

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a défice hídrico

Rui Pedro Pinto de Almeida Figueiras

Mestrado em Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas

Departamento de Biologia

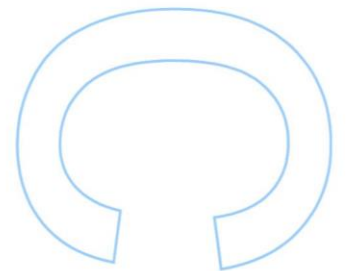
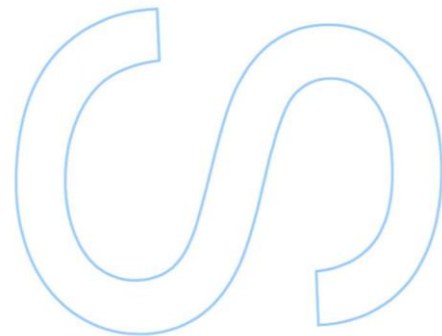
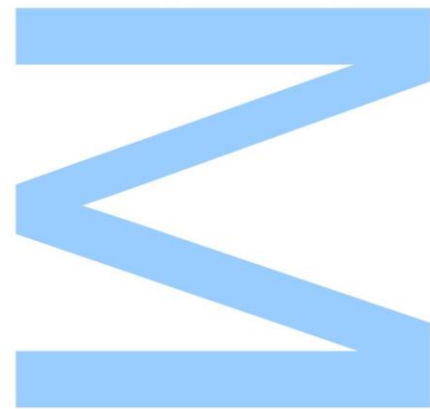
Ano de 2021

Orientadora

Doutora Maria Celeste Pereira Dias, Investigadora do Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra.

Coorientadora

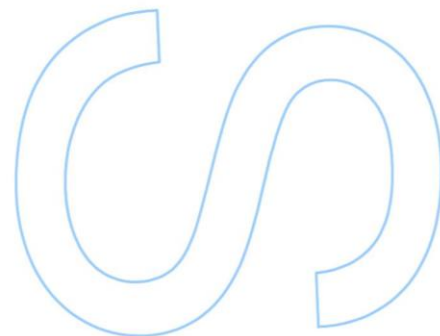
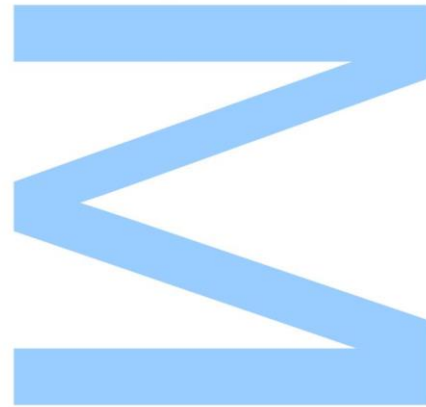
Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Catedrática, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Maria Celeste Dias, por todo o apoio que me deu na realização deste trabalho, e de me ter proporcionado todas as condições para que este fosse o mais completo possível. Por toda a disponibilidade e boa disposição no laboratório, bem como na ajuda da escrita deste trabalho, e com os conhecimentos que me transmitiu ao longo deste tempo, um muito obrigado, nada teria sido possível sem a Doutora Celeste!

Agradeço também aos viveiros Miguel Vaz - Sociedade Agrícola Lda., em Semide (Coimbra, Portugal), por terem cedido as oliveiras das duas variedades usadas neste trabalho de mestrado.

Agradeço também à minha co-orientadora, Professora Doutora Conceição Santos, por se ter demonstrado disponível em me ajudar neste trabalho e de ter proporcionado mais um ponto de vista relativamente às questões que poderiam surgir na escrita deste, e assim contribuir para que este fosse enriquecido com mais conhecimento.

Obrigado também à Professora Doutora Paula Melo, por toda a ajuda que me deu durante o mestrado, ao longo destes dois anos, que se mostrou sempre disponível para as questões que me surgiam e sempre me ajudou durante os períodos de turbulência por que passei durante o mestrado.

De igual modo, agradeço também a todos os professores deste mestrado, contribuindo para que aumentassem o meu conhecimento na área das ciências biológicas relacionada com as plantas, e assim perceber o quão vasta e incrível é esta área e o potencial que tem para ajudar nas alterações climáticas que é um dos maiores desafios da minha geração.

Um sincero obrigado à Márcia, doutoranda que me auxiliou no plano de trabalhos e apoiou com os problemas que pudessem surgir nas mais variadas tarefas que executei no laboratório, bem como com sugestões sobre a maneira como deveria efetuar as tarefas a que me propus. Tornou os problemas muito menos complicados e tornou o ambiente muito menos stressante.

Agradeço imenso à Marta, minha colega de laboratório e amiga, por ter proporcionado um ótimo ambiente de trabalho e de me ter apoiado e ajudado em algumas tarefas que tinha de realizar. Fez com que o trabalho avançasse mais rápido e tivesse muito menos dificuldade na realização das tarefas de laboratório.

Agradeço aos amigos do mestrado, João Carlos Cipriano, João Pedro Pinto, Gonçalo Teixeira e Mariana Rocha por tornarem o ambiente muito divertido e relaxado,

bem como nas aulas por proporcionarem um ambiente crítico em relação às questões que eram colocadas. Agradeço-vos também por me porem à vontade nesta nova cidade que era o Porto, e assim contribuir para que me adaptasse muito rapidamente à sua vida cosmopolita. Um obrigado também a todos os meus colegas de mestrado que também contribuíram para que o ambiente nas aulas e fora delas fosse igualmente descontraído e relaxante.

Um grande obrigado aos meus amigos de licenciatura Filipe Batalha, José Marques e Guilherme Simões que com a sua boa disposição, mesmo nestes últimos dois anos que foram à distância, contribuíram para que mantivéssemos a positividade em pandemia e também proporcionou bons momentos de diversão. Agradeço-vos por proporcionarem um bom ambiente de trabalho em todos os trabalhos de grupo que realizámos e que contribuíram também para a minha formação enquanto biólogo.

Um grande obrigado ao meu amigo algarvio Diogo Alves que sempre me apoio e deu força para conseguir os meus objetivos e também pelas longas conversas ao telefone que proporcionavam ótimos momentos de descontração após os períodos de estudo, ao longo destes 5 anos de universidade.

Agradeço à minha amiga Mónica Nunes que me apoiou imenso neste último ano de tese e fez com que tudo parecesse mais fácil ao longo deste ano. Se não fosse a tua ajuda muito provavelmente as coisas não teriam sido tão fáceis e não teria tido momentos de convivência e passeios que foram essenciais neste ano que passei tão isolado devido a este trabalho ao qual me dedique imenso. Muito obrigado!

Por fim, agradeço à minha família por me ter apoiado, principalmente aos meus pais, pois sem eles esta aventura universitária em Coimbra e no Porto não teria sido possível. Agradeço-vos imensamente do fundo do coração por proporcionarem a minha vinda para a universidade e assim contribuir para a minha formação profissional e também como pessoa, considero que saio muito mais bem preparado para o mundo do trabalho graças à vida académica e ao conhecimento que aprendi cá. Sem o vosso apoio emocional também não conseguiria ter ido para tão longe do Algarve, a minha casa ao longo dos meus primeiros 18 anos de vida bem como aguentar-me nos momentos de estudo mais difíceis por que passei. Agradeço também à minha avó Teresa que do alto da sabedoria dos seus 90 anos, e com a sua simplicidade e humildade, me ouviu desabafar várias vezes acerca do que se ia passando no meu dia a dia. Aprendi muito com os seus conselhos e fico muito contente por me ainda ter visto a tirar a licenciatura e o mestrado!

Resumo

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das principais culturas na região do Mediterrâneo e em Portugal. Esta espécie tem um grande impacto na economia, paisagem e herança sócio-cultural dos países do Mediterrâneo, sendo 78% do azeite produzido mundialmente proveniente desta região. Embora a oliveira seja caracterizada por ter uma grande tolerância à seca e calor, o efeito das alterações do clima (ação conjunta de vários agentes de stress) na produtividade e qualidade da azeitona e do azeite tem levantado algumas preocupações. Nos últimos anos tem-se verificado um aumento do uso de bioestimulantes (substâncias ativas ou microorganismos) no sector agrícola, pois aumentam a tolerância a vários agentes de stress biótico e abiótico, promovendo o rendimento das culturas e melhorando a qualidade dos produtos. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da aplicação de um bioestimulante à base da alga *Ascophyllum nodosum* na tolerância da oliveira à seca. Oliveiras das variedades Galega e Arbequina foram divididas em 2 grupos, onde um deles foi tratado com o bioestimulante. Após este tratamento, os dois grupos foram subdividido em dois, onde num subgrupo foi aplicada uma rega deficitária (50% da capacidade de campo) e noutro foi mantida a regada. No final de todos os tratamentos, foi avaliado o estado hídrico das plantas, a fotossíntese, danos oxidativos, resposta antioxidante e os níveis de açúcares totais, amido e prolina. A aplicação do bioestimulante nas duas variedades de oliveira, em condições de rega normal não melhorou o teor relativo em água das folhas nem a fotossíntese (taxa de assimilação de CO₂ e F_v/F_m), mas parece ter um efeito positivo na eficiência do uso da água (EUA). Para além disso, os dados sugerem que na variedade Arbequina, o bioestimulante teve um efeito benéfico na redução da produção de H₂O₂, na estimulação da acumulação de amido e da atividade da enzima antioxidante catalase. Já na variedade Galega, apesar de aumentar a produção de H₂O₂, o bioestimulante melhorou a produção de açúcares solúveis totais (AST) e fenóis totais. Em condições de rega deficitária, a aplicação de bioestimulante também não afetou o estado hídrico das oliveiras. Mas na variedade Galega a rega deficitária reduziu o estado hídrico das folhas. A variedade Arbequina parece ser mais eficiente no controlo da perda de água, pois a rega deficitária não alterou o seu estado hídrico. O bioestimulante teve um papel mais importante na promoção da EUA e da taxa de assimilação de CO₂ (mais relevante na variedade Galega). Em relação à resposta antioxidante, as duas variedades apresentaram estratégias diferentes. A variedade Galega mostrou ser menos sensível aos danos oxidativos, e a aplicação do bioestimulante aumentou a atividade da enzima antioxidante peroxidase do ascorbato, e a produção de proteínas e

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com
bioestimulante e exposta a défice hídrico

amido. Já na variedade Arbequina, o bioestimulante teve um papel mais importante ao nível do controlo dos danos oxidativos e das espécies reativas de oxigénio, aumentando o nível de antioxidantes não enzimáticos (fenóis totais). Este trabalho suporta que a aplicação deste bioestimulante favorece a *performance* fisiológica e aumenta a tolerância das oliveiras à seca.

Palavras-chave: Alterações climáticas, *Ascophyllum nodosum*, seca, stress oxidativo, olivicultura.

