcanos de cadeia longa que fazem parte das ceras epicuticulares) (Fernández, 2014; Dias *et al.*, 2018a). A produção de compostos antioxidantes, como por exemplo ascorbato, glutatona, flavonoides (ex.: derivados da luteína e quercetina), secoiridoides (ex.: oleuropeína) e ácidos hidroxicinâmicos (ex.: verbascosídeo) também tem um papel muito importante, ajudando a oliveira a combater as ROS geradas com o aumento do stress (Tamasi *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2019; Gucci *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020b).

Segundo Dias *et al.* (2020b) o secoiridoide oleuropeína é um dos compostos mais abundantes nas folhas de oliveira, apresentando um papel de defesa da planta (sinalizador e captador de ROS) maior do que alguns flavonoides ou ácidos hidroxicinâmicos. Este papel antioxidante já foi comprovado por vários estudos com outras variedades de oliveira (Petridis *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2020b; Mechri *et al.*, 2020). Os flavonoides, por exemplo, a quercetina-3-*O*-glucosídeo e a luteolina-7-*O*-glucosídeo, são também abundantes nas folhas de oliveiras e tem um papel muito importante na resposta ao stress abiótico (ex.: calor e radiação elevada de UV-B) (Dias *et al.*, 2019). O poder antioxidante dos flavonoides provem não só do facto de neutralizar ROS, mas também de diminuir a sua produção, uma vez que inibem as enzimas que geram estes radicais (Mierziak *et al.*, 2014). Estes compostos conseguem ainda manter a integridade da membrana, renovando os lípidos, em condições de stress hídrico (Mechri *et al.*, 2020). O derivado do ácido hidroxicinâmico verbascosídeo, embora presente em pequenas quantidades nas folhas de oliveira, é também um dos compostos fenólicos mais importantes na defesa em condições de stress (Mechri *et al.*, 2020). Este composto tem um efeito protetor ao nível dos fosfolípidos das membranas (Cardinali *et al.*, 2012).

A quantidade de compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira é muito variável, estando dependente de fatores como a variedade, as condições climáticas, o conteúdo em minerais do solo e da própria planta, ou ainda as técnicas usadas para extrair estes compostos (Cetinkaya *et al.*, 2016). Sabe-se que normalmente os stresses bióticos ou abióticos funcionam como um estímulo, levando a planta a produzir mais destes compostos (Mechri *et al.*, 2019).



Para além dos compostos fenólicos, as folhas de oliveira são também ricas em diversos ácidos gordos (ex.: ácido palmítico, oleico, esteárico e linoleico), terpenos ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, ácido ursólico, derivados do lupeol, esqualeno, fitol e neofitadieno), açúcares e polióis (ex.: sorbitol), e alcanos de cadeia longa (Dias *et al.*, 2018b; Dias *et al.*, 2020a; Dias *et al.*, 2020c). Alterações no teor destes compostos estão relacionadas com diferentes estratégias de resposta a stresses abióticos. Por exemplo, os alcanos de cadeia longa contribuem para a manutenção da hidratação foliar, variações no rácio entre ácidos gordos insaturados e saturados afetam a integridade das membranas, e alguns terpenos e polióis contribuem para a neutralização dos ROS (Dias *et al.*, 2018b; Dias *et al.*, 2020a; Dias *et al.*, 2020b).

#### **1.4 Bioestimulantes**

Tendo em conta os desafios das alterações climáticas, particularmente a disponibilidade de água, e o aumento da procura mundial de azeitona, é imprescindível adotar práticas agrícolas mais sustentáveis que permitam melhorar a competitividade deste sector. Existem já várias estratégias que permitem suavizar os efeitos do stress abiótico, nomeadamente a aplicação foliar de caulino e ácido salicílico ou o uso de redes de ensombramento (Brito, 2018). Recentemente surgiram abordagens mais ecológicas que permitem tornar a agricultura mais sustentável e resiliente. É o caso dos bioestimulantes que nos últimos anos têm vindo a ser adotados, levando a um aumento do seu uso no sector agrícola (Araújo *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Os bioestimulantes são substâncias naturais (ex.: algas ou aminoácidos) ou microrganismos que aumentam o crescimento e produtividade das plantas (Van Oosten *et al.*, 2017). Podem também ser definidos como produtos orgânicos e/ou microrganismos, que quando aplicados às culturas fornecem inúmeros benefícios, como a estimulação do crescimento, melhoramento da absorção de nutrientes e tolerância a stresses, assim como o aumento da qualidade e produtividade da cultura no geral (Van Oosten *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2019).

O seu modo de ação é muito difícil de determinar, e continua a ser estudado, uma vez que existe uma grande variedade de compostos utilizados como bioestimulantes, e um grande número de efeitos nas culturas (Bulgari *et al.*, 2019). Contudo sabe-se que influenciam várias cascatas sinalizadoras e processos metabólicos que aumentam a fotossíntese, a eficiência do uso da água, o sistema antioxidante, a entrada e translocação

de nutrientes, e o rendimento e qualidade dos frutos (Van Oosten *et al.*, 2017; Bulgari *et al.*, 2019; Shukla *et al.*, 2019; Kerchev *et al.*, 2020). Estes produtos diminuem ainda as necessidades de irrigação e permitem um menor uso de pesticidas, resultando numa diminuição do impacto ambiental.

#### **1.4.1 Bioestimulantes à base de algas**

Os produtos à base de algas contêm reguladores de crescimento (ex.: auxinas, citoquininas e giberelinas), aminoácidos, e uma baixa concentração de elementos inorgânicos que influenciam o crescimento e divisão das células das plantas, a sua expansão, nutrição e maturidade (Chouliaras *et al.*, 2009). As algas, em particular algas marinhas, no seu habitat natural, encontram-se expostas a variações extremas de temperatura, salinidade e luz, o que faz delas uma importante fonte para os bioestimulantes, pois produzem diversos compostos de defesa (Shukla *et al.*, 2019).

A alga marinha mais utilizada nos bioestimulantes comerciais é a alga castanha *Ascophyllum nodosum*. Análises da sua composição revelaram que esta alga é constituída maioritariamente, por hidratos de carbono (ex.: celulose, fucoidana, laminarina, ácido alginico e manitol), e também em menor percentagem por proteínas (ex.: lectinas), vitaminas C e A, lípidos, hormonas como auxinas (ex.: ácido indolacético), betaínas, citoquininas e giberelinas, compostos fenólicos e vários minerais (ex.: Mg, Fe, Cu, Cl, Na, Zn and K) (Ali *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2020). Esta alga cresce naturalmente na costa nordeste do oceano Atlântico (Pereira *et al.*, 2020).

Têm sido feitos vários estudos com a aplicação foliar ou radicular de extratos desta alga em inúmeras culturas, como tentativa de resolver problemas de stresses abióticos, melhorar a absorção de nutrientes e minerais por parte da planta, entre outros. Quando se trata de tolerância à seca, existem vários trabalhos publicados. É o caso da aplicação de extrato de *A. nodosum* em *Spinacea oleracea* em condições de défice hídrico, em que se verificou um aumento do teor relativo em água (TRA), assim como do peso fresco e seco. Ou ainda a aplicação de extratos da mesma alga em várias plantas ornamentais (*Spiraea nipponica* e *Pittosporum eugenioides*), hortícolas (*Lycopersicon esculentum*, *Phaseolus vulgaris*, *Fragaria ananassa*, *Capsicum annuum*, *Zea mays*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa* e *Glycine max*) e fruteiras (*Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Malus domestica* e *Actinidia deliciosa*), tornando-as mais resistentes a este stress (Van Oosten *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2019). Em condições de défice hídrico a aplicação desta alga ajuda a regular

a temperatura foliar, turgescência, e a condutância estomática através da ativação da expressão de genes relacionados com as aquaporinas (Santaniello *et al.*, 2017). A aplicação desta alga em várias espécies também demonstrou que ajudava a proteger o aparelho fotossintético (fotossistema II e enzimas do ciclo de Calvin), quando em condições de stress, através da regulação da expressão de genes relacionados com proteínas protetoras e pela ativação de enzimas antioxidantes (Shukla *et al.*, 2018). Adicionalmente, o tratamento com *A. nodosum* promove a ativação de genes envolvidos na biossíntese de hidratos de carbono, aminoácidos e polióis, e estimula a produção de compostos bioativos, como por exemplo os flavonoides, e clorofilas (Jithesh *et al.*, 2018; Shukla *et al.*, 2018).

Os poucos trabalhos que estudam os efeitos dos bioestimulantes em oliveira, correspondem também à aplicação foliar de extratos de *A. nodosum*. Estes trabalhos demonstram um aumento da produtividade e da qualidade do azeite em duas variedades de oliveira. Na variedade Galega, a aplicação deste bioestimulante promoveu o seu vingamento, e na Cobrançosa aumentou a atividade enzimática dos órgãos reprodutivos (Mota e Lopes, 2012). A utilização de extrato desta alga, juntamente com boro e azoto, numa variedade de oliveira grega (Koroneiki), permitiu aumentar a produtividade, melhorar o estado de nutrição das árvores e a qualidade do azeite (aumentou os ácidos gordos insaturados) (Chouliaras *et al.*, 2009). Contudo, nada se sabe à cerca dos efeitos do tratamento com *A. nodosum* em condições de défice hídrico nesta mesma cultura. Desta forma é necessário efetuar estudos ao nível fisiológico e metabólico para entender melhor o modo de ação destes compostos na oliveira em condições de stress.

## 1.5 Objetivos

A olivicultura é um dos setores agrícolas mais importantes na região mediterrânica e em Portugal, com um grande impacto na economia. A produção e exportação de azeite tem vindo a aumentar nos últimos anos, e Portugal ocupa a quarta posição de produtor de azeite a nível europeu. Contudo, as alterações climáticas, particularmente a diminuição da precipitação e a consequente escassez de água, tem influenciado o modo de cultura da oliveira levando a um maior uso de água de rega para manter a produção de azeitona. Assim, é importante encontrar soluções ecológicas para aumentar a sustentabilidade do olival no contexto de alterações climáticas em que vivemos.

Tendo em conta as previsões que apontam para o aumento da frequência de eventos climáticos extremos (ex.: seca, ondas de calor e índices de UV elevados) e a crescente procura mundial de azeite, este trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito da aplicação de bioestimulante na tolerância de duas variedades de oliveira à seca. Em particular, pretende-se:

- Verificar se a aplicação do bioestimulante pode diminuir os efeitos negativos do défice hídrico na performance fisiológica de oliveiras;
- Perceber se a aplicação do bioestimulante pode melhorar a performance fisiológica de oliveiras, aumentando a fotossíntese, a eficiência no uso da água e o perfil de metabolitos lipofílicos e fenólicos;
- Comparar as respostas fisiológicas e o perfil de metabolitos lipofílicos e fenólicos das duas variedades de oliveira, tratadas e não tratadas com bioestimulante e expostas a défice hídrico.

Para tal, plantas jovens de *O. europaea* (variedades Galega e Arbequina) foram tratadas com um bioestimulante comercial à base de *A. nodosum*. Após um tratamento de défice hídrico de 69 dias, a performance fisiológica das oliveiras (estado hídrico, fotossíntese, eficiência do uso da água, conteúdo em pigmentos fotossintéticos e permeabilidade das membranas) foi analisada. Adicionalmente, foram extraídos metabolitos das folhas de oliveira com hexano e metanol e analisados por técnicas de cromatografia, gasosa e líquida, acopladas a espectrometria de massa, respetivamente GC-MS e LC-MS. O perfil qualitativo e quantitativo de metabolitos lipofílicos (extrato de hexano) e fenólicos (extrato de metanol) das folhas de oliveiras das duas variedades foi determinado e comparado.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Condições de cultura das oliveiras e tratamentos

Oliveiras (*Olea europaea* L.) de duas variedades, Galega e Arbequina, com cerca de três anos gentilmente cedidas pelos Viveiros Miguel Vaz (Semide, Coimbra, Portugal) foram colocadas a crescer em vasos de aproximadamente 3L com turfa (Figura 2). As oliveiras cresceram durante 17 meses no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. No local instalou-se um aparelho para monitorizar a temperatura e humidade. A fertilização das oliveiras foi feita com os adubos Complezal NPK 5:8:10 (aplicado após o vingamento), e Complezal NPK 12:4:6 (aplicado antes da floração), ambos com a concentração de 6 mL/L de água. Foi ainda feita suplementação de Boro (0,5 % de tetraborato de sódio, Bórax) via foliar antes do início da floração.



Figura 2 - Oliveiras a crescer em vaso

As oliveiras foram divididas aleatoriamente por quatro grupos diferentes dentro de cada variedade, cada um dos grupos com cerca de 8-10 indivíduos e com uma altura média de  $103 \pm 13$  cm: grupo controlo bem regado (C, as plantas foram mantidas a 100% da capacidade de campo; Arbequina  $n=8$  e Galega  $n=10$ ), grupo bioestimulante bem regado (B, as plantas foram tratadas com bioestimulante e mantidas a 100% da capacidade de campo; Arbequina  $n=8$  e Galega  $n=9$ ), grupo de rega deficitária (S, as plantas foram mantidas a 50% da capacidade de campo; Arbequina  $n=9$  e Galega  $n=10$ ) e grupo de bioestimulante com rega deficitária (BS, as plantas foram tratadas com bioestimulante e mantidas a 50% da capacidade de campo Arbequina  $n=8$  e Galega  $n=9$ ).

O ensaio começou com a aplicação foliar de bioestimulante nas plantas dos grupos B e BS. Foram feitas quatro aplicações, nos dias 17 de março, 30 de junho, 7 de julho e 14 de julho de 2020. O bioestimulante usado foi o Fitoalgas Green© da empresa Tradecorp. Preparou-se uma solução de bioestimulante (3 mL/L de água), e aspergiu-se 200 mL por planta e por aplicação. No dia em que foi feita a última aplicação de bioestimulante, iniciou-se também o tratamento de rega reduzida (50% da capacidade de campo) nos grupos S e BS. A quantidade de água nos vasos dos tratamentos S e BS foi monitorizada duas vezes por semana, e sempre que esta se encontrava abaixo de 50% da

capacidade de campo (CC) era adicionada água. Os grupos de plantas dos tratamentos C e B foram regados normalmente a 100% da capacidade de campo (Figura 3). Este tratamento de rega deficitária teve uma duração de 69 dias, terminando no dia 21 de setembro de 2020. Nesse mesmo dia foi determinada a fotossíntese e a permeabilidade da membrana, analisado o teor relativo em água e em pigmentos fotossintéticos, e foram recolhidas folhas para posterior análise do perfil de metabolitos.



Figura 3 - Oliveiras divididas por tratamentos (C, B, S, BS)

## 2.2 Determinação da fotossíntese

Foi utilizado o aparelho LI-6400XT Portable Photosynthesis System que está equipado com um analisador de gases por infravermelhos e fluorímetro portátil (Figura 4). Foi selecionada em todas as plantas a folha mais jovem e completamente expandida para as medições da fotossíntese.

### 2.2.1 Determinação das trocas gasosas

A taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $P_N$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ) e o rácio entre a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  e a concentração extracelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) foram medidos *in situ* em folhas de oliveira. O uso intrínseco da eficiência da água (UIEA) foi depois calculado através da fórmula:  $\text{UIEA} = \text{taxa de assimilação de } \text{CO}_2 / \text{condutância estomática}$ . Este procedimento foi realizado usando as mesmas condições ambientais de crescimento da oliveira.

### 2.2.2 Determinação da fluorescência da clorofila *a*

As folhas de oliveira usadas na medição das trocas gasosas foram também usadas para a determinação da fluorescência. As folhas foram primeiro adaptadas ao escuro

durante uma hora, e após este período foi medida a fluorescência mínima ( $F_0$ ). De seguida, após a aplicação de *flash* de luz intenso ( $> 1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) foi registada a fluorescência máxima ( $F_m$ ). As folhas foram depois adaptadas à luz durante pelo menos 1 hora. Após este período foi medida a fluorescência mínima ( $F_0'$ ). De seguida, foi aplicado um *flash* de luz ( $> 5000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) e foi determinada a fluorescência máxima ( $F_m'$ ). Foram calculados os seguintes parâmetros de acordo com Maxwell e Johnson (2000): eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) =  $(F_m - F_0)/F_m$  e eficiência efetiva do PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) =  $(F'_m - F_0')/F'_m$ .



Figura 4 - Medidor de gases por infravermelhos LI-6400XT

### 2.3 Determinação do estado hídrico da planta

O estado hídrico das oliveiras foi avaliado através da medição do teor relativo em água (TRA) das folhas. Foram retiradas folha das oliveiras de todos os tratamentos, colocadas imediatamente em tubos fechados e depois foi determinado o peso fresco (PF). De seguida foi colocada água destilada em todos os tubos e deixados durante 48h a 4 °C para determinação do peso túrgido (PT) (Figura 5). Por último, as folhas foram colocadas numa estufa a 40 °C para secar. O peso seco (PS) foi depois determinado. O teor relativo em água foi calculado com base na fórmula:  $\text{TRA} (\%) = (\text{PF}-\text{PS})/(\text{PT}-\text{PS}) \times 100$  de acordo com Smart e Bingham (1974).



Figura 5 - Tubos para determinação do peso túrgido

## 2.4 Determinação da permeabilidade da membrana

A permeabilidade da membrana (PM) foi medida através da perda de eletrólitos. Para isso retirou-se uma folha de oliveira de cada tratamento. Depois de pesada e colocada num frasco ao qual se adicionou água ultrapura os frascos fechados foram colocados a agitar no escuro durante 24h (Figura 6). Mediu-se a absorvância da água de cada um dos frascos (Lt), a 280 nm, num espectrofotómetro, numa cuvete de quartzo. Os frascos foram depois levados ao autoclave (120 °C durante 20 min), e foi feita novamente a leitura da absorvância (Lo). A perda de eletrólitos foi calculada por Lt/Lo (%) de acordo com Lutts *et al.* (1996).



Figura 6 - Frascos com folha de oliveira e água ultrapura a agitar

## 2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Foram pesadas cerca de 100 mg de folhas das oliveiras e maceradas num almofariz com 2 mL de tampão acetona:Tris 50 mM (80:20, v/v) com pH 7,8. A maceração foi feita em condições de pouca luz e temperatura baixa. Após centrifugação a 5000 g durante 5 min, foi lida a absorvância do sobrenadante no espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer – Figura 7) a 470 nm, 537 nm, 647 nm e 663 nm, usando como branco a acetona/Tris.

Para calcular a quantidade de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides (g / g de PS) utilizaram-se as seguintes equações, de acordo com o protocolo desenvolvido por Sims e Gamon (2002):

- Clorofila *a* =  $(0,01373 \times A_{663}) - (0,000897 \times A_{537}) - (0,003046 \times A_{647})$
- Clorofila *b* =  $(0,02405 \times A_{647}) - (0,004305 \times A_{537}) - (0,005507 \times A_{663})$
- Carotenoides =  $(A_{437} - (17,1 \times (\text{Clo } a + \text{Clo } b) - 9,479 \times \text{Antocianinas}))/119,26$
- Antocianinas =  $(0,08173 \times A_{537}) - (0,00697 \times A_{647}) - (0,002228 \times A_{663})$





Figura 7 - Leitor de microplacas EnSpire da PerkinElmer

## **2.6 Extração e análise de metabolitos por cromatografia**

### **2.6.1 Extração dos metabolitos das folhas**

Folhas de oliveira de todos os tratamentos e das duas variedades foram previamente secas na estufa a 40 °C. Após pesagem e trituração, as folhas foram homogeneizadas com 20 mL de hexano para extração dos compostos lipofílicos (Figura 8A). A extração foi feita com agitação e à temperatura ambiente durante 48h. Após este período os sobrenadantes foram transferidos para frascos previamente pesados e foram adicionados novamente 10 mL de hexano ao resíduo obtido (Figura 8B). Após 24h de extração, os sobrenadantes foram novamente recolhidos e colocados a evaporar (dois ciclos de extração).