Abstract

The olive tree is one of the main cultures in the Mediterranean region and in Portugal. This species has a great impact in the economy of Mediterranean countries, meaning that 78% of olive oil produce worldwide is from this region. The olive tree is characterized for having a great tolerance to drought, however, the effects of climate change, particularly the joint action of various stresses, in productivity and olive fruits and oil quality has raised some concerns. In the last years, has been increase the use of biostimulants (natural active substances or microorganisms) in the agricultural sector, because their application improve the tolerance of the plant to abiotic and biotic stresses, promote water use efficiency, and improve crop yields and product quality. This work aims to study the effect of a biostimulant derived from *Ascophyllum nodosum* in the tolerance of olive tree to drought. Young potted olive trees from two cultivars, Galega and Arbequina, were divided into two groups, and one group was treated with the biostimulant. After that treatment, each group was subdivided into two, and in one group it was applied a water deficit treatment, while in the other group plants were maintained well-watered. At the end of all the treatments, leaf relative water content, photosynthesis, oxidative damages, antioxidant responses and the levels of carbohydrates (soluble sugars and starch) and proline were analyzed. Under well-watered conditions, the application of biostimulant did not affect the relative water content and photosynthesis but seems to improve the water use efficiency (WUE). Moreover, in the cultivar Arbequina, biostimulant reduced the production of H_2O_2 , and stimulated the accumulation of starch and the activity of catalase. In the cultivar Galega, despite the high levels of H_2O_2 , the biostimulant increased the levels of total soluble sugars and total phenols. Under water deficit conditions, the biostimulants did not affected the plant relative water content. However, in the cultivar Galega the water deficit treatment reduced leaf water status. The cultivar Arbequina seems more efficient in the control of the water loss. The biostimulant seems to have an important role in the promotion of the WUE, and in the increase of the net CO_2 assimilation, particularly in Galega. The olive cultivars adopted different antioxidant response strategies. Galega was less sensitive do oxidative damages, and biostimulant increased the activity of ascorbate peroxidase, the level of starch and proteins. In turn, in the cultivar Arbequina, the biostimulant acted in the control of the oxidative damages and ROS levels, and increased the levels of total phenols. This work highlights that biostimulants can improve olive physiological performance and induce drought stress tolerance.

Keywords: *Ascophyllum nodosum*, climate change, drought, oliviculture, oxidative stress.

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	5
Abstract	7
Índice	9
1. Introdução Geral	11
1.1 A emergência das alterações climáticas na região do mediterrâneo.....	11
1.2 Stresses abióticos nas plantas.....	13
1.2.1 Produção de ROS.....	13
1.2.2 Produtos do stresse por ROS.....	16
1.2.3 Efeito do stresse abiótico na fotossíntese.....	17
1.3 Respostas fisiológicas das plantas ao stresse (défice hídrico).....	18
1.3.1 Acumulação de solutos compatíveis.....	18
1.3.2 Resposta antioxidante não enzimática.....	19
1.3.3 Resposta antioxidante enzimática.....	20
1.4 Oliveira (<i>Olea europea</i> L.).....	24
1.4.1 Caracterização da espécie e produção.....	24
1.4.2 Valor comercial da oliveira.....	25
1.4.3 Variedades de oliveira.....	26
1.4.4 Mecanismos de resposta fisiológica da oliveira stresses abióticos ...	28
1.5 Bioestimulantes.....	30
2. Objetivos	33
3. Materiais e Métodos	34
3.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	34
3.2 Determinação do estado hídrico das plantas e análise da fotossíntese.....	35
3.2.1 Teor relativo em água.....	35
3.2.2 Parâmetros fotossintéticos.....	35
3.3 Quantificação do peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂).....	36
3.4 Quantificação da peroxidação lipídica (MDA).....	36
3.5 Quantificação do conteúdo em prolina.....	37
3.6 Determinação dos açúcares solúveis totais (AST) e amido.....	37
3.7 Determinação de antioxidantes não enzimáticos.....	38
3.8 Determinação da atividade antioxidante enzimática.....	39
3.9 Determinação do conteúdo total em proteínas.....	40
3.10 Análise estatística.....	40

4. Resultados	41
4.1 Teor relativo em água.....	41
4.2 Parâmetros fotossintéticos.....	42
4.3 Quantidade de H ₂ O ₂ e de MDA.....	45
4.4 Quantificação de solutos compatíveis.....	46
4.5 Antioxidantes não enzimáticos.....	48
4.6 Atividade das enzimas antioxidantes.....	50
4.7 Conteúdo total em proteínas.....	52
5. Discussão	53
5.1 Resposta fisiológica e antioxidante da oliveira ao tratamento de bioestimulante em condições de rega normal – 100% de capacidade de campo.....	53
5.2 Respostas fisiológica e antioxidante da oliveira ao tratamento de bioestimulante em condições de rega deficitária - 50% de capacidade de campo.....	55
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	60
7. Referências	62

1. Introdução geral

1.1. A emergência das Alterações Climáticas na Região do Mediterrâneo

As regiões com clima tipicamente mediterrânico ocorrem entre 30° e 40° norte e sul de latitude nas costas oeste e sul dos continentes e são muito caracterizadas por invernos amenos e co-ocorrência de altas temperaturas, e por baixa precipitação durante o Verão. Devido à alta diversidade biológica, os ecossistemas mediterrânicos foram reconhecidos como “hotspots” de biodiversidade e um alvo primário nos esforços de conservação (Myers et al., 2000). Os cenários de alterações climáticas emergentes tais como o aumento da frequência de ondas de calor, acompanhado por variações nos padrões de precipitação exercem um desafio dramático para a agricultura, particularmente para a maioria das culturas agrícolas do Mediterrâneo (IPCC, 2014a). Nesta região, são cada vez mais notórios os efeitos das alterações climáticas, nomeadamente por ações combinadas de fenómenos atmosféricos e climáticos extremos (IPCC, 2014b), influenciando muito a produtividade das culturas agrícolas desta região. Como exemplo, o Verão de 2017 foi muito severo para esta região, inclusivamente na Península Ibérica, devido aos períodos prolongados sem precipitação acompanhadas por ondas de calor e elevados níveis de radiação ultravioleta B (Haworth et al., 2018). Devido à prevalência destes múltiplos fatores de nível global e a incerteza provocada pelas múltiplas interações que existem entre eles, é expectável que as alterações climáticas afetem muito os ecossistemas mediterrânicos a vários níveis (Doblas-Miranda et al., 2013). Dado os cenários atuais de alterações climáticas, a capacidade de tolerar e enfrentar novos ambientes em mudança é crítica para as plantas da região mediterrânica, em especial para as culturas agrícolas e florestais, muitas delas com cadeias de valor de importância extrema (económico, sociocultural, ambiental) para vários desses países, como é o caso da viticultura e a olivicultura.

Estas espécies mediterrânicas, nomeadamente a oliveira, possuem mecanismos de adaptação que as ajudam a lidar com o stresse ambiental e também presumivelmente com as alterações climáticas (Matesanz and Valladares, 2014). A flora do mediterrâneo é muito diversa, sendo dominada por herbáceas, como plantas da família Asteraceae, Caryophyllaceae, Lamiaceae e Poaceae bem como plantas de porte arbustivo como as Fabaceae, Lamiaceae e Cistaceae que apresentam alguma resistência a seca (Rundel et al., 2016). No entanto, as plantas de porte arbóreo, são menos diversas do que noutros biomas semelhantes que se encontram à mesma

latitude, e com clima semelhante ao da região mediterrânica, sendo dominados pelas famílias Pinaceae e Fagaceae (Thompson, 2005). Algumas características ubíquas que estão bem estudados nestas plantas são a esclerofilia e as folhas perenes, traços foliares que têm sido associados com tolerância ao stresse hídrico e baixa disponibilidade de recursos (Mooney and Cleland, 2001). Outro exemplo de um mecanismo fisiológico de adaptação ao stresse hídrico é o melhoramento da eficiência do uso da água (EUA), quando os estomas fecham de modo a diminuir as perdas de água e o risco de falha hidráulica, sendo que, apesar de reduzir a fotossíntese, a taxa líquida de assimilação de CO₂ relativamente à condutância estomática não sofre grandes oscilações, resultando num melhor desempenho fisiológico da planta (Matesanz and Valladares, 2014).

Como referido acima, a oliveira tem alguns destes mecanismos de adaptação ao défice hídrico, sendo por isso muito usada em práticas tradicionais de olivicultura de sequeiro no mediterrâneo. Esta adaptação secular, favoreceu a sua plasticidade a condições de stresse ambiental (seca e/ou calor), e pode ser uma espécie com elevado potencial de adaptação às alterações climáticas. Por exemplo, Rubio de Casas et al. (2011) referiu que esta cultura agrícola, típica do mediterrâneo, poderá adaptar-se melhor às alterações climáticas, comparativamente com outras espécies eventualmente mais vulneráveis que possa haver nesta região.

As oliveiras apresentam uma morfologia com características xerofíticas (ex: anatomia da folha), seguindo fisiologicamente, padrões de resposta cíclica às estações do ano, características da região Mediterrânica. Assim, o período de menor atividade no Inverno é necessário, mas depende da meteorologia/temperatura dessa estação/ano. Por outro lado, o Verão mediterrânico caracteriza-se por temperaturas elevadas (são cada vez maiores os números de dias acima da média dos últimos anos), agravado pela reduzida taxa de precipitação (IPMA, 2021). Durante esta estação de maior stresse térmico e hídrico (sobretudo em pomares de sequeiro), a oliveira adota mecanismos morfo-fisiológicos de proteção contra o stresse (ex: aumenta a cutícula), reduzindo a transpiração (ex: enrolamento de folhas para melhor isolar/proteger estomas). Além disso, a ativação de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de proteção contra o stresse oxidativo, são também uma das estratégias adotadas pela oliveira para sobreviver em condições de stress.

1.2. Stresses abióticos nas plantas

1.2.1. Produção de ROS

As espécies reativas de oxigénio (ROS) desempenham um papel crucial de sinalização nos seres vivos. Contudo, a sua produção em excesso/descontrolada, é a principal causa de stresse oxidativo nas células, levando a peroxidação lipídica, danos ao nível das proteínas e ácidos nucleicos. Estes processos de oxidação de macromoléculas levam, por exemplo, a degradação membranar e mutações que podem, em casos extremos, levar à morte celular.

O aumento descontrolado dos níveis celulares de ROS, é um dos principais indicadores que se observam em células vegetais em resposta a fatores associados às alterações climáticas, por exemplo, a falta de água, calor, e radiação excessiva, pondo assim as plantas sob stresse oxidativo. As principais ROS presentes em condições de stresse oxidativo são o oxigénio singlete (1O_2), o ião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o ião hidroxilo (OH^{\cdot}) (Figura 1). As ROS são consideradas no seu conjunto radicais livres, iões e moléculas reativas produzidas a partir do oxigénio molecular, sendo que 1% desse O_2 é utilizado pelas plantas para produção de ROS (Kohli et al., 2017). Os ROS são formados a partir do metabolismo aeróbico, sendo facilmente distinguíveis de outras moléculas sinal devido à sua elevada reatividade, semi-vida, e solubilidade em lípidos (Das and Roychouhury, 2014). Tal como noutros modelos biológicos, em células vegetais, os ROS a baixas concentrações atuam como mensageiros secundários nos sinais intracelulares, intervindo em numerosas respostas de aclimação das plantas a vários stresses bióticos e abióticos, enquanto em altas concentrações são nefastos para o sistema vegetal (Kohli et al., 2017). A forma como estes atuam também depende do tipo de ROS, sendo que os iões hidroxilo têm uma reatividade não seletiva nas moléculas biológicas, enquanto o H_2O_2 e o $O_2^{\cdot-}$ têm alvos mais específicos (Das and Roychouhury, 2014). Várias enzimas existentes na célula vegetal, estão envolvidas na produção de ROS e são encontradas, sobretudo, na mitocôndria, peroxissomas e cloroplastos mas também no retículo endoplasmático, membrana e parede celular e apoplasto (Kohli et al., 2017). A produção nestes compartimentos, modela muitos processos biológicos, incluindo a degradação de enzimas e proteínas, bem como de aminoácidos, lípidos, carboidratos, pigmentos e DNA, resultando em alterações na estrutura da célula (Choudhury et al., 2013). Os processos metabólicos que levam à maioria da sua produção são sobretudo, a fotossíntese, a fotorrespiração e a respiração aeróbica (Barbosa et al., 2014), ou seja, todos os locais onde haja uma cadeia transportadora de eletrões.

O primeiro estágio de excitação do oxigénio molecular (Kohli et al., 2017) é o $^1\text{O}_2$ que, conseqüentemente, pode reagir com vários grupos de moléculas biológicas. A sua produção é maioritariamente feita nos cloroplastos estando associado ao fotossistema II (PSII). No processo fotossintético, um excesso de energia resulta no estado de clorofila tripleto que reage com três moléculas de oxigénio molecular e produz como resultado final este radical de oxigénio (Das and Roychouhury, 2014). Não há muita informação do papel na sinalização redox desta molécula, principalmente devido ao facto de ter uma semivida muito curta (cerca de 100 ns) (Niedre et al., 2002). Devido a estas características (estado de excitação e semivida curta), esta molécula reage muito rapidamente com as proteínas presentes no local da sua formação, neste caso, aquelas que estão no cloroplasto. Uma característica importante do PSII, é a sua suscetibilidade a danos induzidos pela luz, sendo a produção de $^1\text{O}_2$ no centro da reação uma das conseqüências, levando a danos irreversíveis na proteína D1 (Vass and Cser, 2009).

O ião superóxido (O_2^-), é um dos primeiro ROS formados durante um processo de stresse oxidativo em plantas (Das and Roychouhury, 2014). Este é moderadamente reativo e é considerado instável devido ao seu eletrão extra na camada de valência. Em pH fisiológico tem uma semi-vida entre 2-4 μs (Barbosa et al., 2014) formando-se a partir da redução do oxigénio molecular. A dismutação desta molécula é muito rápida e pode ocorrer espontaneamente, ou então por ação de enzimas antioxidantes (Bhattacharjee, 2010). O O_2^- pode transferir eletrões para o Fe^{3+} , reduzindo a Fe^{2+} , que conseqüentemente reduz o H_2O_2 , formando assim $\text{OH}\cdot$ e OH^- . Esta molécula tem uma capacidade de difusão reduzida em água, estando o aumento da concentração deste ROS, envolvido em processos de sinalização ao núcleo através de mensageiros secundários (Mylona and Polidoros, 2010). Este ião, é formado principalmente durante a fotossíntese, na cadeia transportadora de eletrões no PSI (Barbosa et al., 2014). A formação deste ião, também pode ser induzida pelo fecho dos estomas, resultando em baixa concentração de CO_2 devido ao défice hídrico, temperaturas elevadas ou salinidade (Dabrowska et al., 2007). O O_2^- é produzido sobretudo nos tilacóides, onde está o PSI, durante a cadeia transportadora de eletrões, podendo também ser produzido noutros compartimentos celulares, tais como nos peroxissomas, no citoplasma e no apoplasto (Mylona and Polidoros, 2010).

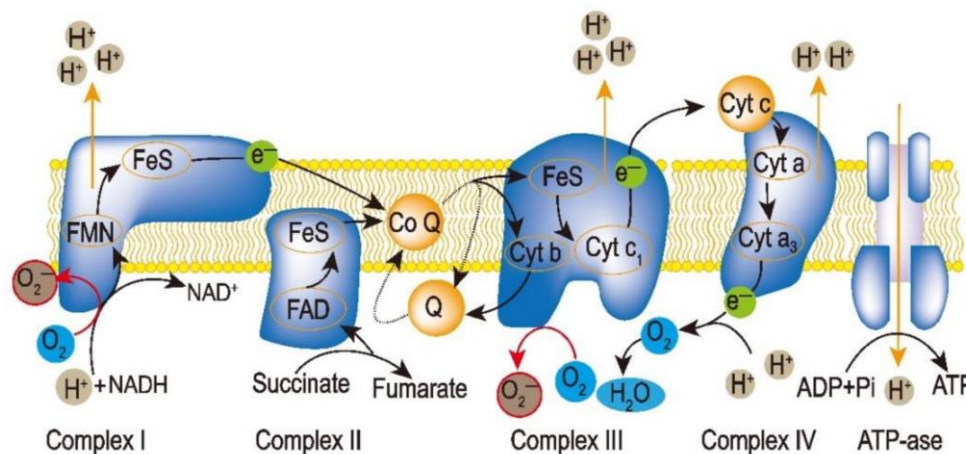


Fig.1. Esquema representativo da formação de ROS, nas cadeias transportadoras de elétrons que estão presentes no cloroplasto e na mitocôndria (retirado de Liu et al., 2021).

O íon hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) é o ROS mais reativo, sendo também um dos ROS mais tóxicos, gerado pela reação do H_2O_2 com o íon Fe^{2+} e Cu^+ a temperaturas normais e pH neutro (Barbosa et al., 2014). Por exemplo, stresse induzido por metais (arsénio), pode levar à produção de radicais $\text{OH}\cdot$, pela dismutação do $\text{O}_2\cdot^-$ na reação de Fenton e/ou na reação de Haber-Weiss (Flora et al., 2008). O $\text{OH}\cdot$ pode chegar às membranas das mitocôndrias ou dos cloroplastos, onde se encontram as cadeias transportadoras de elétrons, resultando na peroxidação lipídica da membrana mitocondrial e cloroplastidial, formando aldeídos lipídicos como o malondialdeído (MDA) (Das and Roychouhury, 2014). No entanto, apesar do aumento da sua produção levar a efeitos nefastos, algumas vezes ele pode atuar como um sinal para a regulação do metabolismo vegetal, em resposta às mudanças rápidas das condições de crescimento a que as plantas constantemente são sujeitas (Das and Roychouhury, 2014).

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), é o ROS com a semi-vida mais longa (cerca de 1ms) e também aquele que é menos reativo, atuando como um importante mensageiro secundário nas células vegetais (Barbosa et al., 2014), permitindo-lhe atravessar membranas e migrar para vários compartimentos diferentes dentro das células (Barbosa et al., 2014). No entanto, este pode também ter um efeito nocivo, por participar na reação de Fenton na formação do íon $\text{OH}\cdot$. Além disso, quando em elevadas concentrações, este também é capaz de inativar enzimas por oxidação dos seus grupos tiol (Karuppanapandian et al., 2011). Como o H_2O_2 pode atuar como mensageiro secundário, a sua produção muitas vezes é feita com o propósito de transmitir sinais dentro das células para responder a determinado tipo de stress. Por exemplo, a

fotorrespiração é um dos processos que mais gera H_2O_2 nas células fotossintéticas sendo que posteriormente a geração de H_2O_2 no peroxissoma para regeneração da ribulose bisfosfato funciona como um sinal que transfere informações para toda a célula fotossintética (Foyer et al., 2009). Na membrana plasmática o H_2O_2 é formado por ação das NADPH oxidases e na matriz extracelular são também formados por enzimas específicas do espaço apoplástico (Mylona and Polidoros, 2010). Em geral, a maior parte do H_2O_2 produzido que é usado na sinalização é gerado nos cloroplastos e nos peroxissomas representando uma quantidade 30 vezes superior ao H_2O_2 produzido nas mitocôndrias (Bhattacharjee, 2010).

1.2.2. Produtos do stresse por ROS

Uma das principais consequências da produção de ROS pelas plantas são os danos nas membranas biológicas, nomeadamente através da produção de aldeídos lipídicos. A produção destes compostos nos tecidos verdes das plantas, dá-se primeiro pela ação do 1O_2 que é produzido pelo processo fotossintético no PSII (Farmer and Mueller, 2013). Este radical faz com que as membranas dos tecidos clorofilinos fiquem altamente vulneráveis à fragmentação, levando à formação de radicais como os aldeídos lipídicos (Farmer and Mueller, 2013). Nos tecidos não clorofilinos, o 1O_2 não desempenha o papel mais importante no processo de peroxidação lipídica, sendo que o principal ROS que atua nestes tecidos é o H_2O_2 , com as reações realizadas neste tipo de tecidos, por radicais menos reativos, relativamente àquelas que se verificam nas folhas (Triantaphylides et al., 2008). As reações catalizadas por estes radicais, posteriormente, geram inúmeros compostos que podem ir desde álcoois, ácidos, epóxidos reativos, aldeídos, cetonas bem como ciclopentenonas nas membranas lipídicas (Zoeller et al., 2012). Com o aumento destes compostos, e a expansão da “pool” de peróxidos lipídicos, muitas das quais nas membranas dos plastídeos, parece haver um envolvimento na formação de dímeros não radicais glicerolipídicos. Outros radicais de maior comprimento, como alguns oligodímeros decompõem-se espontaneamente em vários compostos, sendo os dois mais importantes o 9-oxanonanoato e o malondialdeído (MDA) (Farmer and Mueller, 2013).

1.2.3. Efeito do stresse abiótico na fotossíntese

A fotossíntese é um dos primeiros processos metabólicos a serem afetados pelos fatores abióticos, com consequências ao nível das membranas como referido anteriormente.

A diminuição da condutância estomática e a redução da taxa de transpiração, é uma das primeiras respostas da planta a alguns fatores abióticos (ex: seca). Normalmente, durante episódios de seca, são observadas grandes diminuições na taxa fotossintética, e as taxas máximas de assimilação de CO₂, apenas ocorrem durante a manhã ou ao fim da tarde quando as temperaturas o permitem. A repressão da fotossíntese, é assim associada à redução da abertura estomática, para diminuição das perdas de água. No entanto, em contrapartida, pode diminuir a disponibilidade de CO₂ nos espaços intercelulares, levando à redução da taxa de assimilação de CO₂ (Ying et al., 2020). Para além destes efeitos estomáticos, a diminuição da taxa de assimilação de CO₂ em condições de stresse abiótico pode também estar relacionada com efeitos bioquímicos (Pirasteh-Anosheh et al., 2016). As enzimas do ciclo de Calvin, por exemplo a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e a frutose bisfosfatase, são muito suscetíveis a stresses abióticos, podendo ocorrer uma diminuição da sua atividade ou mesmo uma repressão da sua síntese (Ying et al., 2020).

Em plantas C₃, quando a condutância estomática diminuiu em resposta ao déficit hídrico, o rácio [CO₂/O₂] diminuiu no local catalítico da RuBisCo, levando a um aumento da fotorrespiração em plantas com este mecanismo fotossintético. A indução deste processo pelo stresse salino e pela seca está bem reportado em muitas espécies vegetais (Abogadallah, 2011). A diminuição da fotossíntese em condição de stresse abiótico, está também relacionada com a fotorrespiração, funcionando como via de escape em plantas C₃ já que esta liberta CO₂ e consome energia, diminuindo assim a energia excessiva que o fotossistema II absorve (Abogadallah, 2011). No entanto, este mecanismo, em condições severas de stresse pode não ser suficiente, pois a dissipação de energia da fotorrespiração bem como a dissipação de energia pela forma de calor, irá apenas atenuar o efeito do stresse, sendo que quando tem um efeito mais prolongado, podem ocorrer danos fotooxidativos e alterações na proteína D1 dos centros de reação do PSII (Abogadallah, 2011).

1.3. Respostas fisiológicas das plantas ao stresse (déficit hídrico)

1.3.1. Acumulação de solutos compatíveis

As alterações nos processos metabólicos das plantas, em resposta aos fatores de stresse, permite-lhes melhorar a sua performance fisiológica num ambiente em constante mudança. Uma das respostas típicas ao stresse por parte das plantas, é a acumulação de vários solutos compatíveis (ex: açúcares solúveis e prolina), bem como a remobilização das reservas energéticas das plantas (amido) de modo a ocorrerem ajustes fisiológicos durante as condições de stress, em especial por stress hídrico.