O resíduo das folhas resultante deste processo de extração foi deixado, durante 48h, para evaporar todo o hexano ainda presente e depois usado para repetir o mesmo processo, mas com metanol, para extração dos compostos fenólicos.

Os extratos obtidos do hexano foram pesados e foi adicionado diclorometano (10 mg/mL). Os extratos obtidos do metanol foram também pesados, mas foi adicionado metanol PA (100 mg/mL).



Figura 8 - Erlenmeyer com folhas de oliveira trituradas para extração de compostos fenólicos e lipofílicos (A) Frascos com sobrenadante para obtenção do extrato (B)

## 2.6.2 Análise de metabolitos presentes nos extratos de folhas de oliveira

### 2.6.2.1 Análise qualitativa e quantitativa do extrato de hexano: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Antes de injetar os extratos já dissolvidos em diclorometano no equipamento, foram realizadas reações de sililação. Adicionou-se um volume de solução correspondente a 20 mg de extrato, 200  $\mu\text{L}$  de padrão interno (tetracosano 1,2 mmol/L), 250  $\mu\text{L}$  de piridina, 250  $\mu\text{L}$  de *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida e 50  $\mu\text{L}$  de trimetilsilil cloro em tubos de sililação com tampa. A reação decorreu durante uma hora em banho Maria a 70 °C. Foram realizadas quatro réplicas de cada tratamento.

De seguida foi feita a análise cromatográfica de cada uma das réplicas (16 para cada variedade) com o equipamento GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu com uma coluna capilar DB-5-J&W (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme) (Figura 9) de acordo com o descrito em Machado (2021). A fase móvel usada foi o hélio, com um fluxo de 1,13 mL/min e a amostra foi injetada no modo *split* numa razão de 1:50. A temperatura inicial da coluna do equipamento foi mantida a 70 °C por 5 min, depois foi aumentada para 4 °C/min até atingir os 250 °C e de seguida mais uma vez aumentada 2 °C/min até atingir os 300 °C. Esta temperatura foi mantida por 5 min. A temperatura do injetador foi selecionada para 320 °C e a da linha de transferência para 200 °C. A ionização foi executada por impacto eletrónico, com uma energia de 70 eV. Os dados foram recolhidos a uma taxa de 1 scan/s numa gama de  $m/z$  50 – 1000 e a análise de GC-MS teve a duração de 87 min.

Para a identificação dos compostos presentes nos extratos de hexano foi feita uma comparação com a base de dados de espectroscopia de massa NIST14 (Mass spectral e WILEY Registry TM of Mass Spectra Data) disponível no programa de leitura do equipamento. A quantificação dos compostos foi feita através da área relativa dos picos. Para tal, calculou-se a área total de compostos para cada réplica e depois, calculou-se a área relativa de cada composto comparativamente a essa área total. As amostras foram injetadas em quadruplicado com vista a aumentar a reprodutividade dos resultados.



Figura 9 - Equipamento de cromatografia gasosa GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu

#### **2.6.2.2 Análise qualitativa e quantitativa do extrato de metanol: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa**

Os extratos foram dissolvidos em metanol PA, obtendo-se soluções de concentrações conhecidas (15 mg/mL). Após filtragem das amostras através de uma membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  de Nylon da marca Whatman, os extratos foram injetados num equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos (UHPLC-DAD ESI/MS<sup>n</sup>). Para cada amostra foram realizadas quatro réplicas.

A análise cromatográfica das réplicas (16 por variedade) foi feita recorrendo a um Thermo Scientific Ultimate 3000RSLC (Dionex) equipado com um detetor de matriz de diodo DionexUltiMate 3000 RS acoplado a um espectrómetro de massa (Figura 10) como descrito em Machado (2021). A coluna utilizada “*thermo scientific hypersil gold*” (1000 mm x 20 mm) com 1,9  $\mu\text{m}$ , foi mantida a uma temperatura de 30 °C. Foi utilizado acetonitrilo como fase móvel e ácido fórmico 0,1 % (v/v) previamente desgaseificados e filtrados, com um fluxo de 0,2 mL/min. O gradiente de solvente foi iniciado com 5 % de

ácido fórmico durante 14 min, seguido de 40 % do mesmo solvente, mas apenas por 2 min, posteriormente, 100 % durante 7 min e, por fim, 5 % durante mais 10 min. Foram injetados 6  $\mu$ L de amostra e obtiveram-se dados espectrais UV-vis entre a gama de 250-500 nm e também os perfis cromatográficos a 230, 280, 330 e 410 nm. Além disso, foi também utilizado um espectrômetro de massa LTQ XL “*linear ion trap 2D*” com uma fonte de ionização de *eletrospray* ortogonal (ESI) com uma temperatura capilar de 275 °C. A ionização foi efetuada por uma fonte de *eletrospray* com 5,00 kVv, na forma de ião negativo. Os dados foram recolhidos numa gama de m/z entre 50,00 e 2000,00. Também foram obtidas, em simultâneo, dissociações de iões percursos induzidas por colisão MS/MS e MS<sup>n</sup>.

Para a identificação dos compostos foi realizada uma análise das massas obtidas nos cromatogramas, bem como comparação com dados de compostos conhecidos, previamente referidos na literatura. Para o processamento dos cromatogramas foi utilizado o software Thermo Xcalibur 2.2. SP1.48.

A quantificação dos compostos foi feita através da área relativa dos picos. Para tal, calculou-se a área total de compostos para cada réplica e depois, calculou-se a área relativa de cada composto comparativamente a essa área total. As amostras foram injetadas em quadruplicado com vista a aumentar a reprodutividade dos resultados.



Figura 10 - Equipamento de cromatografia líquida Thermo Scientific Ultimate 3000RSLC equipado com um detetor de matriz de diodo DionexUltiMate 3000 RS acoplado a um espectrômetro de massa

## **2.7 Análise dos dados**

Os dados obtidos foram analisados usando o *software* Sigma Stat para Windows (versão 3.1). Foi realizado um teste-t (no caso de haver compostos identificados apenas em dois tratamentos) ou uma análise de variâncias (One-way ou Two-way ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla (teste de Holm-Sidak). Os dados obtidos foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3. Resultados

#### 3.1 Estado hídrico das oliveiras e danos nas membranas

As percentagens do teor relativo em água (TRA) nas duas variedades de oliveiras, nos diferentes tratamentos, estão representadas na figura 11. Em ambas as variedades não houve efeito significativo dos fatores rega e bioestimulante, nem interação entre estes fatores.

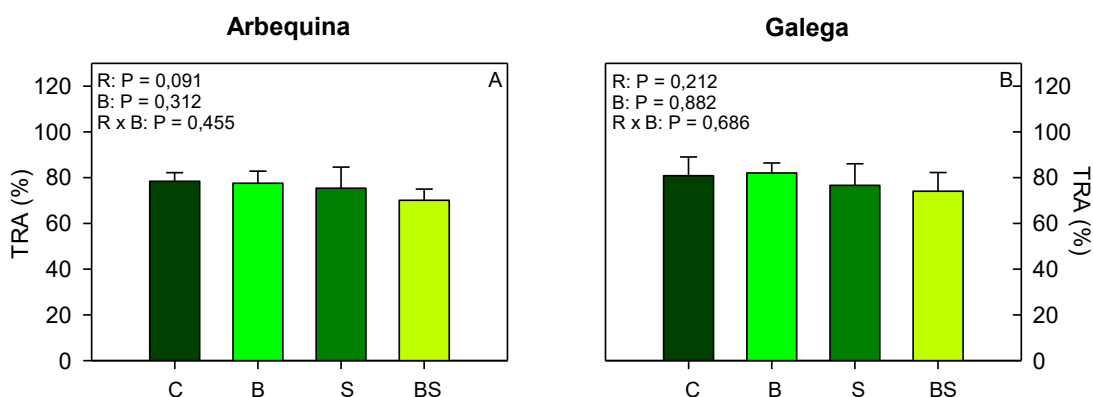


Figura 11 - Teor relativo em água (TRA) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

A resposta da permeabilidade da membrana (PM) nas duas variedades aos tratamentos foi diferente. Para a variedade Arbequina, não se observaram efeitos dos dois fatores separadamente, mas houve uma interação entre rega e bioestimulante (Figura 12A). A aplicação de bioestimulante (B) induziu um aumento significativo da PM quando comparado com as plantas de controlo sem bioestimulante (C). Na variedade Galega, apenas se observou um efeito significativo do fator bioestimulante. Assim, as plantas tratadas com bioestimulante (B e BS) apresentaram uma PM superior ao das plantas não tratadas (C e S) (Figura 12B).

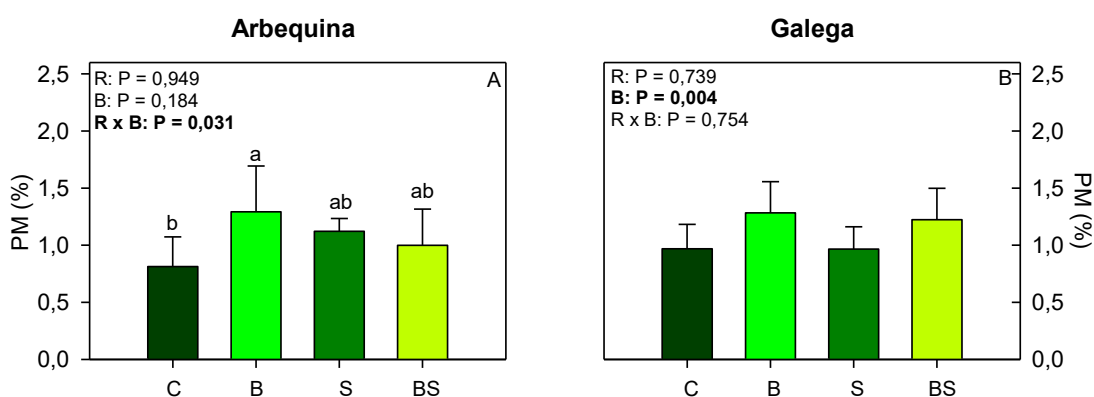


Figura 12 - Permeabilidade da membrana (PM) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

## 3.2 Fotossíntese

### 3.2.1 Trocas gasosas

Nas figuras 13, 14 e 15 estão representadas as trocas gasosas medidas nas duas variedades de oliveira, expostas aos diferentes tratamentos. A resposta da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (P<sub>N</sub>) foi distinta nas duas variedades (Figura 13). Na Arbequina, apenas se verificou um efeito significativo do fator rega (Figura 13A). As oliveiras bem regadas (C e B) apresentaram uma taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> superior às tratadas com rega deficitária (S e BS). Já na Galega, para além do efeito significativo do fator rega e do fator bioestimulante, também se verificou uma interação entre os dois fatores (Figura 13B). Para os tratamentos da rega deficitária, o bioestimulante (BS) aumentou a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> em relação ao tratamento sem bioestimulante (S).

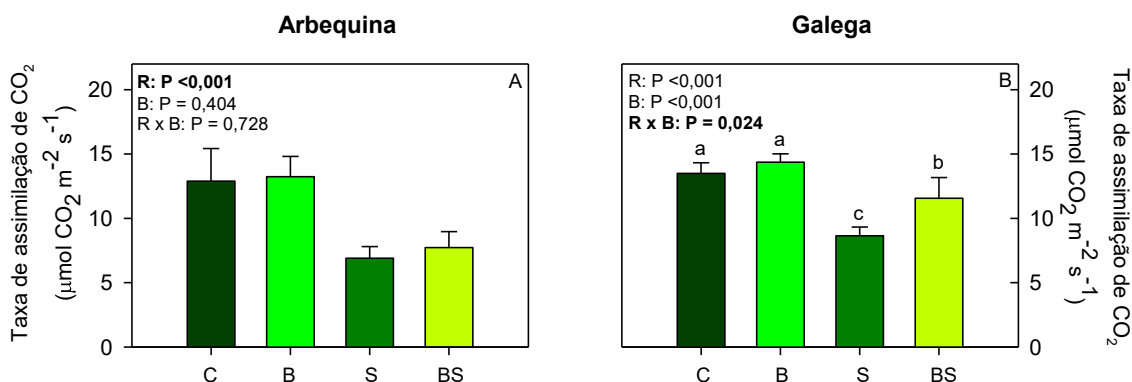


Figura 13 - Taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (P<sub>N</sub>) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

A resposta da condutância estomática ( $g_s$ ), que se encontra na figura 14, foi semelhante à da P<sub>N</sub>. Na Arbequina observou-se apenas o efeito do fator rega (Figura 14A), em que as plantas com 100% CC (C e B) apresentaram valores de  $g_s$  mais elevados que as plantas com 50% CC (S e BS). Na Galega houve uma interação dos dois fatores (Figura 14B), com o tratamento de rega deficitária (S) a apresentar os valores mais baixo de  $g_s$ .

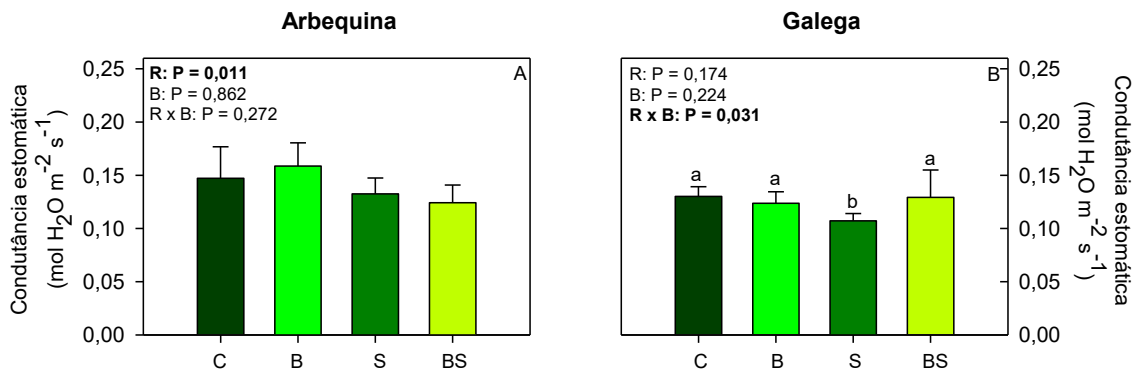


Figura 14 – Condutância estomática (g<sub>s</sub>) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

O rácio da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> e da concentração extracelular de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>) teve uma resposta semelhante nas duas variedades (Figura 15). Para além de cada um dos fatores, individualmente, afetar os resultados, houve interação entre a rega e o bioestimulante. Nas oliveiras com rega deficitária, o tratamento sem bioestimulante (S) promoveu o aumento de C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>. Para a Galega ainda se observou que em condições de rega deficitária, o tratamento com bioestimulante (BS) obteve um C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> inferior ao sem bioestimulante (S), mas ainda superior ao das plantas bem regadas (C e B) (Figura 15B).

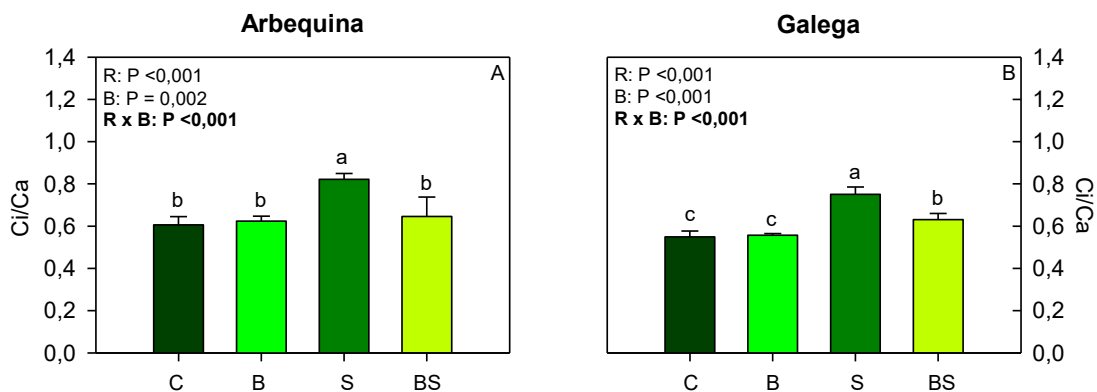


Figura 15 – Rácio entre a concentração de CO<sub>2</sub> intercelular e extracelular nas folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.2.2 Eficiência do uso intrínseco da água

As duas variedades respondem de forma diferente relativamente à eficiência intrínseca do uso da água (EIUA), como vemos na figura 16. No caso da Arbequina há



uma interação entre os fatores rega e bioestimulante (Figura 16A), onde o bioestimulante, em condições de rega deficitária (BS), incrementa a EIUA nas oliveiras. Na Galega, há o efeito de cada um dos fatores separadamente (Figura 16B). A EIUA é superior nas plantas bem regadas (C e B) relativamente às de seca (S e BS), para o fator rega. O bioestimulante promove a EIUA (B e BS).

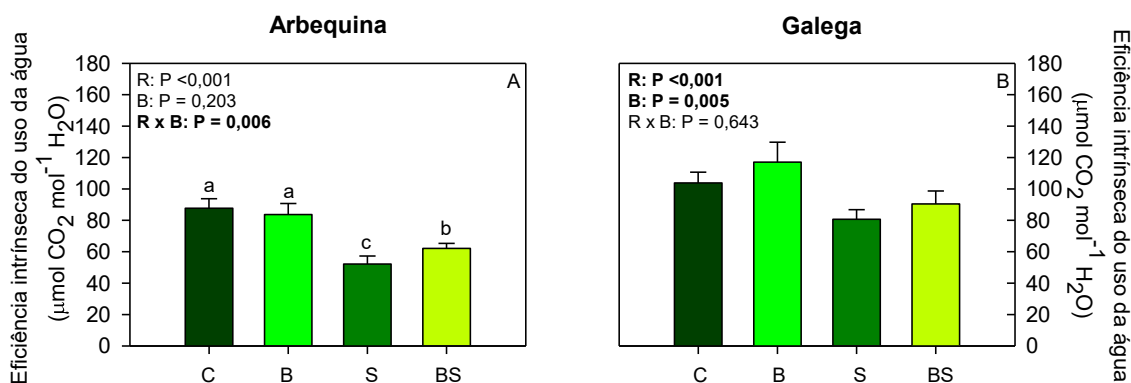


Figura 16 – Eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.2.3 Fluorescência da clorofila *a*

A eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) só é afetada na variedade Arbequina (Figura 17A), pelo fator rega. As plantas bem regadas (C e B) possuem valores superiores de  $F_v/F_m$  comparativamente com as de rega deficitária (S e BS).

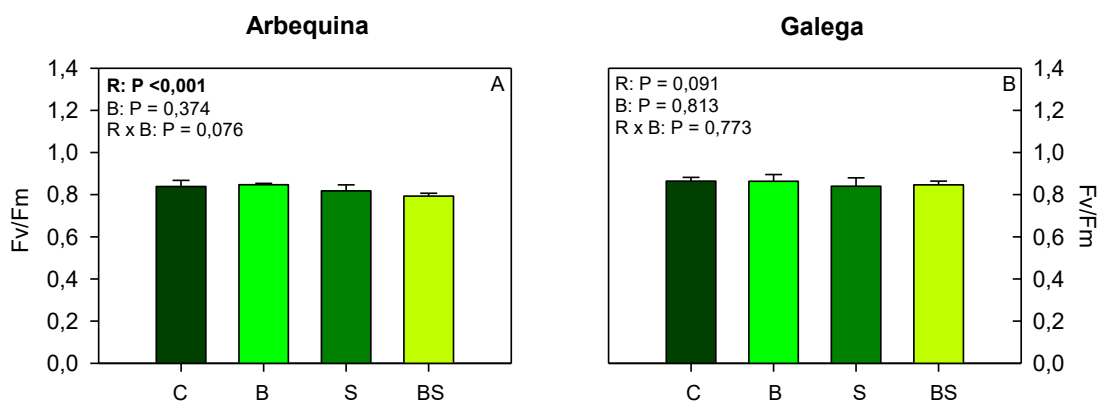


Figura 17 – Eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

As duas variedades apresentam uma resposta semelhante na eficiência efetiva do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ). Para além de as plantas bem regadas apresentarem valores mais elevados de  $\Phi_{PSII}$  que as plantas de rega deficitária, há uma interação entre rega e bioestimulante. A aplicação de bioestimulante conjuntamente com a rega deficitária (BS) aumenta a  $\Phi_{PSII}$  relativamente à não aplicação de bioestimulante em plantas com rega deficitária (S) (Figura 18A), e no caso da Galega, o tratamento com bioestimulante e rega deficitária (BS) apresenta uma  $\Phi_{PSII}$  semelhante ao das plantas bem regadas (C e B) (Figura 18B).