O amido é um dos principais açúcares de reserva nas plantas, sendo composto por monómeros de glucose (Zeeman et al., 2010), sendo uma molécula muito associada a órgãos de reserva como as raízes, caules subterrâneos, tubérculos, caules e sementes. O amido representa assim uma das maiores fontes de carboidratos da dieta humana mas também matéria-prima para outras atividades com benefício para o Homem (Santelia and Zeeman, 2011). Nas células que realizam a fotossíntese, o amido é sintetizado principalmente a partir do CO₂, fixado no ciclo de Calvin, sendo posteriormente armazenado nos cloroplastos, com este amido a ser designado de “temporário”, já que é sintetizado e hidrolisado dentro de um intervalo de tempo de 24 horas (Thalmann and Santelia, 2017). Este amido irá sofrer ajustes na sua taxa de hidrólise, despoletado por mudanças no fotoperíodo, de modo a fornecer uma fonte de carbono para o crescimento contínuo durante as horas de menor luminosidade do dia (Stitt and Zeeman, 2012). No entanto, contrariamente ao que se esperava, esta degradação acontece não só para a planta suportar o seu crescimento e aumentar as suas reservas energéticas, como também para mitigar os efeitos do stresse abiótico. Quando as plantas se encontram sob condições ambientais adversas, elas remobilizam o amido, de modo a providenciar glucose e energia quando o processo fotossintético começa a ser comprometido, suportando o crescimento durante o stresse, mas também funcionando assim como osmoprotetores ou solutos compatíveis, de modo a combater os efeitos nefastos do stresse (Krasenky and Jonak, 2012). Os açúcares resultantes da degradação do amido, poderão funcionar posteriormente como moléculas sinal que fazem “cross-talk” com a via dependente do ácido abcísico (ABA), para ativar componentes a jusante da cascata de sinalização em resposta ao stresse (Rook et al., 2006). A regulação transcricional é essencial na resposta ao stresse, em especial na degradação do amido, sendo que várias análises de transcriptómica, revelaram que a

indução dependente do ABA induz uma bateria de genes que são responsáveis pelo metabolismo primário dos hidratos de carbono (Choudhury and Lahiri, 2011).

Os açúcares solúveis (ex: glucose, frutose e sacarose) resultantes da degradação do amido ou da fotossíntese desempenham um papel muito importante na resposta ao stresse (Rosa et al., 2009b). Para além destes açúcares, também os polióis (ex: manitol, inositol e sorbitol) têm um papel osmorregulador (Godoy et al., 2021). Estes asseguram a manutenção do conteúdo em água das folhas e o ajustamento osmótico das plantas em condições de défice hídrico (Rosa et al., 2009b).

As alterações nos níveis de açúcares solúveis em resposta ao stresse são várias, dependendo muito do genótipo e do fator de stresse a que as plantas estão sujeitas (Rosa et al., 2009b). Além disso, em resposta ao stresse abiótico, nem todos os açúcares solúveis desempenham o mesmo papel no metabolismo em resposta às condições do meio envolvente (Rosa et al., 2009b). Diferentes tipos de açúcares são sintetizados dependendo da intensidade e do tipo de stresse abiótico a qual a planta está exposta. A sacarose e a glucose atuam ambas como substrato para a respiração celular ou como osmólitos de forma a manter a homeostasia da célula (Gupta and Kaur, 2005) mas, no entanto, a frutose já não está implicada diretamente na osmoproteção das plantas, mas sim na produção de metabolitos secundários como os fenóis e flavonóides (Rosa et al., 2009a).

A prolina é um dos compostos melhor conhecidos como osmoprotetor (Rai, 2002). Em condições de stresse (ex: seca), a planta aumenta a quantidade deste aminoácido o que permite o ajustamento osmótico da célula. Para além disso, em condições de stresse, a prolina também atua como estabilizador das membranas das células, protegendo as enzimas e funcionando como antioxidante e neutralizador de radicais livres (principalmente ROS) como o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 (Silva et al., 2018).

1.3.2. Resposta antioxidante não enzimática

A resposta antioxidante não enzimática compreende numerosos compostos que são sintetizados em resposta ao stresse abiótico, de modo a mitigar o efeito nocivo das ROS, podendo diretamente destoxificar estes radicais. Estes incluem os compostos fenólicos (ex: flavonóides), as vitaminas como o ascorbato e o α -tocoferol, e a glutatona.

O termo “metabolitos secundários” refere-se a metabolitos (ou fitoquímicos) derivados de metabolismo secundário, sem aparente implicação direta no crescimento da planta. Um dos exemplos são os compostos fenólicos que também são substrato de enzimas POX (Rajput et al., 2021). Os polifenóis, são dos maiores grupos de compostos

secundários que existem nas plantas, sendo que podem possuir anéis aromáticos simples, como também podem possuir uma estrutura mais complexa como as ligninas (Sharma et al., 2019). Outros compostos fenólicos compreendem as coumarinas, os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos. Os compostos fenólicos das plantas têm origem numa via metabólica chamada via do chiquimato ou via dos fenilpropanóides enquanto uma outra se desenvolve paralelamente a esta, a via do mevalonato, dando origem aos terpenóides (Sharma et al., 2019). Estes compostos influenciam muitas das respostas fisiológicas, grande parte delas relacionadas com o crescimento e desenvolvimento das plantas como a germinação de sementes, a divisão celular e a síntese de pigmentos fotossintéticos (Tanase et al., 2019). A acumulação destes compostos ocorre em geral quando as plantas estão sob stresse, sendo este um mecanismo de defesa para lidar melhor com fatores ambientais que possam perturbar o seu desenvolvimento (Cheynier et al., 2013). Os compostos fenólicos têm também um papel importante na neutralização das ROS, catalisando reações de oxidação com a formação de complexos metálicos mantendo assim a estrutura funcional das enzimas celulares (Cheynier et al., 2013). As plantas a crescer em condições subótimas têm uma maior tendência para biossintetizar compostos fenólicos comparativamente com plantas a crescer em condições ótimas, aumentando assim a sua capacidade para atacar radicais livres, tendo como resultado final uma diminuição da peroxidação lípica e assegurando a proteção das plantas contra os efeitos deletérios do stresse oxidativo (Shroeter et al., 2002). A acumulação de compostos fenólicos é muito importante para colmatar os impactos negativos da seca, sendo que vários estudos de transcriptómica e metabolómica levados a cabo em *Arabidopsis* corroboraram uma maior acumulação de flavonóides sob stresse hídrico, aumentando a resistência a este stresse abiótico (Nakabayashi et al., 2014). Os flavonóides que estão no citoplasma podem destoxificar eficazmente o H_2O_2 gerado pela seca sendo que após isto estes são regenerados em metabolitos primários pela ação do ácido ascórbico (Bolger et al., 2014).

1.3.2. Resposta antioxidante enzimática

As enzimas antioxidantes são uma das primeiras linhas de defesa contra as ROS. Existe uma grande variedade de enzimas nas plantas nomeadamente a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX) onde se incluem a peroxidase do guaiacol (GPOX) e a peroxidase do ascorbato (APX). Outras enzimas como a glutathione redutase (GR), a glutathione-S-transferase (GST), monodehidroascorbato redutase (MDHA) e a dehidroascorbato redutase (DHA) são

igualmente importantes, estando implicadas no ciclo ascorbato-glutationa, que desempenham um papel muito importante na homeostasia redox da célula (Figura 2).

A SOD é uma enzima catalisadora da dismutação do ião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) de modo a formar como produtos finais H_2O_2 e O_2 . As reações de dismutação são as reações em que ambas as reações de oxidação-redução ocorrem na mesma molécula (neste caso $O_2^{\cdot-}$) de um sistema biológico, dando origem a dois produtos de reação, um de estado oxidativo mais elevado (neste caso o O_2) e outro de estado de oxidação mais reduzido (H_2O_2) (Rajput et al., 2021). Esta enzima (em todas as isoformas) é de elevada importância, pois a sua eficiência na destoxificação das ROS, é considerada significativa em várias espécies de plantas, tanto no metabolismo direto da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ como no metabolismo indireto deste através, por exemplo, de fosforilações desta enzima, através de cascatas de sinalização iniciadas pelo $O_2^{\cdot-}$ (Rajput et al., 2021). Outras enzimas como as CAT e POX, funcionam em conjunto com a SOD de modo a prevenir a formação de ROS prejudiciais através do $O_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 , pela reação de Haber-Weiss, com a geração do ião altamente reativo $OH\cdot$. As enzimas SOD possuem cofatores metálicos que podem ser muito variados (Cu, Zn, Mn e Fe), que estão associados a esta enzima, fazendo com que esta tenha várias isoformas como Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD (Fink and Scandalios, 2002). A Cu/Zn-SOD está presente no citoplasma, peroxissomas, cloroplasto e no apoplasto, a Fe-SOD está presente exclusivamente no cloroplasto enquanto a Mn-SOD está presente em dois locais, na matriz mitocondrial e nos peroxissomas (Stephenie et al., 2020). O papel destes co-fatores é de estabilizar a formação da ligação transicional durante a catalização do $O_2^{\cdot-}$. Os iões metálicos Cu, Zn, Mn e Fe têm eletrões de valência 2+ devido à sua conformação estável na forma iónica (iões formados pela perda de dois eletrões da camada de valência). O ião superóxido tem um eletrão extra que posteriormente pode ser transferido para estes cofatores durante a formação dos intermediários da reação. O resultado final é que este excesso de eletrões é combinado com prótons de modo a dar H_2O_2 como produto da reação e também O_2 (Rajput et al., 2021). Assim, as características desta enzima conferem-lhe um importante papel na homeostasia redox da célula, e em geral aumenta a sua atividade em condições de stresse em resposta ao aumento dos ROS.

A CAT é outra enzima importante do sistema antioxidante, não requerendo nenhum poder redutor (cofator) para a sua capacidade catalítica, sendo uma reação que ocorre em duas etapas com o H_2O_2 a oxidar o Fe presente na CAT formando um intermediário peróxido metálico designando-se por composto I (Rajput et al., 2021). Esta pode permanecer nesta conformação se a concentração de H_2O_2 for baixa. No entanto, quando existe uma alta concentração de H_2O_2 na célula uma segunda molécula de H_2O_2

serve como substrato redutor para este composto I, regenerando o local catalítico da enzima e originando H_2O e O_2 como produtos finais (Rajput et al., 2021). O H_2O_2 é solúvel em água e tem uma semi-vida longa comparado com outros ROS. É produzido nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e regiões apoplásticas, maioritariamente por meio da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela SOD podendo ainda ser gerado pela oxidase do glicolato nos peroxissomas (Rajput et al., 2021). Concentrações baixas desta molécula servem de mensageiro secundário no desenvolvimento vegetal, sensor de stresse, amadurecimento dos frutos e eventos pós-colheita (Anjum et al., 2015), sendo que um pequeno aumento pode ser prejudicial, favorecendo a reação de Haber-Weiss com formação do ião OH^{\cdot} (Rajput et al., 2021). Assim, a CAT e a APX ajudam a planta a reduzir o excesso de H_2O_2 atingindo o balanço frágil em manter pequenas concentrações de H_2O_2 na célula. A CAT tem um Km (valor pelo qual é atingida metade da velocidade máxima de conversão da enzima) maior que a APX, sendo que a CAT é mais ativa quando a concentração de H_2O_2 é maior na célula. A APX está presente em múltiplos locais da célula modelando a atividade da enzima CAT. Tal como na SOD, também existem muitas formas da CAT, que se expressam em diferentes fases do desenvolvimento da planta e em diferentes tecidos (Anjum et al., 2016).

Outro grupo de enzimas que degrada o H_2O_2 presente na célula são as enzimas POX. As peroxidases de classe III trabalham no espaço extracelular à procura de H_2O_2 . Outras classes são as POX de classe I que englobam a citocromo c POX, CAT-POX e a APX e também existem as de classe II nas quais se incluem as peroxidases dependentes de Mn e lignases (Hiraga et al., 2001). A peroxidase do guaiacol (GPOX) utiliza o guaiacol (o-metoxifenol) como um substrato reduzido para a sua oxidação dependente da reação com H_2O_2 (Mika and Luthje, 2003). No que toca à sua capacidade antioxidante, o ciclo ascorbato-glutationa é responsável por manter a homeostasia redox da célula, através da via Foyer-Halliwell-Asada enquanto os flavonóides, os compostos fenólicos e a POX, na qual se inclui a GPOX, servem como uma segunda linha de defesa, ajudando as plantas a controlar o excesso de H_2O_2 que possa ser produzido (Agati et al., 2012). Estas enzimas também estão implicadas no desenvolvimento vegetal, sendo que para além do catabolismo do H_2O_2 e a homeostasia redox da célula, estas também estão envolvidas em processos como a reticulação (cross-link) da parede celular, a expansão da parede celular, lignificação, suberização e catabolismo de auxinas (Rajput et al., 2021). As enzimas POX atacam o H_2O_2 catalisando a oxidação de compostos fenólicos com poder antioxidante usando o H_2O_2 como aceitador final de eletrões. As reações posteriores levam à geração de radical mono-dehidro-ascorbil, ascorbato e dehidroascorbato e produtos resultantes de compostos fenólicos da lignina

ou da suberina (Rajput et al., 2021). Existem poucos estudos sobre o papel das enzimas POX a responder a stresses abióticos combinados tendo de ser feitos mais trabalhos nesta área para assim se descodificar o papel destas enzimas em resposta a várias situações de stress abiótico.

Finalmente, outra enzima antioxidante bastante importante e que tem mais sensibilidade que a CAT para o H_2O_2 , é a APX. É uma enzima de classe I dentro das peroxidases e é conhecida por estar dependente dum substrato (ascorbato) para poder realizar a sua atividade catalítica (Rajput et al., 2021). Esta enzima é muito importante tanto por estar dentro do ciclo ascorbato-glutationa como também por desintoxicar o H_2O_2 , funcionando como um sensor de alteração do estado redox das células (Caverzan et al., 2012). Estas enzimas são muito instáveis na ausência de ascorbato perdendo a sua atividade a uma velocidade muito elevada sendo que a concentração crítica de ascorbato para que tal aconteça é de $20 \mu M$, com o ferro a ser essencial para a atividade desta enzima (Rajput et al., 2021). A APX está presente no citosol e em vários organelos nomeadamente, na mitocôndria e no cloroplasto e também nos peroxissomas e nos glioxissomas (Mullen and Trelease, 2000). Durante a reação da APX é formado monodehidroascorbato, no entanto, este é muito instável e é espontaneamente convertido em dehidroascorbato. As enzimas MDHAR e DHAR são responsáveis por regenerar o ascorbato para nova reação da enzima APX sendo que usam o poder redutor para regenerar este composto a partir do monodehidroascorbato ou do dehidroascorbato, nomeadamente NADPH ou NADH para a reação catalisada pela MDHAR ou então glutatona reduzida para a reação catalisada pela DHAR (Rajput et al., 2021). Ambas as enzimas são essenciais dentro do ciclo ascorbato glutatona, e como tal, para manter a homeostasia redox da célula.

Outras enzimas como a GR, glutatona peroxidases (GPX) e (GST) são também importantes enzimas do sistema antioxidante das plantas sendo que fazem também parte do ciclo ascorbato-glutationa. Usam a GSH para combater as ROS que são formadas por stresse oxidativo havendo vários estudos que demonstram a sua eficácia no sistema antioxidante das plantas ajudando na manutenção do rácio GSH/GSSH e assim mantendo a homeostasia redox da célula (Rajput et al., 2021).

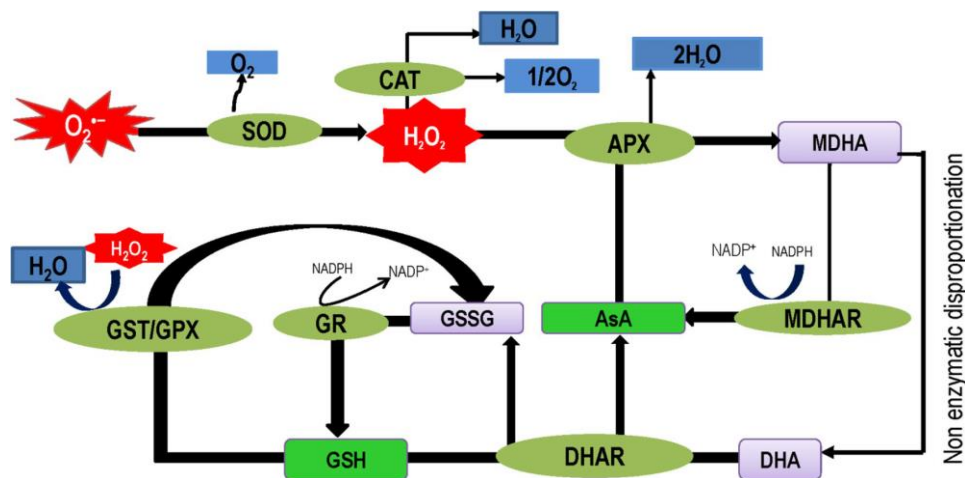


Fig.2. Esquema representativo dos substratos e produtos de reação das várias enzimas antioxidantes, bem como o ciclo ascorbato-glutationa, importante para a homeostasia redox da célula vegetal (retirado de Hasanuzzaman et al. 2018).

1.4. Oliveira (*Olea europaea* L.)

1.4.1. Caracterização da espécie e produção

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das mais importantes culturas agrícolas da bacia do Mediterrâneo com alto valor económico e ecológico (Dias et al., 2018a). Atualmente, as culturas agrícolas dos países mediterrânicos produzem a maioria do azeite consumido mundialmente, sendo que com o aumento da popularidade do uso do azeite para cozinhar e para outros consumos, a procura global por este óleo “saudável” continua a crescer (Pedrero et al., 2020). Enquanto as plantações de oliveiras prosperaram durante séculos apenas com chuva (Connor and Fereres, 2005), a produção atual de azeite ficou mais dependente da irrigação de forma a maximizar a produção, mantendo a sua qualidade (Dag et al., 2014). No entanto, na região mediterrânica, bem como noutros climas semiáridos, a água é escassa e devido às alterações climáticas é expectável que aumente a sua escassez, através do aumento de padrões incertos de precipitação, produzindo mais frequentemente secas severas e reduzindo a quantidade de chuva anual destas regiões (IPPC, 2014). Por causa disto, os produtores de oliveiras tiveram de encontrar soluções para lidar com o défice hídrico e manter a produtividade.

Os principais tipos de produção existentes em Portugal são o olival tradicional extensivo e o olival moderno. Dos 361 mil hectares de área de olival em Portugal, 37% corresponde ao olival tradicional extensivo, enquanto 63% corresponde ao olival

moderno (33% produção em copa – intensivo, e 30% produção em sebe – superintensivo) (Oliveira, 2020).

A plantação extensiva tradicional é caracterizada por baixa densidade de plantação (100 árvores ha⁻¹) com idades mais avançadas (>50 anos), muitas vezes com padrões irregulares de plantação no campo, tendo baixos níveis de colheita (1250 kg ha⁻¹), e com pouco gasto em material e mão-de-obra sendo que esta é usualmente manual e usa meios semimecânicos de colheita da azeitona (Fleskens, 2008). Este tipo de plantação, tem maior expressão na região de Trás-os-Montes e Alto Douro e nas Beiras.

Por outro lado, a plantação de olival intensivo e superintensivo tem uma alta densidade de árvores (>200 árvores ha⁻¹) novas e produtivas (≈ 20 anos), com uma colheita de azeitona de 6000 kg ha⁻¹, irrigação intensiva (irrigação gota a gota), elevada mão-de-obra e altos níveis de investimento (Fleskens, 2008). Existem outras classificações que podem ser atribuídas às culturas agrícolas de oliveiras (muito extensivas, semi-intensivas (baixo e alto investimento) e o olival biológico (Fleskens, 2008), mas estas duas que foram descritas são as mais presentes em Portugal e na Península Ibérica. Este tipo de plantação, tem maior expressão na região do Alentejo e Ribatejo.

1.4.2. Valor comercial da oliveira

A olivicultura, juntamente com a vinha, são das culturas perenes mais antigas que o Homem cultiva (Bohm, 2013). Mais recentemente, as azeitonas e o azeite foram reconhecidos como alimentos funcionais devido aos seus vários constituintes, particularmente os compostos fenólicos (como a oleuropeína) e pelas suas propriedades farmacológicas (Hashmi et al., 2015). O alto conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados (maioritariamente ácido oleico, representando 70% a 80% do conteúdo total do azeite), desempenha um importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares. Por causa do elevado valor dietético, benefícios para a saúde e importância económica, há uma grande procura no mercado e uma tendência crescente na área cultivada com oliveiras (Brito et al., 2019). Os países mediterrânicos são os principais consumidores de azeite, representando cerca de 63% do consumo mundial, correspondente a 1836,7 mil toneladas (IOC, 2020). No entanto, o seu consumo tem aumentado em países fora desta região, nomeadamente nos EUA, com cerca de 11% de consumo mundial. Em relação ao consumo total da União Europeia (EU), a Espanha é o principal consumidor, seguido pela Itália, que em conjunto, consomem quase um

terço do azeite produzido mundialmente (Sales et al., 2020). Os principais produtores são, respetivamente, a Espanha com 56% do total mundial e 79,08% na EU, seguida pela Itália e pela Grécia (Sales et al., 2020). Portugal em 2017/2018 e 2018/2019 ficou em sétimo no ranking mundial de produção de azeite (4%) tendo sido o quarto maior produtor na EU atrás dos países já mencionados. Caso assim continue, Portugal pode tornar-se o terceiro maior produtor de azeite nos próximos 10 anos, sendo que entre 2017 e 2019 gerou até 620 milhões de euros a mais do que no período homólogo de 2010 a 2012 (CONSULAI, 2020). Em Portugal existem 361 177 hectares de plantações de oliveiras sendo que 97,6% delas são usadas para produção de azeite e apenas 8773 hectares são ocupados para produção de azeitona de mesa (INE, 2020). A principal região de produção de ambos os tipos de azeitonas é o Alentejo, sendo que esta região a sul de Portugal, produz cerca de 6 900 toneladas de azeitonas de mesa e 551 400 toneladas de azeitonas para produção de azeite. A superfície ocupada no Alentejo por esta cultura agrícola para produção de azeite, é de cerca de 184 936 hectares e para azeitonas de mesa é de 3258 hectares (INE, 2020). Estes dados demonstram a dimensão da procura por azeitonas e azeite, e a grande importância económica que esta cultura tem para o PIB português. No entanto, para que se consiga suportar um aumento na sua produção, os agricultores terão de adaptar as variedades de oliveiras existentes no mercado às alterações climáticas, de modo a poderem continuar a gerar lucro com a produção de azeite e azeitonas.