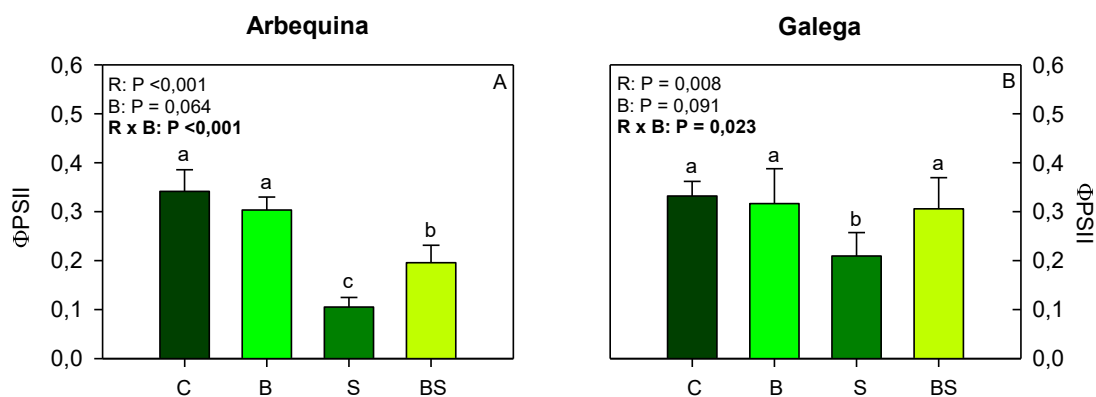


Figura 18 – Eficiência efetiva do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A) e da variedade Galega (B). Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.3 Pigmentos

A resposta dos pigmentos fotossintéticos nas duas variedades de oliveiras foi diferente (Figura 19). Para a variedade Arbequina, tanto a clorofila *a* como a *b* apresentaram apenas um efeito significativo do fator rega (Figuras 19A e 19C). As oliveiras bem regadas (C e B) apresentaram um conteúdo de clorofila *a* e *b* superior às oliveiras tratadas com rega deficitária (S e BS). Já no caso dos carotenoides, verificou-se uma interação entre a rega e o bioestimulante (Figura 19E). A perda do conteúdo de carotenoides foi superior entre as plantas de rega deficitária sem bioestimulante (S) e rega deficitária com bioestimulante (BS) do que nos tratamentos de rega sem bioestimulante (C) e rega com bioestimulante (B). Para a variedade Galega, há uma interação entre o fator rega e o fator bioestimulante no conteúdo em clorofilas das folhas de oliveira (Figuras 19B e 19D). Observa-se a diminuição significativa do teor em clorofilas *a* e *b* apenas quando são aplicados os dois tratamentos, rega deficitária e bioestimulante (BS). Quanto aos carotenoides, nesta variedade, não foram significativamente afetados por nenhum dos tratamentos (Figura 19F).

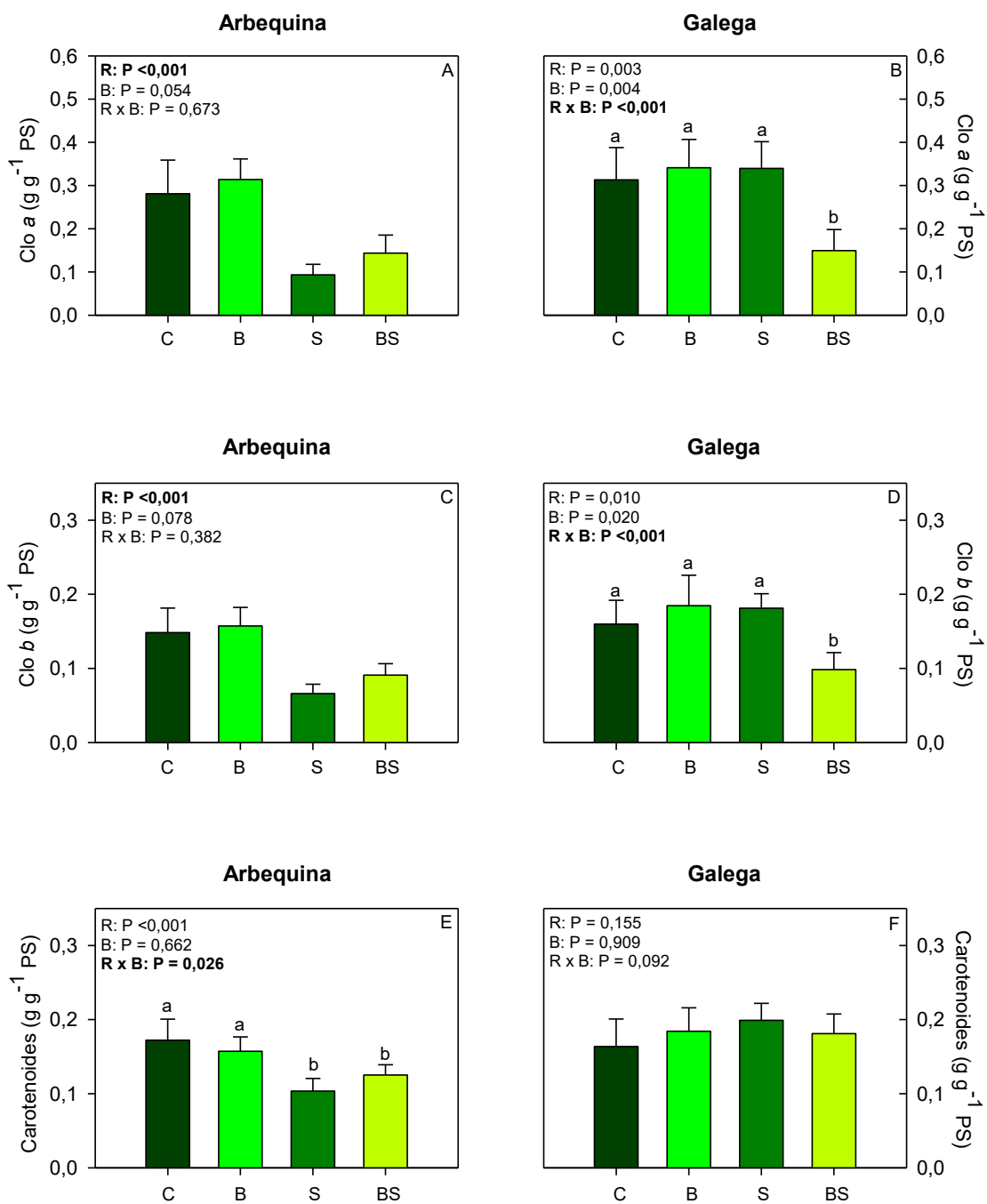


Figura 19 – Teor em pigmentos das folhas de oliveira da variedade Arbequina (A, C e E) e da variedade Galega (B, D e F). Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.4 Metabolómica

#### 3.4.1 Compostos lipofílicos

A análise dos cromatogramas obtidos por GC-MS permitiram a identificação de 31 compostos nos extratos das folhas das duas variedades de oliveira. A figura 20 apresenta um exemplo de cromatograma obtido com a variedade Arbequina.

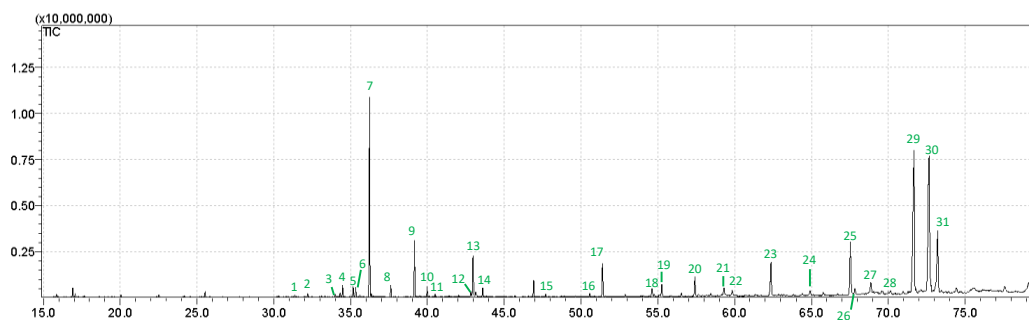


Figura 20 – Exemplo de cromatograma obtido por GC-MS para o perfil lipofílico na variedade Arbequina, tratamento B, réplica 1. Legenda dos números de cor verde: 1- D-eritrose, 2- D(-)-tagatofuranose, 3- neofitadieno, 4 – ácido quinico, 5 – gluconolactona, 6-  $\beta$ -D-glucopirranose, 7 – D-manitol, 8 - D-(+)-galactopirranose, 9 – ácido palmítico, 10 – mio-inositol, 11 - D-(+)-turanose, 12 – ácido linoleico, 13 – ácido oleico, 14 – ácido esteárico, 15 – ácido eicosanóico, 16 – 1-monopalmitina, 17 – sacarose, 18 – glicerol, 19 – esqualeno, 20 – alcano 1, 21 – esculina, 22 – alcano 2, 23 – alcano 3, 24 – alcano 4, 25 – alcano 5, 26 -  $\beta$ -amirina, 27 -  $\alpha$ -amirina, 28 – alcano 6, 29 - olean-12-ene-3,28-diol, 30 - Derivado de Lup-20(29)-en-28-al, 31 – ácido ursólico.

##### 3.4.1.1 Polióis e açúcares

Na variedade Galega, foram identificados vários polióis e açúcares, D-eritrose, D-manitol, mio-inositol, glicerol, D(-)-tagatofuranose, gluconolactona,  $\beta$ -D-glucopirranose, D-(+)-galactopirranose, D-(+)-turanose e a sacarose (Figura 21). Contudo, a D-eritrose, o D-manitol e o mio-inositol não foram encontrados no tratamento de rega deficitária (S). O nível de D-eritrose encontrado nas folhas do tratamento BS foi significativamente superior ao dos tratamentos C e B (Figura 21A). O nível de D-manitol nas folhas do controlo (C) foi semelhante ao dos tratamentos B e BS, mas as folhas do tratamento B apresentaram mais D-manitol do que as folhas do tratamento BS. O maior nível de mio-inositol foi registado nas folhas do tratamento B. Já o nível de glicerol foi semelhante nas folhas de oliveiras dos quatro tratamentos (Figura 21A). Os níveis de D(-)-tagatofuranose não foram afetados por nenhum dos tratamentos, mas esta não foi detetada nas folhas do tratamento de rega deficitária (S) (Figura 21B). A gluconolactona e a sacarose foram apenas afetadas pelo efeito da rega (Figura 21B). As folhas das oliveiras dos tratamentos de rega deficitária (S e BS) apresentaram um nível de gluconolactona superior às dos bem

regados (C e B). Já os níveis de sacarose foram superiores nos grupos bem regados (C e B). A  $\beta$ -D-glucopiranosose, a D-(+)-galactopiranosose e a D-(+)-turanose não foram detetadas nas folhas dos tratamentos de rega deficitária (Figura 20B). A  $\beta$ -D-glucopiranosose e a D-(+)-galactopiranosose responderam de uma forma semelhante, apresentando o maior nível nas folhas das plantas bem regadas com aplicação de bioestimulante (B) e o menor nível na rega deficitária com bioestimulante (BS). O nível mais elevado de D-(+)-turanose foi observado nas folhas das plantas do tratamento BS.

Na variedade Arbequina, apenas o fator rega influenciou o nível dos polióis D-manitol, mio-inositol e glicerol (Figura 22A). O maior nível de D-manitol e de mio-inositol foi observado nas folhas das plantas bem regadas (C e B), e o de glicerol foi observado nas folhas das plantas em rega deficitária (S e BS) (Figura 22A). A D-eritrose não foi detetada no tratamento S (Figura 22A). Os açúcares, D-(-)-tagatofuranose, gluconolactona e D-(+)-turanose não foram detetados no tratamento S, e as folhas de Arbequina do tratamento BS apresentaram níveis destes açúcares superiores aos do C (Figura 22B). A  $\beta$ -D-glucopiranosose e a D-(+)-galactopiranosose, também não foram detetadas no tratamento S. No caso da  $\beta$ -D-glucopiranosose o tratamento C apresentou maiores níveis que os tratamentos S e BS. A D-(+)-galactopiranosose não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 22B). Na sacarose registou-se uma interação dos dois fatores (Figura 22B). As plantas tratadas com bioestimulante e bem regadas (B) apresentaram o nível mais elevado de sacarose, enquanto as de rega deficitária (S e BS) apresentaram os níveis mais baixos deste açúcar.

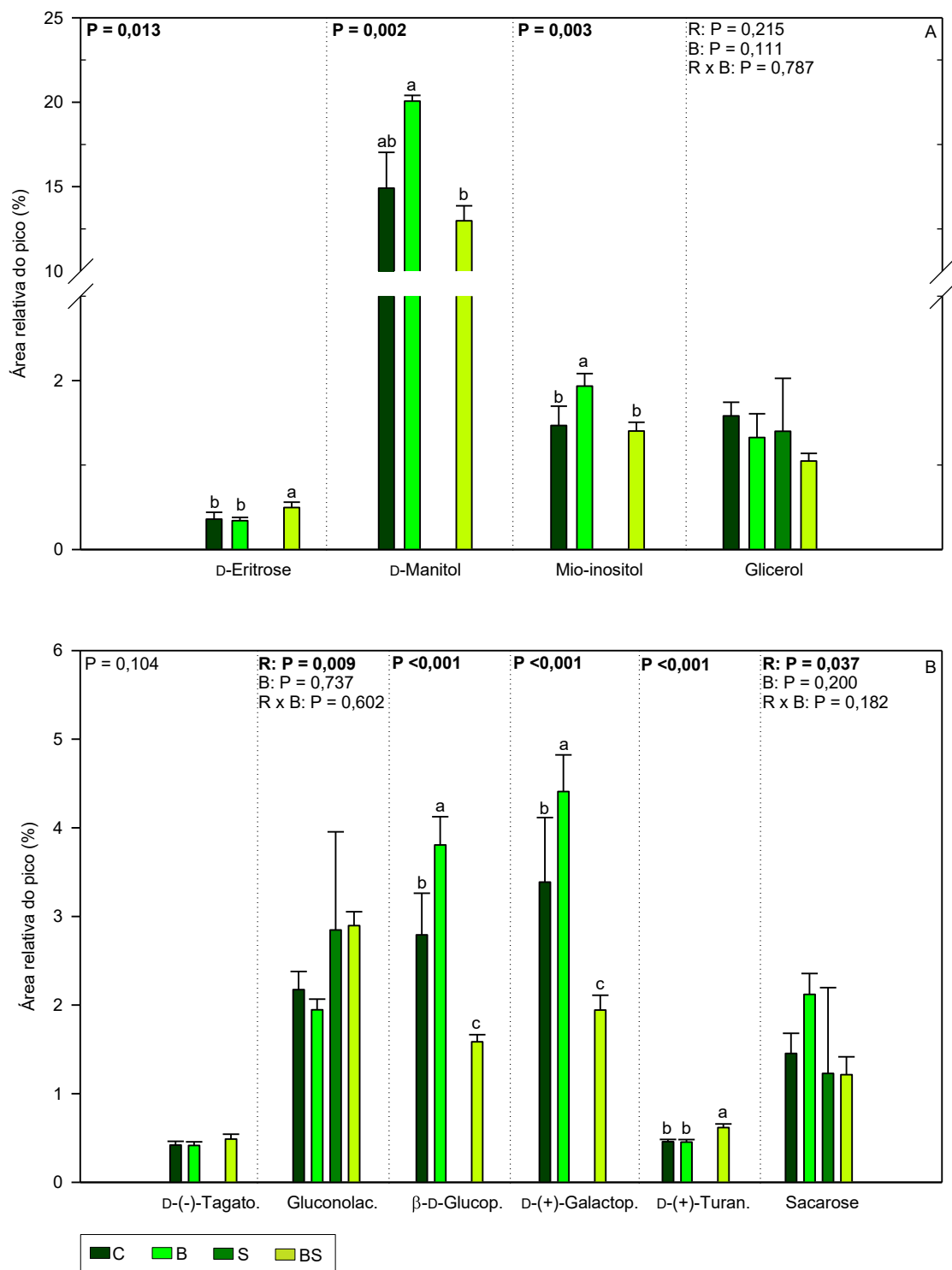


Figura 21 – Polióis e açúcares (A e B) presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: D(-)-Tagato. – D(-)-Tagatofuranose; Gluconolac. – Gluconolactona; β-D-Glucop. - β-D-Glucopirranose; D(+)-Galactop. - D(+)-Galactopirranose; D(+)-Turan. - D(+)-Turranose; C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

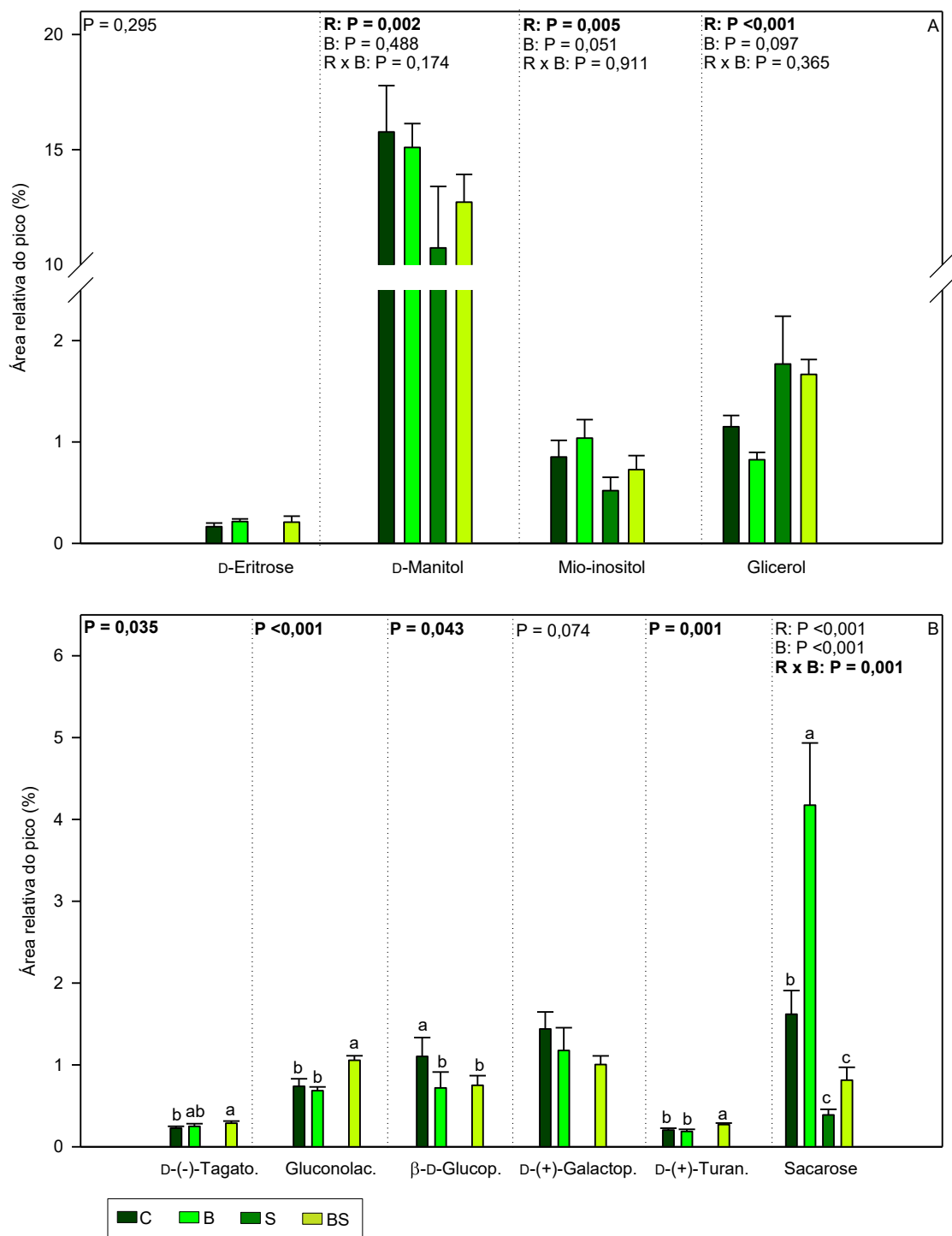


Figura 22 – Polióis e açúcares (A e B) presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: D-(-)-Tagato. – D-(-)-Tagatofuranose; Gluconolac. – Gluconolactona; β-D-Glucop. - β-D-Glucopirranose; D-(+)-Galactop. - D-(+)-Galactopirranose; D-(+)-Turan. - D-(+)-Turannose; C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.4.1.2 Ácidos orgânicos e ésteres

Na variedade Galega, as folhas das plantas tratadas com bioestimulante (B) apresentam um nível de ácido quinico superior ao das do tratamento BS (Figura 23). Este ácido não foi detetado no tratamento de rega deficitária (S). Para o ácido palmítico foi observada uma interação entre o fator rega e o fator bioestimulante (Figura 23). As folhas das plantas do tratamento S apresentaram a maior área relativa do pico, seguida das folhas do tratamento de BS. Para os ácidos linoleico, oleico, esteárico e eicosanóico observou-se um efeito do fator rega e as plantas do tratamento de rega deficitária (S e BS) apresentaram o maior nível destes ácidos (Figura 23). Para a 1-monopalmitina, apenas se registou o efeito da aplicação de bioestimulante, sendo que oliveiras com esse tratamento (B e BS) apresentam valores inferiores deste éster comparativamente com oliveiras sem esse tratamento (C e S) (Figura 23).