1.4.3. Variedades de oliveira

A oliveira foi sendo diversificada e em muitas regiões e países do mediterrâneo assumiu diferentes tipos de morfologia, bem como diferentes tipos de composição dos óleos extraídos das azeitonas. De acordo com o catálogo nacional de fruteiras (DGAV, 2021), em Portugal existem 65 variedades de oliveiras. A variedade Galega, uma variedade portuguesa, é a mais presente no território português (cerca de 60% de todas as oliveiras do país), sendo muito típica dos olivais em modo extensivo. Esta variedade tem um porte alternado e uma rusticidade elevada (Figura 3). Tem um peso baixo dos frutos e também um endocarpo com um peso baixo a médio e um baixo rácio de fruto para a semente (Cordeiro et al., 2010). Esta variedade destaca-se pela excelente qualidade em óleos e resistência à seca, apesar da sua produção mediana, em parte devido à sensibilidade a pragas e doenças (Cordeiro et al., 2010). A variedade Galega tem uma baixa produção de azeite (inferior a 18%), no entanto, este azeite tem uma alta estabilidade (Cordeiro et al., 2010; Albuquerque et al., 2019). Esta variedade tem um

alto potencial para melhoramento/reprodução devido à grande variação intraespecífica que esta possui (Gemás et al., 2004). Muitos progressos têm sido feitos nesta variedade, particularmente na área da ecofisiologia, culturas *in vitro*, caracterização de recursos genéticos, melhoramento nos sistemas de produção e técnicas culturais, proteção fitossanitária e tecnologia de qualidade e organização de mercado (Sales et al., 2020). A produção atual desta variedade anda entre 3 e 5 toneladas por hectare (até 200 árvores por hectare em sistemas não irrigados) (Saramago, 2009). Em comparação com variedades estrangeiras a produção anda à volta de 8 a 13 toneladas em sistemas superintensivos (Tous et al., 2007). Estes dados apontam para a importância e necessidade de melhorar a produtividade nesta variedade de modo a prevenir a sua erosão genética e assim aumentar a sua atratividade para os agricultores (Sales et al., 2020). Além do mais, de modo a tornar a variedade Galega mais competitiva, é muito importante manter a sua qualidade enquanto se melhora a sua produção e adaptação aos sistemas de produção modernos (Sales et al., 2020). Para além da variedade Galega, também as variedades portuguesas Cobrançosa, Madural, Cordovil e Verdeal são muito utilizadas nos olivais nacionais de cultura extensiva e também intensiva (Cordeiro et al., 2011).

Algumas variedades estrangeiras, também muito usadas em Portugal, em particular no olival intensivo e superintensivo, são as variedades Arbequina, Picual, Arborosa e Koroneiki. A variedade Arbequina é uma variedade espanhola originária da Catalunha (Maia, 2010). Esta variedade foi introduzida em Portugal principalmente no Alentejo e Ribatejo, como uma árvore de porte médio e em forma de chorão, altamente produtiva e pouco alternante sendo a sua entrada em produção muito precoce, tendo mesmo sido a primeira cultivar bem adaptada a plantações de altas densidades (Abenoza et al., 2014) (Figura 3). Dado o seu vigor reduzido, permite a sua utilização em olivais de produção intensiva e superintensiva (Barranco, 2008). É resistente a vários fatores bióticos e abióticos, nomeadamente ao frio, à clorose férrica, e a outras doenças como o olho de pavão e a verticilose (Agustí, 2004). Ao contrário da variedade Galega, esta apresenta um bom rendimento no que toca à produção de azeite, dando origem a azeites de qualidade, mas com menor estabilidade (Barranco, 2008). A sua produtividade é muito regular, ao contrário de outras variedades, apresentando produções à volta dos 123 Kg/149 Kg por árvore quando estas têm uma densidade elevada de 357 árvores por hectare. Tal como em Galega, vários estudos já foram efetuados, nomeadamente no efeito da densidade na produção desta cultivar (Vossen, 2007), a resposta fisiológica desta cultivar aos stresses ambientais (Araújo et al., 2019), bem como o efeito do défice hídrico nos parâmetros fotossintéticos, crescimento e

produtividade em olivais de elevada densidade (Hérendez-Santana et al., 2017). De igual modo, é necessário, de modo a manter a produção elevada, e em conjunto com as alterações climáticas emergentes, que se possam desenvolver novas práticas culturais que permitam que estes olivais continuem a produzir e a competir com outras variedades de oliveiras que são atualmente cultivadas.



Fig.3. Imagem representativa das variedades em estudo. À esquerda, oliveira da variedade portuguesa Galega com parte arbóreo e copa de grandes dimensões com produções médias de azeitona; à direita, oliveira da variedade espanhola Arbequina com porte arbustivo e com copa de pequenas dimensões mas altamente produtiva de azeitonas (https://soareslopes.tripod.com/a_cultura_da_oliveira.htm; <http://www.agrotec.pt/noticias/o-rendimento-em-azeite-na-cultivar-de-oliveira-arbequina/>)

1.4.4. Mecanismos de resposta fisiológica da oliveira aos stresses abióticos

A oliveira desenvolveu inúmeros mecanismos para lidar com as condições climáticas severas da região mediterrânica. No entanto, o aumento da frequência dos fatores abióticos ligados às alterações climáticas (ex: seca e calor) nesta região, têm afetado a performance da oliveira resultando em casos extremos na redução da performance fisiológica, crescimento e da produtividade (Koubouris et al., 2015; Dias et al., 2018, 2019; Araújo et al., 2019). O défice hídrico afeta negativamente a fotossíntese desta espécie. A fase da fotossíntese dependente da luz parece tolerante às condições de seca, e usualmente a eficiência máxima do PSII (F_v/F_m) não é afetado (Abboud et al., 2019). A manutenção da eficiência fotoquímica do fotossistema II em stresse hídrico moderado e elevado sugere que a oliveira tem um mecanismo eficiente de proteção contra este stresse (Abboud et al., 2019). No entanto, as reações fotossintéticas dependentes da luz são mais suscetíveis ao défice hídrico, neste caso a fase

fotoquímica da fotossíntese. Isto resulta no decréscimo da taxa de assimilação de CO₂, fecho dos estomas e consequentemente baixas taxas de transpiração, bem como perda de pigmentos fotossintéticos e stresse oxidativo (Dias et al., 2018; Araújo et al., 2019).

As respostas da oliveira ao défice hídrico são complexas e podem envolver reduções na área foliar e na densidade estomática, aumento da esclerofilia e engrossamento da cutícula (Boughalleb and Hajlaoui, 2011). A cutícula da folha providencia uma barreira protetora entre a planta e o ambiente desempenhando um papel importante como uma barreira contra as perdas de água. De igual modo, hidratos de carbono e outros componentes da cutícula estão presentes na forma de camadas na superfície da folha, assistindo na manutenção da turgescência, através da reflexão de uma alta proporção da radiação incidente (Baker and Procopiou, 2000). Pondo de parte os mecanismos de manutenção de um índice hídrico adequado durante o défice hídrico, a acumulação de solutos compatíveis como a prolina e alguns açúcares é outro mecanismo bem conhecido contra o défice hídrico em oliveira (Sofo et al., 2004). A prolina pode acumular em altas concentrações sem danificar as macromoléculas das células e pode prevenir danos nas membranas e desnaturação das proteínas durante o stresse por défice hídrico (Ain-Lhout et al., 2001). A acumulação de hidratos de carbono em resposta à seca, pode contribuir para a osmorregulação dos tecidos, protegendo a estrutura subcelular contra a desidratação (Azoulay-Shemer et al., 2016; Araújo et al., 2019). Além disso, o aumento do amido pode representar uma maneira de manter uma abertura estomática baixa (a degradação do amido providencia oligossacarídeos de carbono para a síntese de aniões nas células guarda promovendo a abertura dos estomas) (Araújo et al., 2019).

Em condições de stresse, o excesso de luz absorvida que não é usada pelas plantas no processo fotossintético pode levar ao aumento de ROS. Quando a acumulação de ROS, como o O₂⁻, H₂O₂, OH[·], e o ¹O₂ (Choi et al., 2020), excede a capacidade de remoção do sistema antioxidante, pode induzir a peroxidação lipídica das membranas originando ácidos gordos hidroperóxidos que são tóxicos para as células. Além disso, o aumento de ROS na oliveira pode danificar as proteínas e os pigmentos fotossintéticos (Bacelar et al., 2006, 2007). Também em oliveira, a resposta antioxidante, como enzimas antioxidantes e metabolitos, tem um papel muito importante no combate ao stresse oxidativo. Em resposta à seca, a enzima GPOX e vários compostos fenólicos (ex: luteolina-7-O-glucoside, quercetina-3-O-rutinosido, apigenina-7-O-glucoside, oleuropeína e derivados de camferol) (Araújo et al., 2021; Dias et al., 2021) têm um papel muito importante na mitigação dos danos das membranas. Já na resposta à exposição a radiação elevada UV-B, várias enzimas antioxidantes como a

SOD, CAT e GPOX, e metabolitos, tais como os secoiridóides, a oleuropeína, o ascorbato e a glutatona, são importantes no combate ao stresse oxidativo (Dias et al., 2019, 2020).

1.5. Bioestimulantes

Nos últimos anos, novas abordagens têm vindo a emergir de modo a tornar a agricultura mais sustentável e resiliente. O Conselho da Indústria dos Bioestimulantes (www.biostimulants.eu) definiu “bioestimulantes de plantas” como sendo produtos contendo substâncias e/ou microorganismos cuja função quando aplicada em plantas, estimula a absorção de nutrientes e o transporte eficiente destes, a tolerância a stresses abióticos e aumenta a qualidade das culturas”. Os compostos naturais dos bioestimulantes estão classificados com base na sua fonte e na sua constituição (ex: substâncias húmicas, extratos de algas, produtos contendo aminoácidos) (Kauffman et al., 2007). Novos fertilizantes à base de bioestimulantes, estão a ser cada vez mais usados para aumentar a absorção de nutrientes e a estimular os mecanismos de tolerância ao stresse (Kunicki et al., 2010). Os bioestimulantes estão a gerar muita atenção e a ser progressivamente integrados em sistemas de produção de alto valor (ex: produções em estufa, árvores de fruto, produções de hortícolas e floricultura), aumentando a produtividade e a qualidade de uma maneira mais sustentável (Zulfiqar et al., 2020). Os bioestimulantes são compostos de origem natural em oposição aos fertilizantes agroquímicos comerciais. Os fertilizantes sintéticos podem estar menos disponíveis para as plantas e são muitas vezes aplicados em excesso em relação às normas estabelecidas (Zulfiqar et al., 2020), levando muitas vezes à contaminação dos solos e das águas subterrâneas. Como os bioestimulantes são produtos naturais (embora em variadas concentrações e combinações), tem-se verificado uma tendência global para o aumento do seu interesse na horticultura, de modo a manter a produtividade, particularmente em condições de baixo “input” de nutrientes no setor hortícola (Kerupin et al., 2014).