No caso da variedade Arbequina (Figura 24), o ácido quinico, apesar de não estar presente nas plantas do tratamento S, não apresentou diferenças estatísticas nos outros tratamentos. No ácido palmítico, foi observado um efeito do fator rega e também do fator bioestimulante. A rega deficitária (S e BS) aumentou o nível de ácido palmítico, e o tratamento com bioestimulante (B e BS) também estimulou a produção deste ácido (Figura 24). Para os ácidos linoleico e esteárico, e para a monopalmitina observou-se uma interação entre o fator rega e bioestimulante (Figura 24). As folhas das plantas dos tratamentos BS apresentaram o nível mais elevado destes compostos. Apenas o fator rega influenciou a quantidade de ácido oleico, sendo que plantas em rega deficitária (S e BS) apresentam valores superiores ao das plantas bem regadas (C e B) (Figura 24). Os níveis de ácido eicosanóico não foram influenciados por nenhum dos fatores (Figura 24).



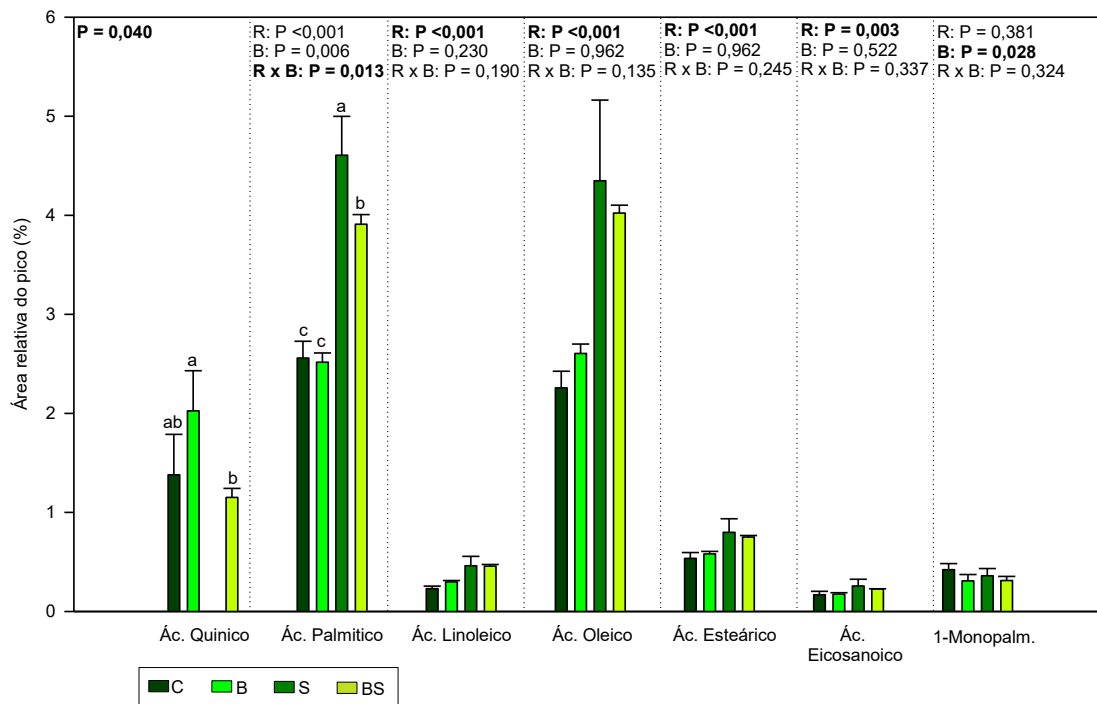


Figura 23 – Ácidos orgânicos e éster presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: Ác. – ácido; 1-Monopalm. – 1-Monopalmitina; C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

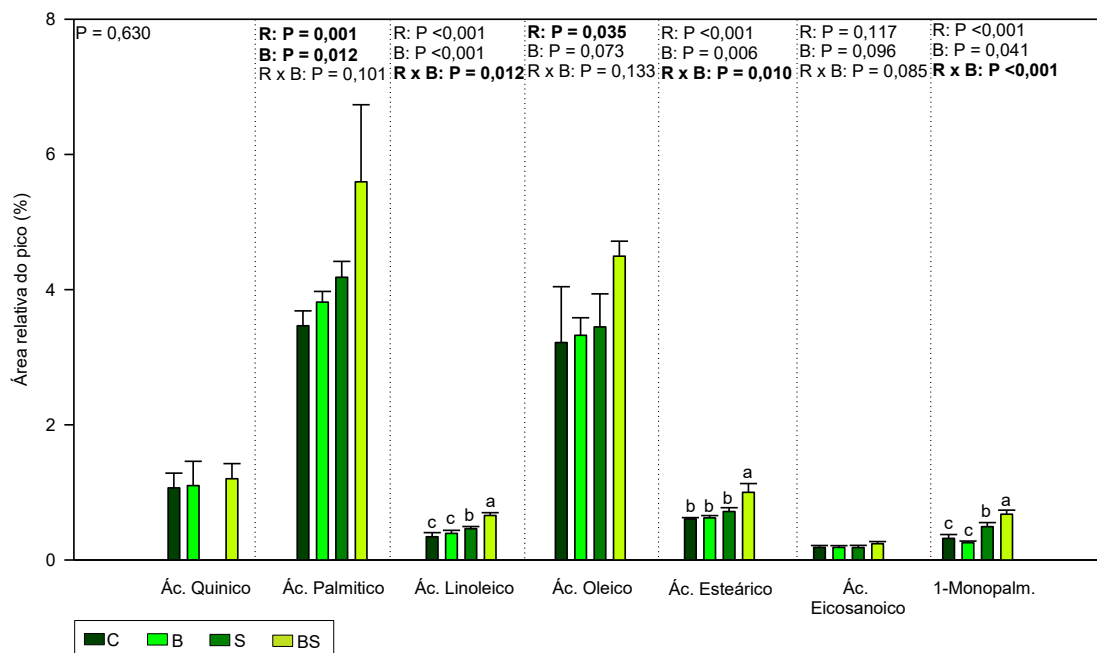


Figura 24 – Ácidos orgânicos e éster presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: Ác. – ácido; 1-Monopalm. – 1-Monopalmitina; C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.4.1.3 Alcanos de cadeia longa, terpenos e cumarinas

Foram detetados seis alcanos de cadeia longa em ambas as variedades de oliveira (Figuras 25 e 26). Na Galega, para os alcanos 1 e 5, observou-se uma interação entre o fator rega e bioestimulante (Figura 25). Os níveis mais elevados do alcano 1 foram registados nas folhas dos tratamentos B e S, e para o alcano 5 foi no tratamento S. Para os alcanos 2 e 4, não se observaram diferenças significativas entre tratamentos (Figura 25). Nos alcanos 3 e 6 observou-se um efeito do fator rega (Figura 25), sendo que as oliveiras em que foi aplicado o tratamento de rega deficitária (S e BS) apresentaram um nível superior ao das do tratamento de rega (C e B).

Na variedade Arbequina (Figura 26), foi registada uma interação do fator rega e do fator bioestimulante nos alcanos 1 e 3, ambos se encontraram em maior abundância no tratamento de rega deficitária sem aplicação de bioestimulante (S). Os níveis dos alcanos 2 e 4 nas folhas de oliveira só foram afetados pelo fator bioestimulante e pelo fator rega, respetivamente. Os níveis dos alcanos 5 e 6, onde houve interação de fatores, destacaram-se no tratamento de rega deficitária (S).

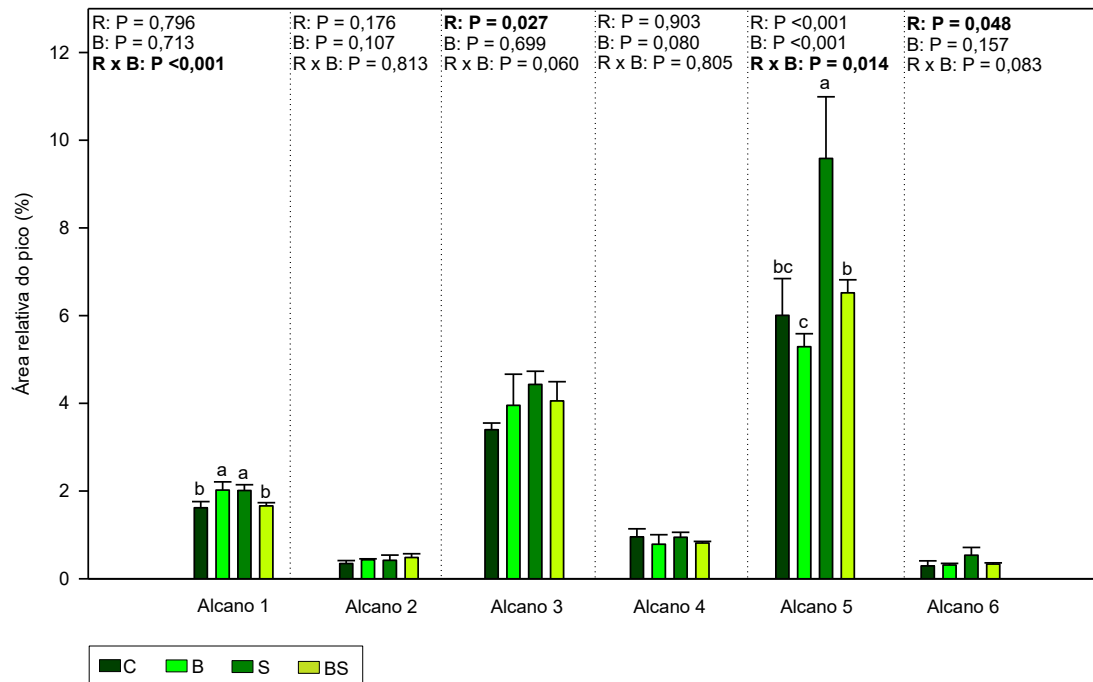


Figura 25 – Alcanos de cadeia longa presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

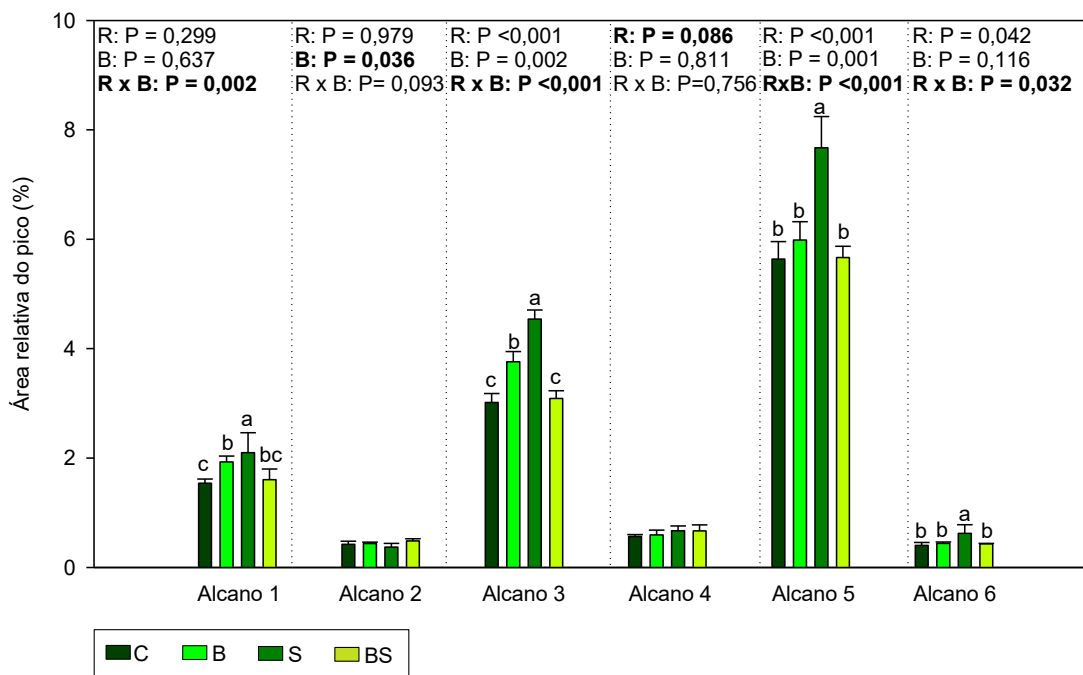


Figura 26 – Alcanos de cadeia longa presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de reg deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com reg deficitária.

Na família dos terpenos, na variedade Galega (Figura 27), o nível de neofitadieno foi afetado apenas pelo fator reg, com o tratamento de reg deficitária (S e BS) a apresentar valores superiores aos de bem regado (C e B). O esqualeno não se encontra presente nas plantas bem regadas (C e B), e não se observaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 27). Para os terpenos  $\beta$ - e  $\alpha$ -amirina, olean-12-ene-3,28-diol e ácido ursólico foi registada um interação entre o fator reg e bioestimulante (Figura 27). As folhas do tratamento S apresentaram os níveis mais elevados destes terpenos. O nível do derivado de lup-20(29)-en-28-al foi afetado por cada um dos fatores individualmente, o tratamento de reg deficitária (S e BS) e o tratamento sem aplicação de bioestimulante (C e S) estimularam a produção deste composto. A esculina não está presente nas folhas das plantas do tratamento S, no entanto maiores quantidades deste composto foram detetadas no tratamento BS (Figura 27).

Na variedade Arbequina (Figura 28), os terpenos neofitadieno, esqualeno, olean-12-ene-3,28-diol e ácido ursólico apresentam uma interação entre o fator reg e o fator bioestimulante. As folhas do tratamento BS apresentam os níveis mais elevados de neofitadieno, enquanto que as folhas do tratamento S mostraram os níveis mais elevados

de olean-12-ene-3,28-diol e de ácido ursólico. Para o esqualeno, é no tratamento com aplicação de bioestimulante (B) que se observaram os níveis mais elevados deste terpeno. A  $\beta$ -amirina foi afetada negativamente pelo fator bioestimulante. A  $\alpha$ -amirina não foi afetada por nenhum dos fatores. O derivado de lup-20(29)-en-28-al, foi afetado por cada um dos fatores individualmente, e apresentou maiores níveis nos tratamentos de rega deficitária (S e BS) e sem aplicação de bioestimulante (C e S). A produção de esculina foi mais elevada nas folhas das oliveiras do tratamento BS. Este composto não foi detetado nas folhas do tratamento S (Figura 28).

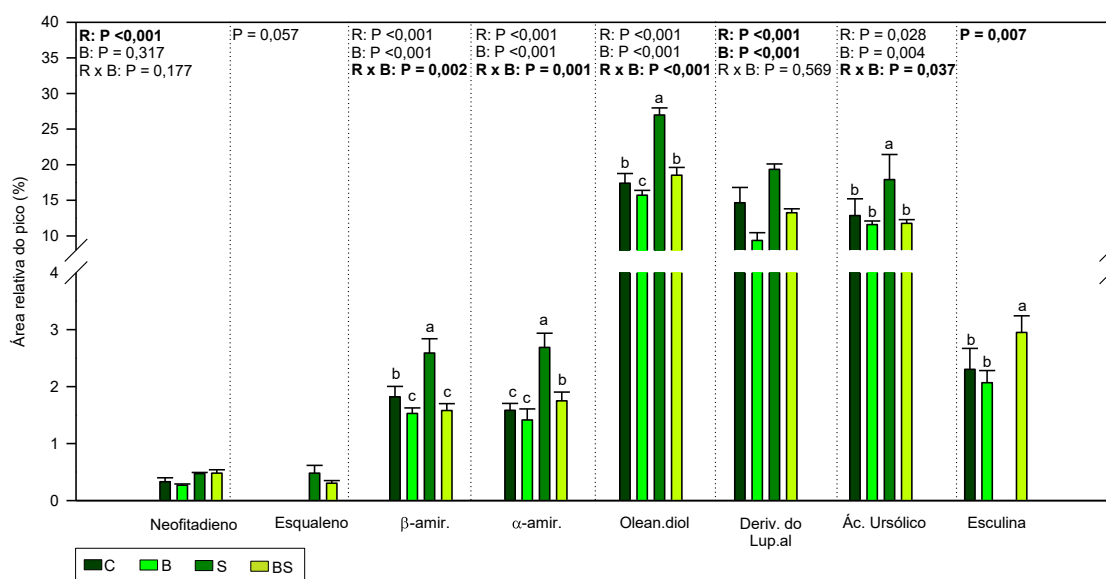


Figura 27 – Terpenos e cumarina presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: amir. – amirina; Olean.diol - Olean-12-ene-3,28-diol; Deriv. Do Lup.al - Derivado de Lup-20(29)-en-28-al, Ác. – ácido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

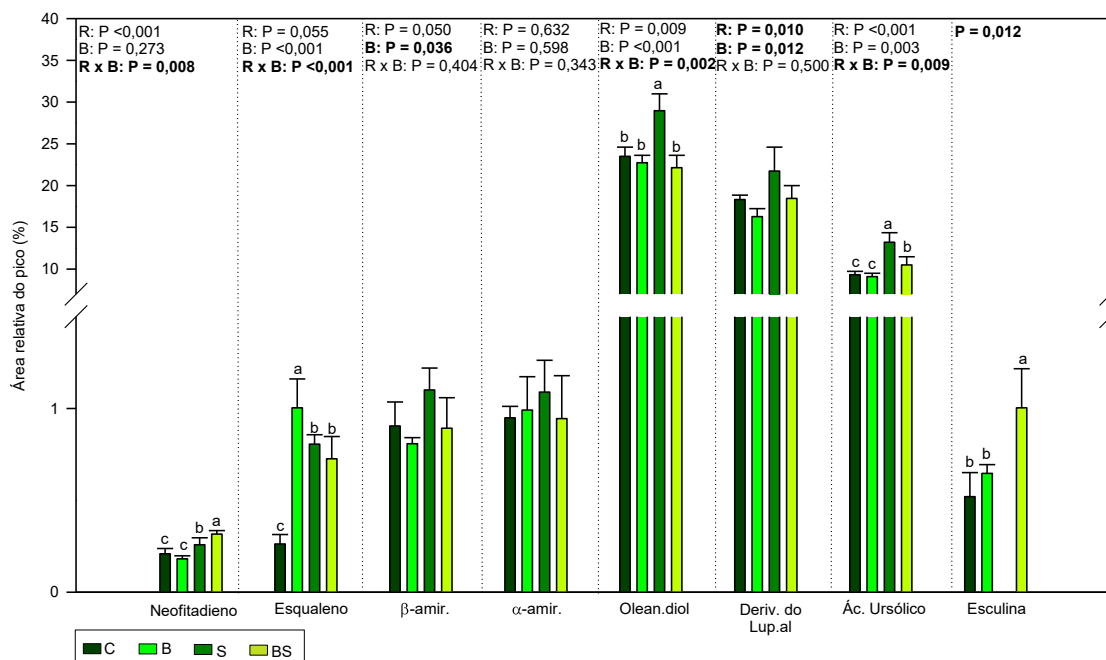


Figura 28 – Terpenos e cumarina presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: amir. – amirina; Olean.diol - Olean-12-ene-3,28-diol; Deriv. Do Lup.al - Derivado de Lup-20(29)-en-28-al, Ác. – ácido, C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.4.2 Compostos fenólicos

A análise dos cromatogramas obtidos por LC-MS permitiram a identificação de 18 compostos nos extratos das folhas da variedade Galega e 22 compostos nas folhas da variedade Arbequina. As figuras 29 e 30 apresentam um exemplo de cromatograma obtido com a variedade Galega e Arbequina, respetivamente.

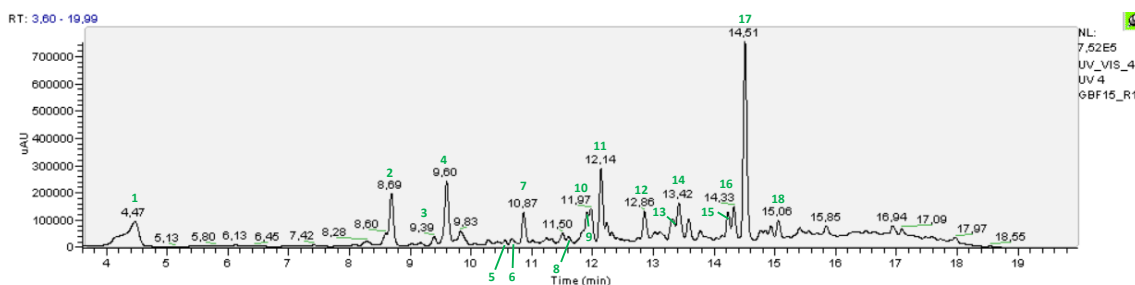


Figura 29 – Cromatograma parcial do perfil fenólico (UHPLC-MS) a 230 nm, modo de ião negativo, folhas da variedade Galega, tratamento B, réplica 1. Legenda dos números de cor verde: 1- isómero de oleósido 1, 2- isómero de oleósido 2, 3- galocatequina, 4 – isómero de glucósido de ácido elenólico 1, 5 – isómero de β-hidroxiverbascósido 1, 6- isómero de β-hidroxiverbascósido 2, 7 – isómero de glucósido de ácido elenólico 2, 8 - rutina, 9 – luteolina-7-O-rutinósido, 10 – 10-hidroxioluropeína, 11 - isómero de glucósido de luteolina 1, 12 – verbascósido, 13 – apigenina-7-glucósido, 14 – isómero de glucósido de luteolina 2, 15 – 2"-metoxiuropeína isómero 1, 16 – 2"-metoxiuropeína

isômero 2, 17 – oleuropeína isômero 1, 18 – oleuropeína isômero 2. Para a quantificação dos compostos foram usados os comprimentos de onda 230 e 330 nm.

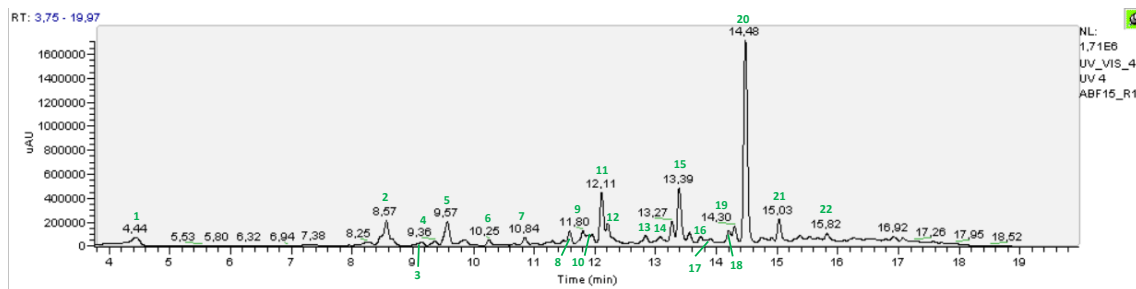


Figura 30 – Cromatograma parcial do perfil fenólico (UHPLC-MS) a 230 nm, modo de ião negativo, folhas da variedade Arbequina, tratamento B, réplica 1. Legenda dos números de cor verde: 1- isômero de oleosídeo 1, 2- luteolina diglicosídeo, 3- glicosídeo de ácido ferúlico, 4 – derivado do ácido ferúlico, 5 – isômero de glicosídeo de ácido elenólico 1, 6- derivado da aglicona de oleuropeína, 7 – isômero de glicosídeo de ácido elenólico 2, 8 - rutina, 9 – luteolina-7-*O*-rutinósido, 10 – 10-hidroxioluropeína, 11 - isômero de glucósido de luteolina 1, 12 – isômero de verbascósido 1, 13 – isômero de verbascósido 2, 14 – oleuropeína diglicosídeo, 15 – isômero de glucósido de luteolina 2, 16 - derivado do ácido cumárico, 17 - isômero de glucósido de luteolina 3, 18 - 2"-metoxioluropeína isômero 1, 19 – 2"-metoxioluropeína isômero 2, 20 – oleuropeína isômero 1, 21 – oleuropeína isômero 2, 22 - luteolina. Para a quantificação dos compostos foram usados os comprimentos de onda 230, 280 e 330 nm.

### 3.4.2.1 Flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico

Na variedade Galega, dentro da família dos flavonoides foram detetados seis compostos (Figura 31). Para a galocatequina, a rutina, a luteolina-7-*O*-rutinósido, e para os isômeros de glucósido de luteolina 1 e 2, foi registada uma interação entre o fator rega e o fator bioestimulante. No caso da galocatequina, as folhas do tratamento S apresentaram os níveis mais elevados deste flavonoide, seguido das folhas do tratamento B. Para a rutina, foi nas folhas do tratamento B onde se registou os menores valores. No caso da luteolina-7-*O*-rutinósido, foi no tratamento BS onde se observaram os níveis mais altos deste composto. Para o isômero de glucósido de luteolina 1, as folhas das plantas de controlo (C) e do tratamento BS mostraram os níveis mais elevados deste flavonoide, e para o isômero de glucósido de luteolina 2 para além destes 2 tratamentos também no tratamento S foi registado um elevado nível deste composto. A apigenina-7-glucósido não está presente no tratamento de rega deficitária (S) e não apresenta diferenças significativas entre os restantes grupos.

Para a variedade Arbequina identificaram-se sete flavonoides (Figura 32). A luteolina diglicosídeo não foi detetada no tratamento BS, e as folhas do tratamento B apresentam um nível mais elevado deste composto em comparação com o controlo (C). Os níveis de rutina foram afetados pelo fator bioestimulante, sendo que plantas sem

bioestimulante (C e S) apresentam maior percentagem deste composto. A luteolina-7-*O*-rutinósido e os isómeros de glucósido de luteolina 1 e 3 não foram afetados pelos tratamentos de rega e bioestimulante. O isómero de glucósido de luteolina 2 apresentou uma interação entre os fatores rega e bioestimulante, sendo os valores mais elevados deste composto encontrados nas folhas das plantas bem regadas (C). Para a luteolina foi observada uma interação entre os dois fatores, rega e bioestimulante. Neste caso as oliveiras do tratamento S apresentaram os maiores níveis de luteolina.

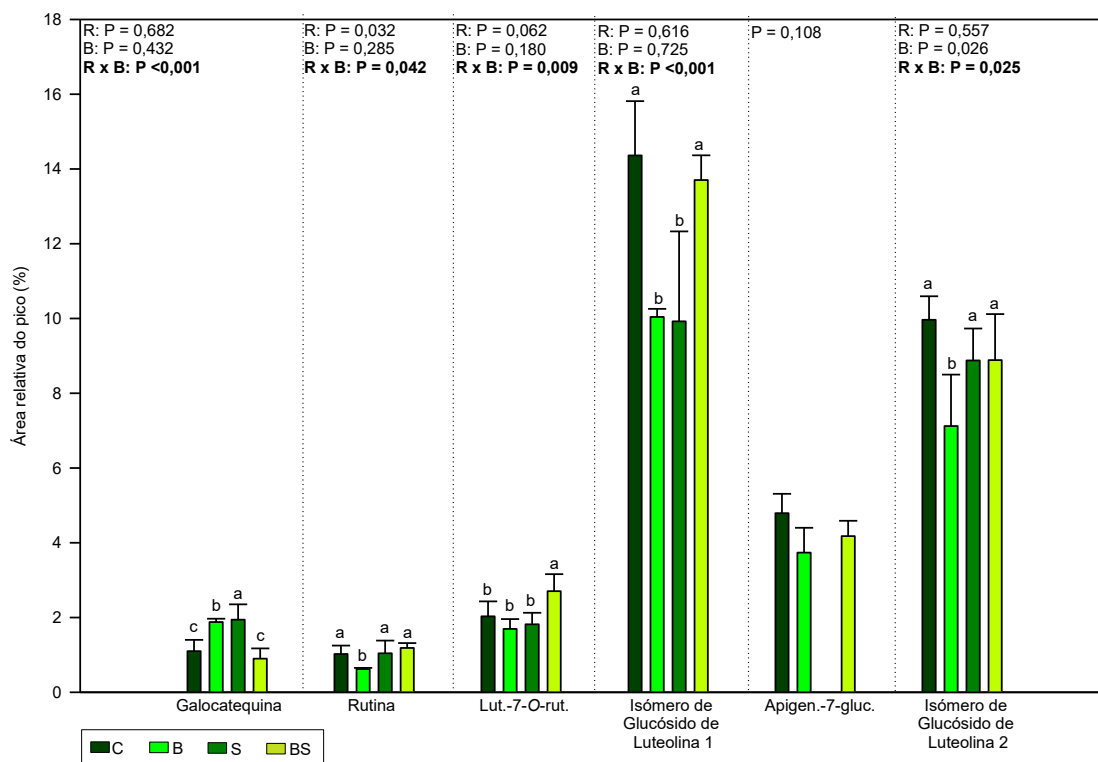


Figura 31 – Flavonoides presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: Lut.-7-*O*-rut. - luteolina-7-*O*-rutinósido, Apigen.-7-gluc. – Apigenina-7-glucósido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

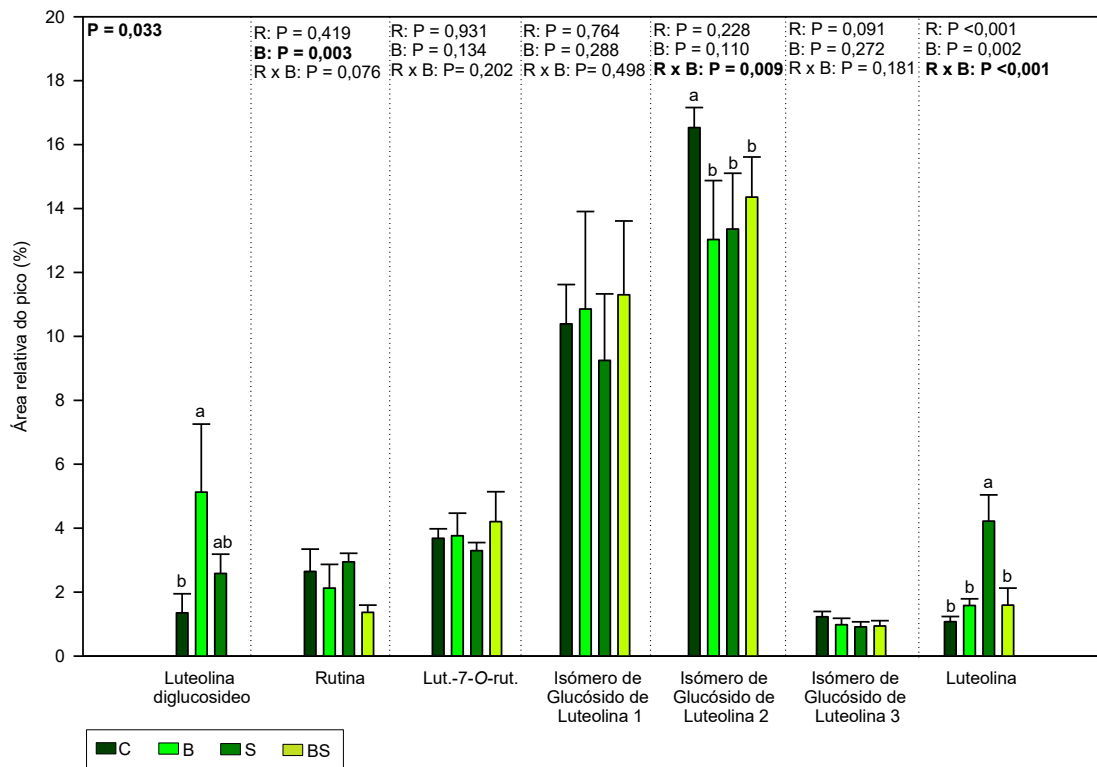


Figura 32 – Flavonoides presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: Lut.-7-O-rut. - luteolína-7-O-rutinósido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

Foram encontrados três derivados do ácido hidroxicinâmico, o verbascósido e os isómeros 1 e 2 de  $\beta$ -hidroxiverbascósido, nas folhas de oliveira da variedade Galega (Figura 33), no entanto nenhum dos níveis destes compostos foram afetados pelos tratamentos de rega e bioestimulante. Na variedade Arbequina, detetaram-se cinco compostos desta família (Figura 34). O glicosídeo de ácido ferúlico só foi afetado pelo fator rega, com as plantas bem regadas (C e B) a apresentarem maior nível deste composto do que as plantas em rega deficitária (S e BS). O derivado do ácido ferúlico e o derivado do ácido cumárico mostraram uma resposta semelhante. Nestes casos, registou-se uma interação dos dois fatores, rega e bioestimulante, com as folhas do controlo (C) e do tratamento BS a apresentarem os níveis mais altos destes compostos. No isómero de verbascósido 1 também se observou uma interação entre o fator rega e bioestimulante, com as folhas do tratamento BS a mostrarem os níveis mais elevados deste composto. Para o isómero de verbascósido 2 observou-se apenas um efeito do bioestimulante, sendo as folhas do tratamento sem bioestimulante (C e S) mais ricas neste composto.



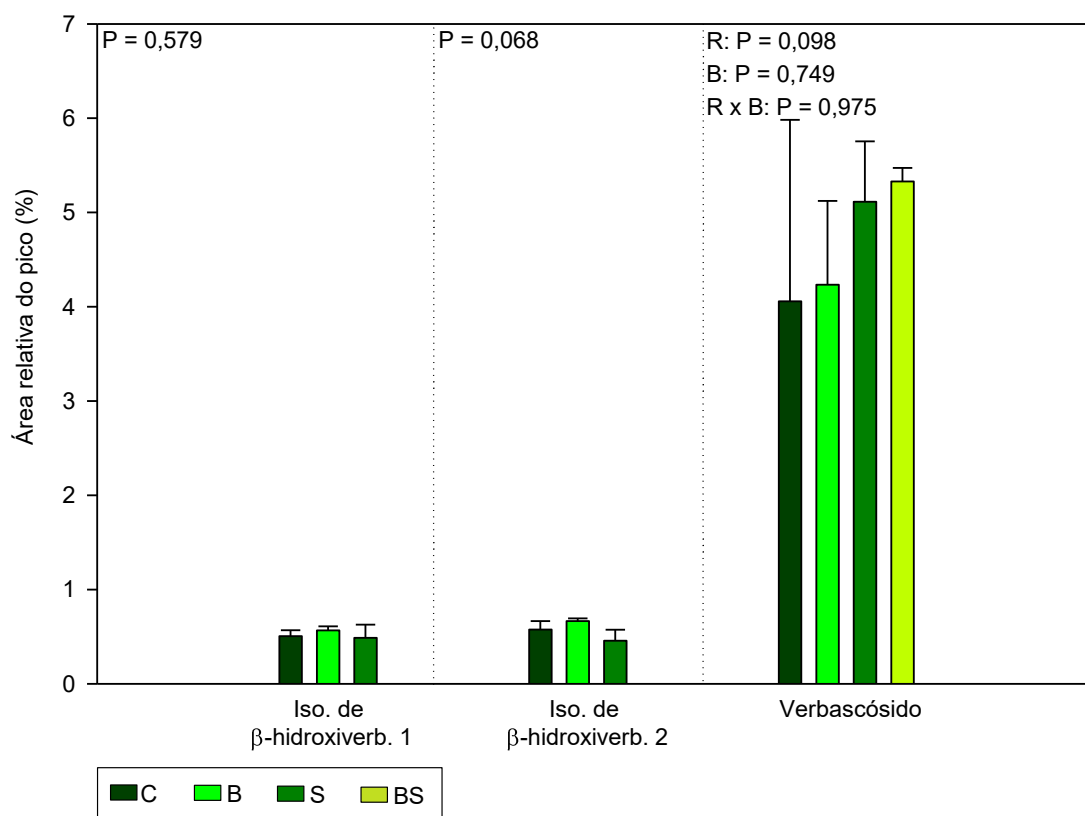


Figura 33 – Derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: Iso. – Isômero, β-hidroxi verb. - β-hidroxi verbascósido, C – controle; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

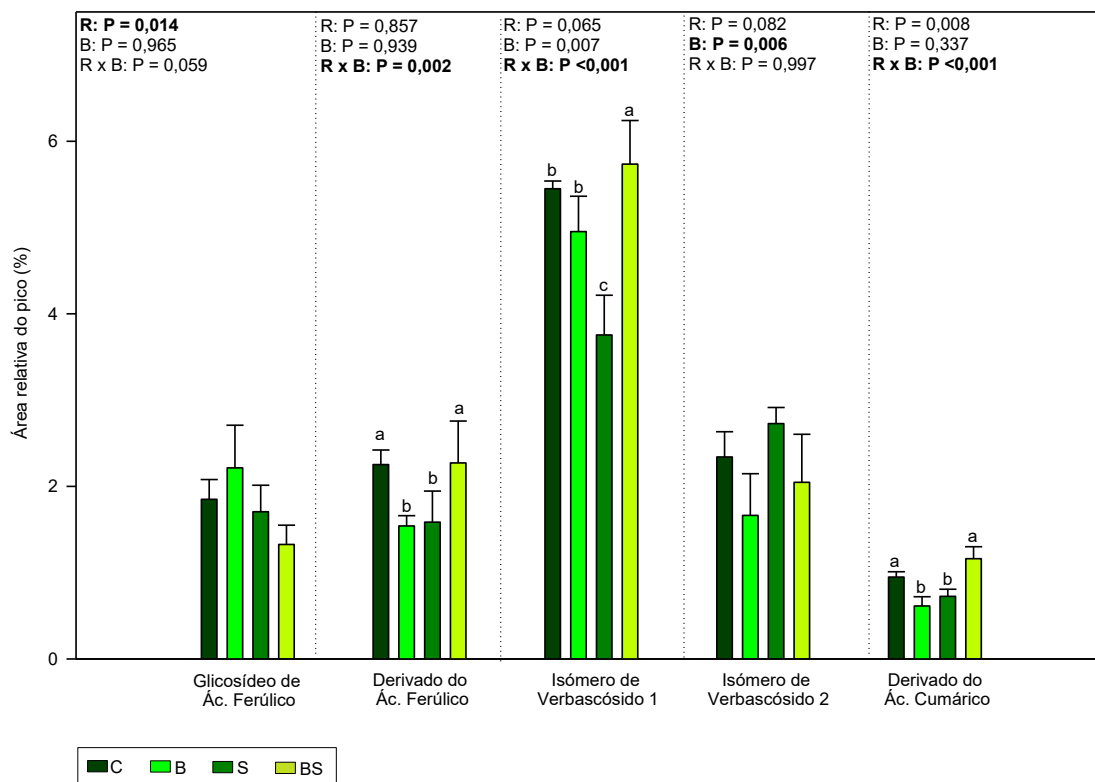


Figura 34 – Derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas folhas de oliveira da variedade Arbequina. Legenda: Ác. - ácido, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.