Atualmente os extratos à base de algas estão disseminados no seu uso como bioestimulantes de plantas (Shukla et al., 2019). Os extratos de algas constituem mais de 33% do total do mercado mundial de bioestimulantes e está estimado que o seu comércio chegue aos 894 milhões de euros em 2022 (Eef et al., 2018). Para além disso, é estimado que as macroalgas compreendam perto de 10000 espécies (Battacharyya et al., 2015). As algas castanhas como *Ascophyllum*, *Fucus* e *Laminaria*, são os grupos dominantes (Du Jardin et al., 2015). A composição bioquímica dos extratos das

macroalgas é complexa (ex: polissacarídeos, minerais, vitaminas, óleos, gorduras, ácidos, antioxidantes, pigmentos e hormonas) (Michalak et al., 2014). Portanto, perceber o seu mecanismo de ação é complicado, e muitas vezes requer uma abordagem multidisciplinar devido às múltiplas interações entre os inúmeros compostos bioativos dentro do mesmo extrato. Os extratos de algas podem ser aplicados no solo (perto das raízes das plantas) e/ou pulverizados nas folhas (Du Jardin et al., 2015). A fertilização foliar tem a vantagem de ter baixas taxas de aplicação, uma distribuição uniforme e de provocar respostas mais rápidas após a aplicação destes nutrientes (Mengel, 2002). Vários produtos comerciais baseados em extratos de *Ascophyllum nodosum* demonstraram que melhoram o crescimento das plantas ao mesmo tempo que mitigam os stresses abióticos e bióticos, fazendo efeito de “priming” nas defesas das plantas através da regulação dos processos moleculares, fisiológicos e bioquímicos (Pereira et al., 2020). Dentro dos produtos comerciais disponíveis no mercado, para aqueles que são baseados na macroalga *Ascophyllum nodosum*, muitos modos de ação destes extratos foram recentemente estudados (Shuckla et al., 2019). *Ascophyllum nodosum* pertence à família Fucaceae da ordem de macroalgas castanhas Fucales (Filo Ochrophyta, Classe Phaeophyceae). É originalmente uma espécie europeia, comum no Atlântico Nordeste (Pereira et al., 2020), mas cresce também na Península Ibérica no norte de Portugal e na Galiza. Os compostos orgânicos mais importantes presentes nestas algas são o ácido algínico, lípidos, manitol, proteínas, fibras, fucoidanos e fenóis. Outras substâncias orgânicas incluem pigmentos, vitaminas, hormonas e enzimas (Pereira et al., 2020). Estas substâncias provaram ter benefícios em certas culturas agrícolas, aumentando a produtividade (Shukla et al., 2019). Além disso, vários estudos mostraram a sua eficácia na redução dos efeitos negativos causados por stresses abióticos em várias culturas (ex: decréscimo da permeabilidade da membrana e da produção de malondialdeído, diminuiu o conteúdo em H₂O₂, aumento da atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GPOX envolvidas na destoxificação de ROS, aumento do conteúdo em ascorbato, melhoramento da absorção de Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Mo, Zn e B) (Ertani et al., 2018; Zou et al., 2019). Em oliveira, pouco se sabe acerca dos efeitos de bioestimulantes, particularmente em condições de stresse hídrico. Chouliaras et al. (2009), reportaram que a aplicação foliar de *A. nodosum* em oliveiras a crescer sob condições ótimas aumentou a qualidade dos frutos e o conteúdo em ácidos gordos, assim como a consistência da maturação das azeitonas. Também Mota and Lopes (2012) demonstraram que extratos de *A. nodosum* enriquecidos com minerais aumentavam a absorção de nutrientes em oliveiras a crescer em condições ótimas. Considerando os benefícios gerais da aplicação de bioestimulantes em plantas,

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a défice hídrico

particularmente sob condições de stresse, bem como o cenário atual de alterações climáticas e a redução da disponibilidade de água, assim como o atual aumento da procura de azeite, é fulcral investigar o potencial uso de bioestimulantes. Estes poderão aumentar a performance fisiológica da oliveira sob condições de stress (ex: aumento da fotossíntese, uso de eficiência da água e o sistema antioxidante), de modo a reduzir as necessidades de irrigação, mantendo a produção e assegurando a sustentabilidade da olivicultura.

2. Objetivos

Sendo a olivicultura um dos setores agrícolas com mais relevância em Portugal, é importante estudar estratégias que possam ajudar a manter esta produção em qualidade e quantidade, no contexto atual e no futuro com as alterações climáticas. Estas estratégias têm de ser sustentáveis relativamente à gestão de água e de agroquímicos. Em particular, a água é um recurso cada vez mais escasso, tanto para consumo humano como para uso na agricultura, de modo que se tem que rentabilizar cada vez melhor o seu uso para diminuir o seu desperdício nas produções agrícolas.

Assim, para melhor compreender a resposta da oliveira à seca bem como ao uso de métodos inovadores para melhorar a performance fisiológica da oliveira e que conduz, em última instância, a uma melhor qualidade e produtividade do azeite, duas variedades (Arbequina e Galega) de oliveiras a crescer em vaso, foram tratadas com um bioestimulante à base da alga *Ascophyllum nodosum* e expostas a condições de défice hídrico. Foi avaliado o estado hídrico das plantas, a fotossíntese, conteúdo em açúcares solúveis e amido, danos oxidativos e o sistema antioxidante (enzimático e não enzimático) das oliveiras. A escolha das variedades de Galega e Arbequina deve-se ao facto da variedade Galega ser uma variedade autóctone de oliveira cultivada em todas as regiões de Portugal normalmente sobre condições de alta precipitação, enquanto Arbequina é uma variedade espanhola normalmente usada no Alentejo e Ribatejo em produções intensivas e superintensivas com altas taxas de irrigação.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da aplicação foliar de um bioestimulante à base de *A. nodosum* na tolerância da oliveira ao défice hídrico. Em particular, pretende-se:

- Perceber se a aplicação deste composto reduz os efeitos negativos do défice hídrico no aparelho fotossintético e metabolismo do carbono nas duas variedades de oliveira;
- Verificar se a aplicação deste bioestimulante aumenta a performance fisiológica, a eficiência do uso da água e o sistema antioxidante das oliveiras em condições de bem regado e rega deficitária;
- Comparar o perfil de respostas fisiológicas e antioxidantes das duas variedades de oliveiras.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Oliveiras, *Olea europaea* L., da variedade Galega e Arbequina, com cerca de 3 anos e a crescer no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra em vasos de 3 litros com solo argiloso e turfa, foram usadas neste trabalho. Estas plantas foram cedidas pelos Viveiros Miguel Vaz, Semide, Coimbra, Portugal. No local onde estavam as oliveiras foi instalado um medidor de temperatura e humidade (*data logger*), monitorizando assim esses parâmetros em tempo real no período de aclimação e realização do ensaio. Neste período de aclimação, foi efetuada adubação com o adubo Complestal NPK 12:4:6 no estado fenológico de pré-floração e adubação com Complestal 5:8:10 no estado fenológico pós-vingamento, ambos com concentração de 6ml/L de água. Foi também efetuada suplementação com boro (0,5% de tetraborato de sódio, Borax) através de aspersão foliar na fase de pré-floração. Após a aclimação e crescimento das oliveiras, durante 17 meses, no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, para cada cultivar, foram criados quatro grupos de plantas: A) um grupo descrito como controlo (CO) (bem irrigado a 100% capacidade de campo e sem qualquer aplicação de bioestimulante, com 8 plantas da variedade Arbequina e 10 plantas da variedade Galega); B) um grupo descrito como controlo bioestimulante (CB) (plantas aspergidas com bioestimulante Fitoalgas Green© e irrigadas a 100% capacidade de campo, com 8 plantas da variedade Arbequina e 9 plantas da variedade Galega); C) um grupo descrito como seca (SO) (sem aplicação de bioestimulante e sujeitas a défice hídrico, regadas a 50% da capacidade de campo, com 9 plantas da variedade Arbequina e 10 plantas da variedade Galega); D) um grupo descrito como seca com bioestimulante (SB) (plantas tratadas com bioestimulante Fitoalgas Green© e depois sujeitas a défice hídrico, regadas a 50% da capacidade de campo a 50%, com 8 plantas da variedade Arbequina e 9 plantas da variedade Galega). Nas plantas dos tratamentos CB e SB, foi feita uma aplicação foliar por planta de 200 ml (solução com a concentração de 3ml de bioestimulante por litro de água). As aplicações do bioestimulante começaram dia 17 de março de 2020, estendendo-se depois por mais 4 aplicações, respetivamente nos dias 30 de junho, 7 de julho, 14 de julho e 7 de setembro de 2020. No dia em que foi efetuada esta última aplicação iniciou-se o período de défice hídrico nos grupos SO e SB. A quantidade de água que estava disponível nas oliveiras destes grupos (e também dos grupos CO e CB) foi controlada através de pesagens dos vasos duas vezes por semana, procedendo-se a rega controlada caso o peso estivesse abaixo dos 50% de capacidade de campo (ou 100% para o CO e CB). O tratamento de

rega deficitária durou 69 dias, sendo que nesse dia foram analisados os parâmetros fotossintéticos e o estado hídrico das plantas. No mesmo dia foram também recolhidas folhas das oliveiras que foram imediatamente congeladas em azoto líquido e guardadas a -80°C para posterior análise dos danos nas membranas, moléculas osmoprotetoras e antioxidantes enzimáticos/não enzimáticos.

3.2. Determinação do estado hídrico das plantas e análise da fotossíntese

3.2.1. Teor relativo em água

Para analisar o estado hídrico das plantas determinou-se o teor relativo em água (TRA). Foram recolhidas folhas frescas de cada tratamento, por cada variedade, e medido o seu peso fresco (Pf). De seguida as folhas foram acondicionadas em tubos com água destilada para se poder determinar o seu peso túrgido. Após 48 horas imersas nos tubos com água a 4°C, foi determinado o seu peso túrgido (Pt). A água foi removida e as folhas foram colocadas numa estufa durante cerca de 5 dias a 40° C para determinação do seu peso seco (Ps). O TRA foi calculado através da fórmula: $TRA (\%) = (Pf - Ps) / (Pt - Ps) \times 100$, segundo Smart and Bingham (1974).

3.2.2. Parâmetros fotossintéticos

Para analisar a fotossíntese, na fase dependente e não dependente da luz, foi utilizado um medidor portátil da fotossíntese (LICOR – LI-6800XT), que possui um fluorímetro e um analisador de gases por infravermelhos (IRGA). Este procedimento foi realizado nas condições ambientais de crescimento das oliveiras, entre as 11 horas da manhã e o meio dia. Foram selecionadas as folhas mais jovens, mas completamente desenvolvidas para realizar estas medições. Usaram-se as mesmas folhas de oliveira para a medição das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a*.

Para a medição da fluorescência da clorofila *a*, as folhas foram adaptadas ao escuro durante uma hora. Após este período foi determinada a fluorescência mínima (F_0) e após a aplicação de um feixe de luz ($> 1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) foi medida a fluorescência máxima (F_m). Foi calculada a eficiência máxima do PSII ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) de acordo com Maxwell e Johnson (2000).

Para determinar as trocas gasosas, foi medida a taxa de assimilação de CO_2 , a taxa de transpiração e a concentração intercelular de CO_2 *in situ* em folhas de oliveira. A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada através da fórmula: $EUA = \text{taxa de assimilação de } \text{CO}_2 / \text{taxa de transpiração}$.

3.3 Quantificação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

Para a quantificação deste ROS foi usado o protocolo feito por Dias et al. (2011). Foram pesadas cerca de 100mg de folhas previamente congeladas e maceradas num almofariz com um tampão de extração que consistiu em 1,5 mL de TCA 0,1% (w/v). Após centrifugação a 10 000g durante 10 minutos a 4° C, retirou-se 50 µL de extrato e homogeneizou-se com 50 µL de tampão fosfato 0,1M a pH 7 e 100 µL de KI 1M (2mM final). A mistura permaneceu 60 minutos no escuro e depois foi lida a absorbância das amostras num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) no comprimento de onda de 390 nm. A quantidade final de H₂O₂ (mmol g⁻¹ Ps) foi determinada através de uma curva de calibração de H₂O₂.