### 3.4.2.2 Secoiridoides

Nas folhas da Galega identificaram-se nove secoiridoides (Figura 35), e em todos eles se verificou uma interação entre os fatores rega e bioestimulante. Para os isómeros de oleósido 1 e 2, e para o isómero de glucosídeo de ácido elenólico 1, os níveis mais elevados destes compostos foram observados nas folhas do tratamento bem regado com bioestimulante (B) (Figura 35A). Para o caso do isómero de glucosídeo de ácido elenólico 2, tanto as folhas das plantas controlo (C) como as dos tratamentos B e S apresentaram os níveis mais elevados. Para os secoiridoides 10-hidroxioluropeína, e 2''-metoxioluropeína isómero 1 e 2, as folhas das plantas do tratamento BS apresentam os níveis mais elevados destes compostos (Figura 35B). As folhas das plantas do tratamento S apresentaram um nível do isómero 1 de oluropeína superior ao tratamento BS. Já para o isómero 2 de oluropeína, o nível mais elevado foi detetado nas folhas do tratamento bem regado com bioestimulante (B).

Na variedade Arbequina foram encontrados mais secoiridoides do que na Galega, dez no total (Figura 36). Os secoiridoides isómero de oleósido 1, isómero de glucosídeo de ácido elenólico 1 e oluropeína isómero 2 não foram afetados pelos tratamentos de rega e bioestimulante. Para o derivado da aglicona de oluropeína e para o isómero de glucosídeo de ácido elenólico 2, foram observadas interações entre o fator rega e bioestimulante (Figura 36A). Para o primeiro composto, as folhas das plantas controlo (C) e do tratamento S apresentaram um nível deste composto superior ao do tratamento B. Para o caso do segundo composto, as folhas das plantas controlo (C) e dos tratamentos B e S mostraram níveis superiores ao do tratamento BS. O secoiridoide 10-hidroxioluropeína não foi detetado em plantas do tratamento BS, no entanto aparece em maior quantidade nas plantas do tratamento S (Figura 36B). Os compostos oluropeína diglucosídeo e oluropeína isómero 1 foram afetados apenas pelo fator bioestimulante (Figura 36B). No primeiro secoiridoide, a aplicação de bioestimulante (B e BS) diminuiu a produção deste composto, e o contrário acontece no segundo secoiridoide. O secoiridoide 2''-metoxioluropeína isómero 1 só foi afetado pelo fator rega, e as plantas do tratamento de rega deficitária (S e BS) mostraram níveis superiores deste composto. Por último, a 2''-metoxioluropeína isómero 2 foi afetada pelos dois tratamentos

separadamente (Figura 36B), com o tratamento de rega deficitária (S e BS) e o bioestimulante (B e BS) a estimularem a produção deste composto.

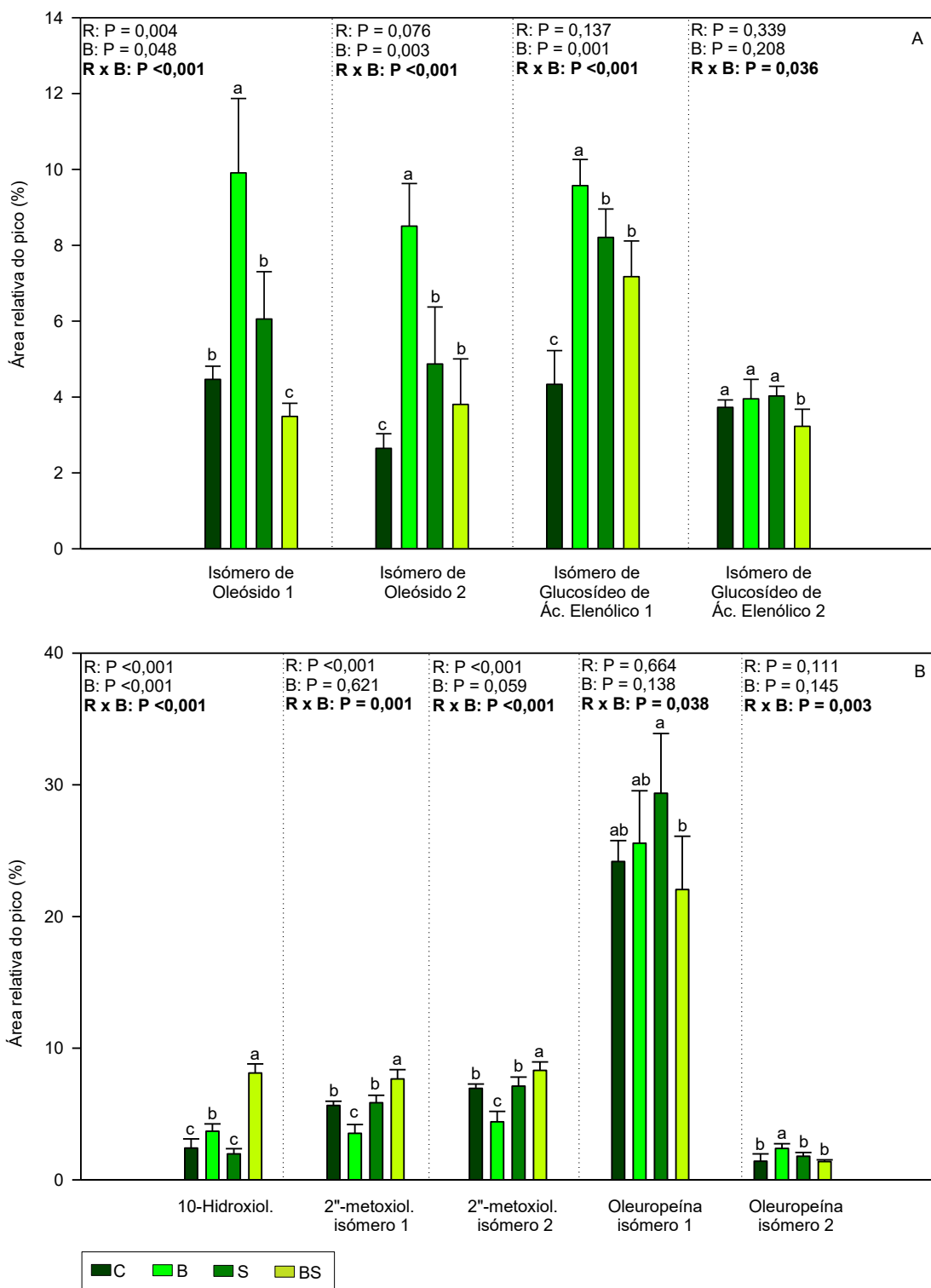


Figura 35 – Secoiridoides (A e B) presentes nas folhas de oliveira da variedade Galega. Legenda: Ác. – ácido, 10-Hidroxiol. – 10-Hidroxioléuropeína, 2''-metoxiol. – 2''-metoxioléuropeína, C – controlo; B – aplicação de bioestimulante; S – aplicação de rega deficitária; BS – aplicação de bioestimulante com rega deficitária.



## 4. Discussão

### 4.1 Perfil de metabolitos e resposta da oliveira ao tratamento de bioestimulante em condições de rega normal – 100% de capacidade de campo

Os perfis lipofílico e fenólico da variedade Galega são semelhantes aos reportados por outros autores. Dias *et al.* (2018b, 2020b), identificou 24 compostos lipofílicos e 15 fenólicos em folhas de oliveira da variedade Galega. As principais diferenças no perfil lipofílico são ao nível dos açúcares e polióis, onde Dias *et al.* (2018b) detetou sorbitol, um isómero do manitol, D-glucose, galactinol, esteróis, e um derivado do ácido oleico, a oleamida, presente em grandes quantidades nas folhas. Contudo, no presente trabalho foi possível identificar mais ácidos gordos, ésteres, terpenos (ex.: neofitadieno e esqualeno) e a esculina quando comparado com os dados de Dias *et al.* (2018b). Quanto ao perfil fenólico desta variedade, Dias *et al.* (2020b) não identificou os isómeros de oleósido nem de glucosídeo de ácido elenólico (secoiridoides), e o único flavonoide em comum é a apigenina-7-glucósido.

Para a variedade Arbequina, Guinda *et al.* (2015) identificaram nos açúcares e polióis a sacarose, a glucose e o manitol como compostos maioritários, e ainda o mio-inositol e o glicerol em menores quantidades. No grupo dos terpenos, em ambos os trabalhos publicados por Guinda *et al.* (2015) e Huang *et al.* (2017), foi identificado o ácido ursólico em concentrações que variavam entre 6-9%. Huang *et al.* (2017) também detetaram grandes quantidades de ácido ursólico nas folhas de oliveira da variedade Arbequina, e triterpenóides como o ácido oleanólico e o eritrodiol. Quanto aos ácidos orgânicos presentes nas folhas da variedade Arbequina, Cavalheiro *et al.* (2014) reportaram um perfil semelhante ao encontrado neste trabalho, com exceção do ácido eicosanóico. Estes autores, detetaram ainda alguns compostos não identificados neste estudo, como o ácido mirístico e o ácido araquídico. O perfil fenólico identificado neste trabalho é semelhante ao apresentado por Talhaoui *et al.* (2014), para a mesma variedade. O perfil de flavonoides e os secoiridoides é idêntico, exceto para o composto 10-hidroxioluropeína, que não foi identificado por Talhaoui *et al.* (2014), e para o glicosídeo de tirosol que não foi identificado neste ensaio. Ao nível dos derivados do ácido hidroxicinâmico o perfil de compostos é muito diferente, sendo o verbascósido o único composto comum em ambos os trabalhos.

As diferenças entre o perfil lipofílico e fenólico obtido neste trabalho e o reportado na literatura podem estar relacionadas com diferentes fatores, tais como a idade e

variedade das oliveiras, condições de crescimento e estado fenológico das plantas. Também as condições de recolha e processamento das folhas, solvente usado e condições de extração de metabolitos (ex.: temperatura e duração da extração) podem afetar o perfil final de compostos.

A aplicação do bioestimulante em condições de rega (100% da capacidade de campo) não alterou o teor relativo em água (TRA) das folhas das oliveiras. Já a avaliação dos danos oxidativos revelou que, a aplicação do bioestimulante, de modo geral, levou a uma tendência para o aumento da permeabilidade da membrana (PM), mas sem efeitos negativos no nível de pigmentos e nos parâmetros fotossintéticos. Na variedade Galega, a aplicação do bioestimulante (B) até promoveu a eficiência intrínseca do uso da água (EIUA), parâmetro que se refere à relação entre a taxa de assimilação do CO<sub>2</sub> (P<sub>N</sub>) e a condutância estomática (g<sub>s</sub>). Alguns açúcares como a β-D-glucopiranose e a D-(+)-galactopirranose na galega e a sacarose na Arbequina aumentaram com a aplicação de bioestimulante (B). Para além disso, este elevado nível de permeabilidade de membrana foi acompanhado por um aumento da produção de alguns compostos, por exemplo os secoiridoides isómeros de oleósido 1 e 2, o isómero de glucosídeo de ácido elenólico 1 e o poliól mio-inositol na variedade Galega, o terpeno esqualeno e o flavonoide luteolina diglucosídeo na variedade Arbequina, com capacidade para promover o crescimento e de atuar ao nível do controlo dos danos oxidativos (Dias *et al.* 2020c). O mio-inositol para além de ser um composto muito importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, é a base de inúmeros sinalizadores celulares e mensageiros secundários (Loewus and Murthy, 2000). Este composto está envolvido em vários processos tais como a biossíntese da parede celular, o transporte e armazenamento de auxinas, e a produção de moléculas relacionadas com o stress (osmólitos) (Styer, 2000). Já o esqualeno e os derivados da luteolina são compostos com propriedades antioxidantes, atuando no controlo dos ROS (Popa *et al.* 2015).

#### **4.2 Perfil de metabolitos e resposta da oliveira à aplicação de bioestimulante e rega deficitária – 50% de capacidade de campo**

Neste trabalho, oliveiras com cerca de 17 meses tratadas com ou sem bioestimulante foram sujeitas a um regime de rega deficitária durante 69 dias. De modo geral, e apesar da variedade Galega ser descrita como muito tolerante a stresses/seca (Barranco *et al.*, 2008) e a variedade Arbequina, originária de climas mais temperados,

apresentar menor tolerância a stresses (Bacelar *et al.*, 2004; Pierantozzi *et al.*, 2013; Trentacoste *et al.*, 2018), a resposta fisiológica destas variedades, apenas à rega deficitária (S), foi semelhante.

Depois deste período de rega reduzida a 50% da capacidade de campo, as oliveiras, tanto da variedade Galega como da Arbequina, não mostraram alterações ao nível do estado hídrico, mantendo um teor relativo em água (TRA) nas folhas semelhante ao das plantas bem regadas. A oliveira é uma espécie muito tolerante à seca (Brito *et al.*, 2019). Alguns dos principais mecanismos responsáveis por esta tolerância são a elevada capacidade de controlo estomático (consegue manter uma abertura estomática muito baixa de modo a preservar um nível hídrico suficiente para continuar a atividade fotossintética) e o ajustamento osmótico (acumulação de solutos como por exemplo os polióis (ex.: manitol), açúcares e alguns aminoácidos (ex.: prolina), que decrescem o potencial osmótico e permitem à oliveira continuar a extração de água do solo) (Fernández, 2014; Silva *et al.* 2018; Brito *et al.* 2019; Freitas de Vasconcelos e Chaves, 2019).

A análise da condutância estomática ( $g_s$ ), parâmetro que dá uma indicação da abertura dos estomas, revelou que para a variedade Arbequina houve resposta à rega deficitária (quer no tratamento S como no BS) com diminuição de  $g_s$ , e desta forma, pode ter contribuído para a preservação do estado hídrico da planta, como observado no TRA. Já na variedade Galega, apenas as plantas sujeitas ao tratamento S diminuíram a abertura estomática (redução do  $g_s$ ), o que deve de ter contribuído para manter o TRA. No entanto, o tratamento com bioestimulante permitiu à oliveira manter uma maior condutância estomática em condições de rega deficitária (BS), sem prejudicar o estado hídrico das folhas (tal como observado no TRA). Em outros trabalhos, onde foram aplicados tratamentos de rega deficitária mais severos, em oliveiras a crescer em vaso, por exemplo aplicação de um terço da capacidade de campo (Bacelar *et al.*, 2006), ou mesmo deixar de regar durante 21-30 dias (Abdallah *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018), as oliveiras não foram capazes de manter o estado hídrico e reduziram o TRA nas folhas.

A análise do nível de açúcares e polióis mostrou que para o caso da variedade Galega, a D-eritrose e a D-(+)-turanose, e para a variedade Arbequina, a D-tagatofuranose, a gluconolactona e a D-(+)-turanose, o bioestimulante em condições de rega deficitária (BS) promoveu a produção destes compostos. Isto sugere que o bioestimulante possa ter um papel importante na proteção da oliveira em condições de stress, estimulando a

produção de alguns açúcares e polióis com papel osmótico (Rangani *et al.*, 2020). Estudos feitos em plantas xerófitas demonstraram o papel osmoprotetor da D-eritrose e a sua contribuição para a tolerância ao stress hídrico (Rangani *et al.*, 2020; Panda *et al.*, 2021). Khalil *et al.* (2021) demonstraram que a D-(+)-turanose pode estar envolvida na resposta a vários stresses combinados no *Triticum durum* L.

Outros açúcares e polióis, também identificados nas folhas de oliveira, mostraram uma tendência para diminuir em resposta ao tratamento de rega deficitária e bioestimulante (ex.: sacarose,  $\beta$ -D-glucopiranosose, D-galactopiranosose e D-manitol). Esta resposta pode estar relacionada com o uso destes açúcares para a manutenção celular, uma vez que representam uma grande fonte de energia de reserva (Dias *et al.*, 2021).

Outro mecanismo de proteção em condições de seca presente na oliveira é a deposição de ceras nas folhas, formando uma camada cuticular bastante espessa que protege contra a perda de água e atenua os efeitos nocivos da radiação solar (Dias *et al.* 2018a; Dias *et al.* 2018b). Os alcanos de cadeia longa são um dos constituintes das ceras da cutícula (Mihailova *et al.*, 2015). Tanto para a variedade Galega como para a Arbequina apenas o tratamento de rega deficitária (S) parece estimular a produção de alguns alcanos de cadeia longa (ex.: alcano 5, que é o mais abundante). Este aumento pode ajudar na preservação do estado hídrico das oliveiras em regime de rega deficitária (S). Já o bioestimulante nessas condições (BS) não parece ter muita influência na produção destes compostos.

A eficiência intrínseca do uso da água (EIUA), é considerada um parâmetro importante para avaliar a capacidade das espécies para se estabelecerem em ambientes com limitações hídricas (Ferreira *et al.*, 2012). De um modo geral, a rega deficitária (tratamentos S e BS) diminuiu a EIUA na oliveira. Segundo Brito *et al.* (2019), esta é uma resposta típica em oliveiras sob condições de stress moderado, e indica que esta espécie adota uma estratégia conservativa do uso da água, que permite melhor adaptação em condições de falta de água prolongadas (Bacelar *et al.*, 2007). Contudo, a aplicação do bioestimulante nas condições de rega deficitária (BS) promoveu o EIUA, principalmente na variedade Arbequina. Estes dados sugerem que o bioestimulante poderá ser usado como estratégia para reduzir a quantidade de água usada nas culturas agrícolas (Bulgari *et al.*, 2019).

Apesar do regime de rega deficitária não provocar alterações significativas no estado hídrico da oliveira (TRA) após 69 dias de tratamento, a  $P_N$  foi afetada



negativamente. Contudo, a aplicação do bioestimulante em condições de rega deficitária (BS) trouxe benefícios na variedade Galega. O tratamento com bioestimulante (BS) atenuou esse efeito negativo da rega deficitária e permitiu manter uns valores de  $P_N$  superiores aos do tratamento S. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente em morango, tomate, milho, entre outros, onde a aplicação de bioestimulantes ajudou as plantas a combaterem stresses abióticos e, de forma geral estimulou a taxa fotossintética (Bulgari *et al.*, 2019; Kerchev *et al.*, 2020). Tal como já foi referido anteriormente, a diminuição da abertura estomática é uma das primeiras respostas das plantas ao défice hídrico, de modo a prevenir a perda de água (Araújo *et al.*, 2019; Brito *et al.*, 2019). A aplicação de bioestimulante em condições de rega deficitária (BS) também provou ter um efeito positivo na condutância estomática, uma vez que não houve diminuição da abertura estomática na variedade Galega (quando comparado com os controlos C e B). Resultados semelhantes foram obtidos por Kałużewicz *et al.* (2017) em brócolo e por Xu e Leskovar (2015) em espinafre.

A diminuição da abertura estomática para além de prevenir a perda de água através dos estomas, também pode limitar a entrada de  $CO_2$  nas folhas, o que pode provocar uma diminuição da  $P_N$  (Petridis *et al.*, 2012). Tal não parece ter acontecido nestas variedades de oliveira expostas aos tratamentos de défice hídrico (S e BS), pois foi observado em geral um aumento no rácio da concentração intercelular de  $CO_2$  e da concentração extracelular de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ) em plantas em rega deficitária (S e BS). Isto indica que não deve haver limitações na disponibilidade de  $CO_2$  nos espaços intercelulares das células do mesófilo. Estes dados também mostram que a redução da  $P_N$  observada nas oliveiras nos tratamentos de rega deficitária (S e BS) pode estar relacionado com efeitos não estomáticos, como por exemplo, com efeitos bioquímicos. Estes efeitos incluem a inibição das enzimas do ciclo de Calvin, como é o caso da RuBisCO ou a regeneração do substrato da RuBisCO (Bacelar *et al.*, 2007; Dias *et al.* 2018b; Brito *et al.*, 2019). Outra possível causa da descida da  $P_N$  na variedade Arbequina nos tratamentos S e BS, e na Galega no tratamento S, foi a redução da  $\Phi_{PSII}$  que pode ter levado a uma descida da disponibilidade de ATP e NADPH para o Ciclo de Calvin (Araújo *et al.*, 2019). Por sua vez, na variedade Arbequina, a descida da  $\Phi_{PSII}$  nos tratamentos S e BS pode ter ocorrido devido à redução da clorofila *a* (Oliveira *et al.* 2021). Já na variedade Galega no tratamento BS, que foi onde se obteve um  $P_N$  superior ao do tratamento S, o bioestimulante parece ter um efeito positivo protegendo o PSII e prevenindo a descida da

$\Phi_{\text{PSII}}$ , apesar da descida no nível de clorofila *a*. Os tratamentos de bioestimulante e de rega deficitária não afetaram a eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ). Segundo a literatura, plantas saudáveis apresentam valores de  $F_v/F_m$  entre 0,75 e 0,8 (Dias *et al.*, 2018a; Silva *et al.*, 2018). As médias obtidas nas duas variedades de oliveira encontram-se acima do valor mínimo, por isso, podemos concluir que a eficiência máxima do PSII não foi afetada por nenhum dos tratamentos. Dias *et al.* (2018a) e Silva *et al.* (2018) obtiveram resultados semelhante para a oliveira, que em condições de seca e seca combinada com calor, apesar de não apresentar alterações na  $F_v/F_m$ , sofreu um decréscimo na  $\Phi_{\text{PSII}}$ .

A clorofila *a* tem um papel muito importante na absorção da energia da luz para a realização da fotossíntese, e os outros pigmentos, tais como a clorofila *b* e os carotenoides, chamados de pigmentos acessórios, são também fundamentais na absorção de luz e na transferência da energia para os centros de reação (Berg *et al.*, 2002). Principalmente na variedade Arbequina, os tratamentos de rega deficitária (S e BS) foram mais prejudiciais, pois reduziram o nível de clorofilas e carotenoides. Na variedade Galega apenas o tratamento BS induziu uma diminuição do nível de clorofilas. Respostas semelhantes foram também obtidas em outras variedades de oliveira expostas a condições de seca (Boughalleb e Hajlaoui, 2011; Silva *et al.* 2018). Estes autores descrevem que as reduções nos níveis de clorofilas e carotenoides podem resultar de uma degradação destes pigmentos como consequência de stress oxidativo. Para além disso, a perda de clorofila pode ter ocorrido devido à redução no nível de carotenoides, uma vez que os carotenoides podem atuar como antioxidantes protegendo as clorofilas da foto oxidação (Dias *et al.*, 2018a).

Os lípidos para além de terem um papel importante como fonte de reserva de energia são também um dos principais componentes das membranas celulares (Sánchez-Martín *et al.*, 2018). Tanto na variedade Galega como na Arbequina observou-se uma tendência para o aumento de alguns ácidos gordos (ex.: ácidos palmítico, linoleico, oleico, esteárico e eicosanóico) em resposta à rega deficitária (S e BS). Contudo, na variedade Arbequina, a aplicação do bioestimulante em plantas do tratamento de rega deficitária (BS), parece estimular mais a produção destes compostos. Este aumento de ácidos gordos pode ter ajudado as plantas a manter a integridade das membranas durante o período de rega deficitária (S e BS), pois na análise do indicador de danos nas membranas (stress oxidativo), a permeabilidade da membrana (PM), mantem-se semelhante nestes tratamentos. Para além dos ácidos gordos, a 1-monopalmitina, um precursor dos lípidos

das membranas (Fiehn *et al.*, 2008), também é estimulada pela rega deficitária em particular quando é aplicado o bioestimulante, no caso da Arbequina.

Os terpenos (ex.:  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina e ácido ursólico), tal como os alcanos de cadeia longa, fazem parte da constituição das ceras epicuticulares (Bianchi *et al.* 1992). Alguns terpenos (ex.: timol) estão também ligados à resposta da oliveira a stresses abióticos, uma vez que possuem poder antioxidante (Dias *et al.*, 2018b). Nas variedades de oliveira estudadas, apenas a  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, o olean-12-ene-3,28-diol e o ácido ursólico na Galega e o neofitadieno, o olean-12-ene-3,28-diol, o derivado do derivado de lup-20(29)-en-28-al e o ácido ursólico na Arbequina responderam com aumento aos tratamentos de rega deficitária. Já o neofitadieno na variedade Arbequina, foi o único terpeno onde se verificou uma resposta positiva do bioestimulante em condições de rega deficitária. Resultados semelhantes foram obtidos para o tomateiro, com aplicação de exopolissacarídeos da microalga *Dunaliella salina*, em condições de stress salino, provando que este composto ativa vários mecanismos de combate ao stress oxidativo (El Arroussi *et al.*, 2018). Na variedade Galega, o esqualeno, que tem um papel antioxidante atuando ao nível da neutralização ROS (Valente *et al.*, 2020), foi apenas detetado nos tratamentos S e BS, sugerindo um papel protetor em condições de rega deficitária. Na variedade de oliveira Cobrançosa, o aumento da quantidade de esqualeno em resposta a radiação UV-B elevada foi correlacionado com o controlo de danos oxidativos (Dias *et al.*, 2020c).

As cumarinas, tal como a esculina e a escopoletina, estão envolvidas na resposta a stresses bióticos e abióticos e na regulação hormonal de várias espécies (Bourgaud *et al.*, 2006). Na oliveira, a aplicação de bioestimulante em condições de rega deficitária promoveu o aumento de esculina, possivelmente como uma medida de proteção contra o aumento de stress oxidativo (Bourgaud *et al.*, 2006).

As folhas de oliveira são ricas em compostos fenólicos, como por exemplo flavonoides e secoiridoides (Talhaoui *et al.*, 2015). Uma das propriedades mais importantes dos compostos fenólicos é a sua atividade antioxidante, sendo estes compostos capazes de inibirem a formação de radicais livres e por sua vez retardar ou inibir a oxidação dos lípidos e outras moléculas também oxidáveis (Afonso, 2014). Na variedade Galega, a aplicação de bioestimulante em condições de rega deficitária aumentou o nível do flavonoide luteolina-7-O-rutinósido e de vários secoiridoides, 10-hidroxioluropeína e 2''-metoxioluropeína isómero 1 e 2, possivelmente como resposta

de proteção. Dias *et al.* (2020b) também reportou um aumento do derivado de oleuropeína, a 2''-metoxioleuropeína, em folhas de oliveira expostas a um stress causado por radiação UV-B elevada. Estes autores descreveram o aumento deste derivado como um resultado da utilização da oleuropeína como agente neutralizador de ROS, sendo que, ao ser oxidada, a oleuropeína dá origem a vários derivados. Já na variedade Arbequina, a resposta dos compostos fenólicos, em particular do flavonoide luteolina, e dos secoiridoides 10-hidroxioluropeína, 2''-metoxioleuropeína isómero 1 e 2, parece estar mais relacionada com o tratamento de rega deficitária (S e BS). Vários estudos feitos com bioestimulantes, em diversas culturas, provaram que estes potenciam a resposta antioxidante em condições de stress, aumentando o nível de ascorbato, de glutathione, da capacidade total antioxidante, dos fenóis totais, dos flavonoides totais, e da atividade das enzimas antioxidantes, tais como a catalase, a guaiacol peroxidase e a superóxido dismutase (Chu *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2014; Savvas e Ntatsi, 2015; Campobenedetto *et al.*, 2020; Taha *et al.*, 2020).

Outros compostos fenólicos, também com grande capacidade antioxidante, e que fazem parte das folhas de oliveira, ainda que em menor quantidade, são os derivados do ácido hidroxicinâmico (Afonso, 2014). As folhas da variedade Arbequina são mais ricas nestes compostos e a aplicação de bioestimulante em condições de rega deficitária promoveu o aumento do metabolito maioritário, o versbascósido (isómero 1). Este composto parece ter um papel muito importante na proteção das azeitonas, atuando como filtro da radiação UV-B (Pfundel *et al.*, 2006).

### 4.3 Conclusões

Independentemente da variedade de oliveira, em condições de controlo (bem regado) a aplicação de bioestimulante parece aumentar os danos nas membranas, mas sem efeitos negativos ao nível do aparelho fotossintético, possivelmente devido à acumulação de compostos com ação protetora (ex.: oleósido, isómero de glucosídeo de ácido elenólico, mio-inositol, esqualeno e luteolina diglucosídeo). Contudo o bioestimulante mostrou ser mais eficiente na melhoria da eficiência intrínseca do uso da água para a variedade Galega, neste regime de rega.

Em condições de rega deficitária, a aplicação de bioestimulante mostrou ter um papel relevante na performance fisiológica das oliveiras e parece evidenciar mais as diferenças entre estas duas variedades. De uma maneira geral, ao nível fisiológico, o bioestimulante aparenta ter efeitos mais positivos na variedade Galega, promovendo a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e aumentando a abertura estomática. Já na resposta metabólica à aplicação do bioestimulante em condições de rega deficitária, as variedades parecem apresentar estratégias de defesa e proteção diferentes. A variedade Arbequina ativa a produção de terpenos (neofitadieno), de ácidos gordos e do éster 1-monopalmitina, da cumarina esculina e dos derivados do ácido hidroxicinâmico (isómero de verbascósido 1). A variedade Galega também aumenta a produção da cumarina esculina, mas tem uma resposta mais relevante por parte do flavonoide luteolina-7-*O*-rutinosídeo, e dos secoiridoides 10-hidroxioluropeína e 2''-metoxioluropeína. Esta diferença na resposta de metabolitos entre as duas variedades pode estar relacionada com os distintos graus de tolerância destas variedades aos stresses/seca. A Galega é uma variedade muito tolerante à seca e usada principalmente na cultura tradicional de sequeiro, já a variedade Arbequina, originária de zonas mais temperadas, tem uma menor tolerância à seca e é principalmente usada em cultura intensiva e superintensiva com elevado nível de rega.

Os dados obtidos neste trabalho, quer da resposta fisiológica, quer do perfil de metabolitos, sugerem que o bioestimulante à base de *A. nodosum* aplicado em condições de baixa disponibilidade de água, pode ajudar as oliveiras a responder de forma mais eficiente a episódios de stresse.

## Referências

1. ABDALLAH, Mariem Bem, METHENNI, Kawther, NOUAIRI, Issam, ZARROUL, Mokhtar e YOUSSEF, Nabil Ben. Drought priming improves subsequent more severe drought in a drought-sensitive cultivar of olive cv. *Chétoui*. *Scientia Horticulturae*, 2017, vol. 221, p.43-52.
2. AFONSO, Sílvia Martins. *Utilização de extratos de folhas de oliveira como agente antioxidante*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2014.
3. ALI, Nerissa, FARRELL, Aidan, RAMSUBHAG, Adesh e JAYARAMAN, Jayaraj. The effect of *Ascophyllum nodosum* extract on the growth, yield and fruit quality of tomato grown under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, 2016, vol. 28, nº 2, p. 1353-1362.
4. ARAÚJO, Márcia, FERREIRA DE OLIVEIRA, José Miguel P., SANTOS, Conceição, MOUTINHO-PEREIRA, José, CORREIA, Carlos e DIAS, Maria Celeste. Responses of olive plants exposed to different irrigation treatments in combination with heat shock: physiological and molecular mechanisms during exposure and recovery. *Planta*, 2019, vol. 249, nº 5, p. 1583-1598.
5. ARAÚJO, Márcia, SANTOS, Conceição e DIAS, Maria Celeste. Can young olive plants overcome heat shock?. In ALVES, Fátima, FILHO, Walter Leal and AZEITEIRO, Ulisses. *Theory and Practice of Climate Adaptation*. Springer, 2018, p. 193-203.
6. Associação Natureza Portugal – ANP e World Wide Fund for Nature -WWF. Vulnerabilidade de Portugal à Seca e Escassez de Água. 2019 (consultado em 2021-04-27). Disponível na Word Wide Web: [https://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/relatorio\\_seca\\_e\\_escassez.pdf](https://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/relatorio_seca_e_escassez.pdf)
7. BACELAR, Eunice A., CORREIA, Carlos M., MOUTINHO-PEREIRA, José M., GONÇALVES, Berta C., LOPES, João I. e TORRES-PEREIRA, José M.G. Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree Physiology*, 2004, vol. 24, nº 2, p. 233-239.
8. BACELAR, Eunice A., SANTOS, Dário L., MOUTINHO-PEREIRA, José M., LOPES, João I., GONÇALVES, Berta C., FERREIRA, Timóteo C. e CORREIA, Carlos M. Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. *Plant and Soil*, 2007, vol. 292, nº 1-2, p. 1-12.
9. BACELAR, Eunice A., SANTOS, Dário L., MOUTINHO-PEREIRA, José M., GONÇALVES, Berta C., FERREIRA, Helena F. e CORREIA, Carlos M. Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*, 2006, vol. 170, p. 596-605.

10. BARRANCO, Diego. Variedades y patrones. In BARRANCO, Diego, FERNANDEZ-ESCOBAR, Ricardo e RALLO, Luis. El cultivo del olivo. Madrid: Junta de Andalucía e Ed. Mundi-Prensa, 2008, p. 63-92.
11. BERG, Jeremy M., TYMOCZKO, John L. e STRYER, Lubert. The Light Reactions of Photosynthesis. In BERG, Jeremy M., TYMOCZKO, John L. e STRYER, Lubert. Biochemistry. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, 2002, p. 565-584.
12. BIANCHI, Giorgio, MURELLIA, Carla e VLAHOV, Giovanna. Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry*, 1992, vol. 31, nº 10, p. 3503-3506.
13. BOUGHALLEB, Fayçal e HAJLAOUI, Hichem. Physiological and anatomical changes induced by drought in two olive cultivars (cv Zalmati and Chemlali). *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, vol. 33, p. 53–65.
14. BOURGAUD, Frederic, HEHN, Alain, LARBAT, Romain, DOERPER, Sébastien, GONTIER, Eric, KELLNER, S. e MATERN, Ulrich. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 2006, vol. 5, nº 2, p. 293-308.
15. BRITO, Cátia Vanessa Queijo. *Strategies to Improve Olive Orchards Sustainability Under a Changing Environment*. Tese de Doutorado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2018.
16. BRITO, Cátia, DINIS, Lia-Tânia, MOUTINHO-PEREIRA, José e CORREIA, Carlos M. Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate. *Plants*, 2019, vol. 8, nº 7, p. 1-20.
17. BULGARI, Roberta, FRANZONI, Giulia e FERRANTE, Antonio. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 2019, vol. 9, nº 6, p. 1-30.
18. CAMPOBENEDETTO, Cristina, GRANGE, Eric, MANNINO, Giuseppe, VAN ARKEL, Jeroen, BEEKWILDER, Jules, KARLOVA, Romyana, GARABELLO, Christian, CONTARTESE, Valeria e BERTEA, Cinzia M. A Biostimulant Seed Treatment Improved Heat Stress Tolerance During Cucumber Seed Germination by Acting on the Antioxidant System and Glyoxylate Cycle. *Frontiers in Plant Science*, 2020, vol. 11, nº 836, p. 1-12.
19. CARDINALI, Angela, PATI, Sandra, MINERVINI, Fiorenza, D'ANTUONO, Isabella, LINSALATA, Vito e LATTANZIO, Vincenzo. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, vol. 60, nº 7, p. 1822-1829.
20. CAVALHEIRO, Caroline Viegas, ROSSO, Vandrisa Dellinghausen, PAULUS, Eloi, CICHOSKI, Alexandre José, WAGNER, Roger, MENEZES, Cristiano Ragagnin, e BARIN,

Juliano Smanioto. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. *Ciência Rural*, 2014, vol. 44, nº 10, p. 1874-1879.

21. CETINKAYA, Hakan, KOC, Mehmet e KULAK, Muhittin. Monitoring of mineral e polyphenol content in olive leaves under drought conditions: Application chemometric techniques. *Industrial Crops and Products*, 2016, vol. 88, p. 78-84.

22. CHIAPPETTA, Adriana e MUZZALUPO, Innocenzo. Botanical Description. In MUZZALUPO, Innocenzo. *Olive germplasm – The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy*. IntechOpen, 2012, p. 23-38.

23. CHOULIARAS, Vassilios, TASIOLA, Maria, CHATZISSAVVIDIS, Christos, THERIOS, Ioannis e TSABOLATIDOU, Eleftheria. The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Koroneiki. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, vol. 89, p. 984-988.

24. CHU, Jianzhou, YAO, Xiaoqin e ZHANG, Zhuona. Responses of Wheat Seedlings to Exogenous Selenium Supply Under Cold Stress. *Biological Trace Element Research*, 2010, vol. 136, p. 355–363.

25. CORDEIRO, António Manuel, INÊS, Carla e MORAIS, Norberto. Principais Cultivares de Oliveira Existentes em Portugal. In JORDÃO, Pedro. *Boas Práticas no Olival e no Lagar*. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.), 2014, p. 44-52.

26. CORDEIRO, António Manuel. Distribuição do olival em Portugal - Distribuição regional do olival nacional de acordo com as cultivares. In JORDÃO, Pedro. *Boas Práticas no Olival e no Lagar*. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.), 2014, p. 27-28.

27. CRIADO, M. Nieves, MORELLÓ, J. Ramón, MOTILVA, M. José e ROMERO, M. Paz (2004) Effect of Growing Area on Pigment and Phenolic Fractions of Virgin Olive Oils of the Arbequina Variety in Spain. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2004, vol. 81, nº 7, p. 633-640.

28. DAWSON, Daniel. Global Olive Oil Production Dips to Four-Year Low. Olive Oil Times. 2020 (consultado em 2021-04-27). Disponível na Word Wide Web: <https://www.oliveoiltimes.com/world/global-olive-oil-production-dips-to-four-year-low/88616>

29. DGARD – Direção-geral de agricultura e desenvolvimento rural. *Produção integrada do olival*. 2ª ed. Lisboa: DGARD, 2010. ISBN 978-972-8649-96-8.

30. DIAS, Maria Celeste, CORREIA, Sandra, SERÔDIO, João, SILVA, Artur Manuel Soares, FREITAS, Helena e SANTOS, Conceição. Chlorophyll fluorescence and oxidative stress endpoints to discriminate olive cultivars tolerance to drought and heat episodes. *Scientia Horticulturae*, 2018a, vol. 231, p. 31-35.



31. DIAS, Maria Celeste, FIGUEIREDO, Catarina, PINTO, Diana C.G.A., FREITAS, Helena, SANTOS, Conceição e SILVA, Artur M.S. Heat shock and UV-B episodes modulate olive leaves lipophilic and phenolic metabolite profiles. *Industrial Crops and Products*, 2020a, vol. 133, p. 269-275.
32. DIAS, Maria Celeste, PINTO, Diana C.G.A., CORREIA, Carlos, MOUTINHO-PEREIRA, José, OLIVEIRA, Helena, FREITAS, Helena, SILVA, Artur M.S. e SANTOS, Conceição. UV-B radiation modulates physiology and lipophilic metabolite profile in *Olea europaea*. *Journal of Plant Physiology*, 2018b, vol. 222, p. 39-50.
33. DIAS, Maria Celeste, PINTO, Diana C.G.A., FIGUEIREDO, Catarina, SANTOS, Conceição e SILVA, Artur M.S. Phenolic and lipophilic metabolite adjustments in *Olea europaea* (olive) trees during drought stress and recovery. *Phytochemistry*, 2021, vol. 185, nº 112695.
34. DIAS, Maria Celeste, PINTO, Diana C.G.A., FREITAS, Helena, SANTOS, Conceição e SILVA, Artur M.S. The antioxidant system in *Olea europaea* to enhanced UV-B radiation also depends on flavonoids and secoiridoids. *Phytochemistry*, 2020b, vol. 170, nº 112199.
35. DIAS, Maria Celeste, SANTOS, Conceição, SILVA, Sónia, PINTO, Diana C.G.A. e SILVA, Artur M.S. Physiological and Metabolite Reconfiguration of *Olea europaea* to Cope and Recover from a Heat or High UV-B Shock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020c, vol. 68, p. 11339–11349.
36. Direção regional de agricultura e pescas do centro - Drapc. Instalação do olival e variedades – Diferentes características, diferentes aptidões. 2013 (consultado em 2021-04-27). Disponível na Word Wide Web: [https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/instalacao\\_olival\\_e\\_variedades\\_2013.pdf](https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/instalacao_olival_e_variedades_2013.pdf)
37. EDZIRI, H., JAZIRI, Raouf, AISSAOUI, Feten, VERSCHAEVE, Luc, FLAMINI, Guido, CHEHAB, Hechmi, LAAMERI, S., CHIHAOUI, Badreddine, MAHJOUR, Zoubeir, SFINA, Hanene, ABDRAHMAN, A., MASTOURI, Maha e BOUJNAH, Dalenda. Impact of water deficit on physiological parameters, bioactive content and antioxidant activity of three olive cultivars. *South African Journal of Botany*, 2018, vol. 118, p. 268-273.
38. EL ARROUSSI, Hicham, BENHIMA, R., ELBAOUCHI, Adil, SIJILMASSI, Badreddine, EL MERNISSI, Najib, AAFSAR, A., MEFTAH-KADMIRI, Issam, BENDAOU, Najib e SMOUNI, Abdelaziz. *Dunaliella salina* exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Applied Phycology*, 2018, vol. 30, p. 2929–2941.
39. FERNÁNDEZ, José Enrique. Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environmental and Experimental Botany*, 2014, vol. 103, p. 158-179.

40. FERREIRA, Maciel José, GONÇALVES, José Francisco de Carvalho e FERRAZ, João Baptista Silva. Crescimento e Eficiência do Uso da Água de Plantas Jovens de Castanheira-Da-Amazônia em Área Degradada e Submetidas à Adubação. *Ciência Florestal*, 2012, vol. 22, nº 2, p. 393-401.
41. FIEHN, Oliver, WOHLGEMUTH, Gert, SCHOLZ, Martin, KIND, Tobias, LEE, Do Yup, LU, Yun, MOON, Stephanie e NIKOLAU, Basil. Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *The Plant Journal*, 2008, vol. 53, p. 691–704.
42. FREITOSA DE VASCONCELOS, Ana Carolina e CHAVES, Lúcia Helena Garófalo. Biostimulants and their role in improving plant growth under abiotic stresses. In MIRMAJLESSI, Seyed Mahyar. *Bioestimulants in plant science*. IntechOpen, 2019, p. 1-14.
43. Garcia-Herrera, Ricardo F., Lionello, P. e Ulbrich, U. Preface: Understanding dynamics and current developments of climate extremes in the Mediterranean region. *Natural Hazards and Earth System Sciences*, 2014, vol. 14, p. 309–316.
44. GILL, Sarvajeet Singh e TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, vol. 48, nº 12, p. 909-930.
45. GUCCI, Riccardo, CARUSO, Giovanni, GENNAI, Clizia, ESPOSTO, Sonia, URBANI, Stefania e SERVILI, Maurizio. Fruit growth, yield and oil quality changes induced by deficit irrigation at different stages of olive fruit development. *Agricultural Water Management*, 2019, vol. 212, p. 88-98.
46. GUINDA, Ángeles, CASTELLANO, José María, SANTOS-LOZANO, José Manuel, DELGADO-HERVÁS, Teresa, GUTIÉRREZ-ADÁNEZ, Pilar e RADA, Mirela. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, vol. 64, nº 1, p. 431-438.
47. HUANG, Hua, BURGHARDT, Markus, SCHUSTER, Ann-Christin, LEIDE, Jana, LARA, Isabel e RIEDERER, Markus. Chemical Composition and Water Permeability of Fruit and Leaf Cuticles of *Olea europaea* L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, vol. 65, p. 8790-8797.
48. IOC. International Olive Council - Newsletter nº145. 2020 (consultado em: 2021-02-10). Disponível na Word Wide Web: [https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/01/NEWSLETTER\\_145\\_EN-JANUARY-2020.pdf](https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/01/NEWSLETTER_145_EN-JANUARY-2020.pdf)
49. IOC. International Olive Council - World's olive oil production has tripled. 2021 (consultado em: 2021-02-10). Disponível na Word Wide Web: <https://www.internationaloliveoil.org/worlds-olive-oil-production-has-tripled/>
50. IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change - Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014 (consultado em 2021-02-03). Disponível na

Word Wide Web: [https://archive.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR\\_AR5\\_FINAL\\_full\\_wcover.pdf](https://archive.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_wcover.pdf)

51. JITHESH, M.N., SHUKLA, Pushp Sheel, KANT, P., JOSHI, Jyoti, CRITCHLEY, Alan T., e PRITHIVIRAJ, Balakrishnan. Physiological and transcriptomics analyses reveal that *Ascophyllum nodosum* extracts induce salinity tolerance in Arabidopsis by regulating the expression of stress responsive genes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2018, vol. 38, p. 463–478.

52. KAŁUŻEWICZ, Alina, KRZESIŃSKI, Włodzimierz, SPIŻEWSKI, Tomasz e ZAWORSKA, Anna. Effect of Biostimulants on Several Physiological Characteristics and Chlorophyll Content in Broccoli under Drought Stress and Re-watering. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2017, vol, 45, p. 197-202.

53. KERCHEV, Pavel, VAN DER MEER, Tom, SUJEETH, Neerakkal, VERLEE, Arno, STEVENS, Christian V., VAN BREUSEGEM, Frank e GECHEV, Tsanko. Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants. *Biotechnology Advances*, 2020, vol. 40, nº 107503.

54. KHALIL, R., TAJTI, J., HAMOW, K.Á., GONDOR, K.O., DARKO, E., ELSAYED, N., NAGY, Z., SZALAI, G., JANDA, T. e MAJLÁTH, Imre. How does moderate drought affect quantum yield and the regulation of sugar metabolism at low temperature in durum wheat (*Triticum durum* L.)?. *Photosynthetica*, 2021, vol. 59, nº 2, p. 313-326.

55. KIM, Go-Un, SEO, Kyong-Hwan e CHEN, Deliang. Climate change over the Mediterranean and current destruction of marine ecosystem. *Nature*, 2019, vol. 9, nº 18813.

56. LEITÃO, Fausto, POTES, Maria de Fátima, CALADO, Maria Leonilde e ALMEIDA, Francisco José. *Descrição de 22 Variedades de Oliveira Cultivadas em Portugal*. Lisboa: DGARD, 1986 (consultado em 2021-04-27). Disponível na Word Wide Web: <https://www.dgadr.gov.pt/component/jdownloads/send/10-diversos/26-descricao-de-22-variedades-de-oliveira-cultivadas-em-portugal>

57. LOEWUS, Frank A. e MURTHY, Pushpalatha P.N. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 2000, vol. 150, p. 1-19.

58. LUTTS, S., KINET, J. M. e BOUHARMONT, J. NaCl-induced Senescence in Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars Differing in Salinity Resistance. *Annals of Botany*, 1996, vol. 78, nº3, p. 389–398.

59. MACHADO, Beatriz Sousa Melo. *Otimização dos métodos de extração dos metabolitos presentes na folha de oliveira (Olea europaea L.)*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2021.

60. MACHADO, Vivian Pupo de Oliveira, PACHECO, Ana Claudia e CARVALHO, Marcia Eugenia Amaral. Effect of biostimulant application on production and flavonoid content of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Revista Ceres*, 2014, vol. 61, nº 6, p. 983-988.
61. MAIA, Frederico de Barros. *Contribuição para o estudo da fenologia de quatro variedades de oliveira (Olea europaea L.): “Arbequina”, “Cobrançosa”, “Galega Vulgar” e “Picual”*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2010.
62. MAXWELL, Kate e JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, vol. 51, nº 345, p. 659 – 668.
63. MECHRI, Beligh, TEKAYA, Meriem, HAMMAMI, Mohamed e CHEHAB, Hechmi. Root verbascoside and oleuropein are potential indicators of drought resistance in olive trees (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, vol. 141, p. 407-414.
64. MECHRI, Beligh, TEKAYA, Meriem, HAMMAMI, Mohamed e CHEHAB, Hechmi. Effects of drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown olive trees (*Olea europaea*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2020, vol. 92, nº 104112.
65. MIERZIAK, Justyna, KOSTYN, Kamil e KULMA, Anna. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 2014, vol. 19, nº 10, p. 16240-16265.
66. MIHAILOVA, Alina, ABBADO, Dimitri e PEDENTCHOUK, Nikolai. Differences in n-alkane profiles between olives and olive leaves as potential indicators for the assessment of olive leaf presence in virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, vol. 117, nº 9, p. 1480-1485.
67. MORIONDO, Marco e BINDI, Marco. Impact of Climate Change on the Phenology of Typical Mediterranean Crops. *Italian Journal of Agrometeorology*, 2008, vol. 12, nº 3, p. 5-12.
68. MOTA, M. e LOPES, J.P.S. Resultados preliminares do efeito da aplicação de um extrato de algas em oliveiras ‘Cobrançosa’ e ‘Galega’. *Atas portuguesas de horticultura*, 2012, nº 21, p. 139-148.
69. MOTA-BARROSO, João, PEÇAS, José Oliveira, DIAS, António Bento, PINHEIRO, Anacleto Cipriano e PEIXE, Augusto. Evolução tecnológica em olivicultura. In BOHM, J. *O grande livro da oliveira e do azeite - Portugal oleícola*. Dinalivro, 2013, p. 80-117.
70. OLIVEIRA, José Miguel P. Ferreira, SANTOS, Conceição, ARAÚJO, Márcia, OLIVEIRA, M. Margarida e Dias, Maria Celeste. High-salinity activates photoprotective mechanisms in *Quercus suber* via accumulation of carbohydrates and involvement of non-enzymatic and enzymatic antioxidant pathways. *New Forests*, 2021.
71. PANDA, Ashok, RANGANI, Jaykumar e PARIDA, Asish Kumar. Physiological and metabolic adjustments in the xero-halophyte *Haloxylon salicornicum* conferring drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 2021, vol. 172, nº 2, p. 1-23.

72. PATEL, Jai Singh, SELVARAJ, Vinodkumar, GUNUPURU, Lokanadha Rao, RATHOR, Pramod Kumar e PRITHIVIRAJ, Balakrishnan. Combined application of *Ascophyllum nodosum* extract and chitosan synergistically activates host-defense of peas against powdery mildew. *BMC Plant Biology*, 2020, vol. 20, nº 113.

73. PEREIRA, Cristina Lucas. *Avaliação da escassez de água e sua utilização para a modelação da Taxa de Recursos Hídricos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2017.

74. PEREIRA, Leonel, MORRISON, Liam, SHUKLA, Pushp Sheel e CRITCHLEY, Alan T. A concise review of the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis. *Journal of Applied Phycology*, 2020, vol. 32, p. 3561–3584.

75. PETRIDIS, Antonios, THERIOS, Ioannis, SAMOURIS, Georgios, KOUNDOURAS, Stefanos e GIANNAKOULA, Anastasia. Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, vol. 60, p. 1-11.

76. PFÜNDEL, Erhard E., AGATI, Giovanni e CEROVIC, Zoran G. Optical properties of plant surfaces. In RIEDERER, Markus e MÜLLER, Caroline. *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, 2006, p. 216-249.

77. PIASECKA, Anna, SAWIKOWSKA<sup>1</sup>, Aneta, KUCZYŃSKA, Anetta, OGRODOWICZ, Piotr, MIKOŁAJCZAK, Krzysztof, KRYSZKOWIAK, Karolina, GUDYŚ, Kornelia, GUZY-WRÓBELSKA, Justyna, KRAJEWSKI, Paweł e KACHLICKI, Piotr. Drought-related secondary metabolites of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and their metabolomic quantitative trait loci. *Plant Journal*, 2017, vol. 89, nº 5, p. 898-913.

78. PIERANTOZZI, Pierluigi, TORRES, Mariela, BODOIRA, Romina e MAESTRI, Damián. Water relations, biochemical – physiological and yield responses of olive trees (*Olea europaea* L. cvs. Arbequina and Manzanilla) under drought stress during the pre-flowering and flowering period. *Agricultural Water Management*, 2013, vol. 125, p. 13-25.

79. POPA, Ovidiu, BABEANU, Narcisa Elena, POPA, Ioana, NITA, Sultana e DINU-PÂRVU, Cristina Elena. Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources. *BioMed Research International*, 2015, p. 1-16.

80. RANGANI, Jaykumar, PANDA, Ashok e PARIDA, Asish Kumar. Metabolomic study reveals key metabolic adjustments in the xerohalophyte *Salvadora persica* L. during adaptation to water deficit and subsequent recovery conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, vol. 150, p. 180-195.

81. REIS, Pedro. *O olival em Portugal - Dinâmicas, tecnologias e relação com o desenvolvimento rural*. Lisboa: Animar, 2014. ISBN: 978-989-8748-06-5.

82. ROMERO-TRIGUEROS, Cristina, VIVALDI, Gaetano Alessandro, NICOLÁS, Emilio Nicolás, PADUANO, Antonello, SALCEDO, Francisco Pedrero e CAMPOSEO, Salvatore. Ripening indices, olive yield and oil quality in response to irrigation with saline reclaimed water and deficit strategies. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10, n° 1243, p. 1-16.
83. SÁNCHEZ-MARTÍN, Javier, CANALES, Francisco J., TWEED, John K.S., LEE, Michael R.F., RUBIALES, Diego, GÓMEZ-CADENAS, Aurelio, ARBONA, Vicent, MUR, Luis A.J. e PRATS, Elena. Fatty Acid Profile Changes During Gradual Soil Water Depletion in Oats Suggests a Role for Jasmonates in Coping with Drought. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, n° 1077.
84. SANTANIELLO, Antonietta, SCARTAZZA, Andrea, GRESTA, Francesco, LORETI, Elena, BIASONE, Alessandro, DI TOMMASO, Donatella, PIAGGESI, Alberto e PERATA, Pierdomenico. *Ascophyllum nodosum* Seaweed Extract Alleviates Drought Stress in Arabidopsis by Affecting Photosynthetic Performance and Related Gene Expression. *Frontiers in Plant Science*, 2017, vol. 8, n° 1362, p. 1-15.
85. SANZANI, S.M., SCHENA, L., NIGRO, F., SERGEEVA, V., IPPOLITO, A. e SALERNO, M.G. Abiotic Diseases of olive. *Journal of Plant Pathology*, 2012, vol. 94, n° 3, p. 469-491.
86. SAVVAS, Dimitrios e NTATSI, Georgia. Biostimulant activity of silicon in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 2015, vol. 196, p. 66-81.
87. SHUKLA, Pushp S., SHOTTON, Katy, NORMAN, Erin, NEILY, Will, CRITCHLEY, Alan T. e PRITHIVIRAJ, Balakrishnan. Seaweed extract improve drought tolerance of soybean by regulating stress-response genes. *AoB Plants*, 2018, vol. 10, p. 1-8.
88. SHUKLA, Pushp Sheel, MANTIN, Emily Grace, ADIL, Mohd, BAJPAI, Sruti, CRITCHLEY, Alan T. e PRITHIVIRAJ, Balakrishnan. *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10, n° 655.
89. SILVA, Sónia, SANTOS, Conceição, SERODIO, João, SILVA, Artur M.S. e DIAS, Maria Celeste. Physiological performance of drought-stressed olive plants when exposed to a combined heat-UV-B shock and after stress relief. *Functional Plant Biology*, 2018, vol. 45, n° 12, p. 1233-1240.
90. SIMS, Daniel A. e GAMON, John A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 2002, vol. 81, p. 337 – 354.
91. SMART, Richard E. e BINGHAM, Gail E. Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiol*, 1974, vol. 53, n° 2, p. 258-260.

92. STYER, Jean Christine. *Regulating inositol biosynthesis in plants: myo-inositol phosphate synthase and myo-inositol monophosphatase*. Master Thesis, Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 2000.
93. TAHA, Ragab Salama, ALHARBY, Hesham F., BAMAGOOS, Atif A., MEDANI, R.A. e RADY, Mostafa Mohamed. Elevating tolerance of drought stress in *Ocimum basilicum* using pollen grains extract; a natural biostimulant by regulation of plant performance and antioxidant defense system. *South African Journal of Botany*, 2020, vol. 128, p. 42-53.
94. TALHAOUI, Nassima, GÓMEZ-CARAVACA, Ana María, LEÓN, Lorenzo, DE LA ROSA, Raúl, SEGURA-CARRETERO, Antonio e FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto. Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 2014, vol. 58, p. 28-34.
95. TALHAOUI, Nassima, TAAMALLI, Amani, GÓMEZ-CARAVACA, Ana María, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto e SEGURA-CARRETERO, Antonio. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 2015, vol. 77, p. 92-108.
96. TAMASI, Gabriella, BONECHI, Claudia, BELYAKOVA, Anastasiya, PARDINI, Alessio e ROSSI, Claudio. The olive tree, a source of antioxidant compounds. *Journal of the Siena Academy of Sciences*, 2016, vol. 8, nº 1, p. 10-29.
97. THERIOS, Ioannis. *Crop production science in horticulture: Olives*. UK: CABI International, 2009. ISBN: 978-1-84593-458-3.
98. TRENTACOSTE, Eduardo R., CONTRERAS-ZANESSI, O., BEYÁ-MARSHALL, Victor e PUERTAS, C.M. Genotypic variation of physiological and morphological traits of seven olive cultivars under sustained and cyclic drought in Mendoza, Argentina. *Agricultural Water Management*, 2018, vol. 196, p. 48-56.
99. VALENTE, Simão, MACHADO, Beatriz, PINTO, Diana C.G.A., SANTOS, Conceição, SILVA, Artur M.S. e DIAS, Maria Celeste. Modulation of phenolic and lipophilic compounds of olive fruits in response to combined drought and heat. *Food Chemistry*, 2020, vol. 329, nº 127191.
100. VAN OOSTEN, Michael James, PEPE, Olimpia, DE PASCALE, Stefania, SILLETTI, Silvia e MAGGIO, Albino. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2017, vol. 4, nº 5, p. 1-12.
101. XU, Chenping e LESKOVAR, Daniel I. Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Scientia Horticultura*, 2015, vol. 183, p. 39-47.

102. XUE, Dawei, ZHANG, Xiaoqin, LU, Xueli, CHEN, Guang e CHEN, Zhong-Hua. Molecular and Evolutionary Mechanisms of Cuticular Wax for Plant Drought Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2017, vol. 8, n° 621, p. 1-12.