3.4. Quantificação da peroxidação lipídica (malondialdeído)

O mesmo extrato usado para a quantificação do H₂O₂ foi usado para a quantificação da peroxidação lipídica de acordo com Hodges et al. (1999). Uma alíquota de 125 µL de sobrenadante foi homogeneizada com 500 µL de TCA 20% (w/v) (controlo negativo). Outra alíquota de 125 µL de sobrenadante foi homogeneizada com 500 µL de TCA 20 % + TBA 0,5% (controlo positivo). Os dois controlos foram incubados a 95° C durante 30 minutos num banho-maria e findo esse período, foram retirados do banho e arrefecidos rapidamente em gelo. A absorbância do homogeneizado foi lida no espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) em comprimentos de onda de 600, 532 e 400 nm. A quantidade final de MDA, em mmol g⁻¹ Ps, foi obtida através das fórmulas:

$$A = [(Abs\ 532\ nm\ +\ TBA) - (Abs\ 600\ nm\ +\ TBA) - (Abs\ 532\ nm\ -\ TBA - Abs\ 600\ -\ TBA)];$$

$$B = [(Abs\ 440\ +\ TBA - Abs\ 600\ +\ TBA) \times 0,0571];$$

$$MDA\ equivalentes\ (nmol\ ml^{-1}) = ((A-B)/157000) \times 10^9;$$

$$MDA\ (mmol\ g^{-1}\ Ps) = (MDA\ equivalentes \times V_{extração}) / \text{peso das folhas.}$$

3.5. Quantificação do conteúdo de prolina

Amostras de folhas previamente congeladas (100mg) foram maceradas com 1,5ml de ácido sulfossalicílico a 3% segundo o descrito por Khedr et al. (2003). O extrato foi centrifugado a 10 000g durante 10 minutos. Retirou-se uma alíquota de 100 µL do sobrenadante que foi homogeneizada com 666 µL de ácido acético e 666 µL de nihidrina ácida. De seguida esta mistura de reação foi colocada num banho-maria a 100°C durante 60 minutos e posteriormente parada a reação através da sua colocação em gelo. Posteriormente foi adicionado 333 µL de tolueno à mistura de reação e, após

misturar-se bem, as amostras ficaram à temperatura ambiente até à formação de duas fases. Retirou-se a fase superior e a sua absorvância foi lida num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a um comprimento de onda de 520 nm. A quantidade de prolina ($\mu\text{g g}^{-1}\text{Ps}$) foi determinada através de uma curva de calibração da prolina.

3.6. Determinação dos açúcares solúveis totais (AST) e amido

Foi usado o protocolo desenvolvido por Irygoyen et al. (1992) para a determinação dos AST. 100 mg de folhas previamente congeladas, foram maceradas com etanol a 80% e depois colocados num banho-maria a cerca de 80°C durante 60 minutos. Findo esse tempo, foram retirados do banho e arrefecidas em gelo, sendo que após esse arrefecimento foram centrifugadas a cerca de 5 000g durante 10 minutos (4°C). Após a centrifugação, foi retirado 10 μL de sobrenadante e adicionados a 250 μL de uma solução de antrona (40 mg antrona: 1 ml dH_2O :20 ml H_2SO_4). Esta mistura foi incubada a 100°C durante 10 minutos. Findo esse tempo a reação foi parada, colocando em gelo durante cerca de 10 a 15 minutos. Após esse período foram lidas as absorvâncias a um comprimento de onda de 625 nm num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer). A quantidade de AST ($\text{mg g}^{-1}\text{Ps}$) foi determinada através de uma curva de calibração da glucose.

Para a quantificação do amido foi usado o protocolo desenvolvido por Osaki et al., (1991). 100 mg de folhas previamente congeladas foram maceradas com 1,5 mL de ácido perclórico 30%. Depois a mistura foi incubada a 60°C cerca de 60 minutos. Findo o período de incubação no banho-maria as amostras foram centrifugadas a 10 000g durante 10 minutos (4°C). Após a centrifugação, retirou-se 10 μL de sobrenadante e misturou-se com 250 μL de uma solução de antrona (40 mg antrona: 1 ml dH_2O :20 ml H_2SO_4). Esta mistura foi incubada a 100°C durante 10 minutos, sendo que, após 10 a 15 minutos em gelo, as absorvâncias das amostras foram lidas num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a um comprimento de onda de 625 nm. A quantidade de amido ($\text{mg g}^{-1}\text{Ps}$) foi determinada através de uma curva de calibração da glucose.

3.7. Determinação de antioxidantes não enzimáticos

Folhas previamente congeladas (100 mg) foram homogeneizadas com 1,25 ml de metanol segundo o descrito por Dias et al. (2018a). Após a obtenção do extrato metanólico este foi centrifugado a 5 000g durante 5 minutos (4°C) e o sobrenadante usado para a quantificação dos antioxidantes não enzimáticos.

Para a quantificação dos fenóis totais foi usado o protocolo de Pérez-Tortosa et al. (2012). Foi concebida uma mistura de reação com 380µL de água ultrapura e 25 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Esta mistura foi adicionada a 5 µL de extrato metanólico. Após agitação, as amostras ficaram a repousar cerca de 5 minutos. Findo esse tempo foi adicionado 10 µL de Na₂CO₃ 20%, e após incubação durante 30 min a 37°C a absorvância foi lida num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a um comprimento de onda de 765 nm. A quantidade de fenóis totais (µmol g⁻¹Ps) foi determinada através de uma curva de calibração do ácido gálico.

Para a quantificação dos flavonoides totais foi usado o protocolo descrito por López-Orenes et al. (2018). 3 µL de extrato de folhas foram misturados com 72 µL de metanol. Após agitação adicionou-se 75 µL de NaNO₂ a 5%. De seguida adicionou-se 75 µL de AlCl₃ a 10% e voltou a agitar-se. Após incubação no escuro cerca de 6 minutos, foi adicionado 125 µL de NaOH (1M) e de seguida a absorvância da mistura foi lida num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a um comprimento de onda de 510 nm. O nível total de flavonoides (µmol g⁻¹Ps) foi determinada através de uma curva de calibração da rutina.

Para a quantificação dos ortodifenóis foi usado o protocolo de Giertych et al., (1999). Foi usado 5 µL do extrato e homogeneizado com 40 µL de uma solução de molibdato 5% (w/v) em 50% de metanol. Após 15 minutos à temperatura ambiente a absorvância do homogeneizado foi lida num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a um comprimento de onda de 370 nm. O conteúdo em ortodifenóis (nmol g⁻¹Ps) foi determinado através de uma curva de calibração do ácido gálico.

Para a quantificação da atividade antioxidante total foi usado o método descrito por Re et al. (1999). Foi preparada uma solução de ABTS (2,20-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) e adicionada (400 µL) a 3 µL de extrato metanólico. Após incubação a 30°C durante 10 minutos, a absorvância foi lida num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a um comprimento de onda de 734 nm. A atividade total antioxidante (µmol g⁻¹Ps) foi determinada através de uma curva de calibração do ácido gálico.

3.8. Quantificação da atividade antioxidante enzimática

Folhas previamente congeladas foram usadas para a extração das enzimas antioxidantes, com base no protocolo de Dias et al. (2014b). O tampão de extração usado era constituído por um tampão fosfato de concentração 0,1M a pH 7,5; 0,2% Triton X-100 (v/v), 0,5 mM Na₂EDTA, 2 mM DTT, 1% PVP (m/v) e 1 mM de PMSF tendo sido filtrado e centrifugado a 10 000 g durante 10 minutos (4° C). Foi assim obtido o extrato para quantificar as várias enzimas abaixo descritas.

Para a quantificação da enzima CAT, foi usado o protocolo de Beers and Sizer (1952). O extrato (10 µL) foi homogeneizado com 166 µL de tampão fosfato com pH 7 e 30 µL de H₂O₂ a 6mM. Após 5 min de reação foi adicionado 1 mL de reagente de titânio (1g de dióxido de titânio com 10g de sulfato de potássio e 150ml de H₂SO₄). A mistura foi centrifugada a 10 000g durante 10 minutos (4°C). Preparou-se também um controlo com a mesma mistura de reação, mas sem extrato. A absorvância da mistura foi lida num espectrofotómetro (Jenway 7305 Spectrophotometer) a um comprimento de onda 415 nm. A quantidade de CAT foi determinada através de uma curva de calibração do H₂O₂ e a atividade da enzima calculada.

A quantificação da atividade da enzima SOD foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Agarwal et al. (2005). Para a mistura de reação foi usado 75 µL de um tampão fosfato de potássio 1M (pH 7,8), 2,25 µL de água ultrapura, 195 µL de uma solução de 0,1M de metionina, 15 µL de uma solução de 0,01M Na₂EDTA, 150 µL de uma solução 0,5M de Na₂CO₃, 9,75 µL de uma solução de 0,01M de nitroazul tetrazólio (NBT) e 50 µL de extrato das folhas. Por fim adicionou-se 3 µL de riboflavina (1mM). Para iniciar a reação as amostras foram iluminadas durante 15 minutos com uma lâmpada fluorescente de 15W. Findo esse tempo, a reação foi parada desligando a luz. Foi realizado em paralelo uma mistura não irradiada que funcionou como controlo. A absorvância das amostras foi lida num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a um comprimento de onda de 560 nm. Uma unidade de SOD (U) indica a quantidade de enzima que inibe a reação fotoquímica do NBT em 50% por minuto.

Para a quantificação da atividade da enzima GPOX foi usado o protocolo descrito por Monteiro et al. (2012). Numa cuvette, de modo a perfazer cerca de 1,5 mL, foi adicionado 15 µL de tampão fosfato a 0,1M (pH 6,1), 25 µL de extrato, 36 µL de H₂O₂ 8,8M e 1113,4 µL de água ultrapura. A reação foi iniciada com a adição de 290 µL de guaicol. O aumento da absorvância foi lida num espectrofotómetro (Jenway 7305 Spectrophotometer) a 470 nm. A atividade da enzima foi determinada através do coeficiente de extinção do tetraguaicol 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

Para quantificação da atividade da enzima APX, esta foi determinada segundo o protocolo usado por Nakado and Asada (1981). Preparou-se uma mistura de 140 μL de tampão fosfato 1M a pH 7, 20 μL de extrato e 20 μL de uma solução de L-ascorbato. A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de H_2O_2 0,01M, e a absorvância desta mistura foi lida a num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) a 290 nm. A atividade da APX foi calculada com base no coeficiente de extinção do ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.9. Determinação do conteúdo total em proteínas

Para a determinação do conteúdo total de proteínas foi usado o método de Bradford, usando o extrato do procedimento para quantificação da atividade enzimática (Monteiro et al., 2012). Para 1 mL de volume numa cuvette adicionou-se 20 μL de extrato, 200 μL de reagente de Bradford e água ultrapura (Total Protein Kit, Micro Sigma, Germany). Após incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos a absorvância da mistura foi lida num espectrofotómetro (EnSpire microplate reader da PerkinElmer) no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas foi determinada através de uma curva de calibração da albumina de soro bovino.

3.10. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados usando o programa SigmaPlot para Windows na versão 3.1. Foi feita uma ANOVA de duas vias de modo a verificar o efeito da rega e do bioestimulante, bem como a sua interação, na resposta fisiológica da oliveira e no perfil de antioxidantes. As diferenças entre grupos foram comparadas através de um teste post-hoc (Holm-Šidák) com um nível de significância de 0,05. Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão.

4. Resultados

4.1. Teor relativo em água (TRA)

Um dos primeiros parâmetros analisados foi o teor relativo em água (TRA), sendo que neste parâmetro dá indicação do estado hídrico da oliveira. Para a variedade Arbequina, não foi verificado efeito do fator rega ou do bioestimulante, assim como também não se verificou interação destes fatores (Figura 4A). No entanto, na variedade Galega, foi verificado o efeito do fator rega, apresentando as plantas bem regadas um TRA superior ao das de rega deficitária (Figura 4B).

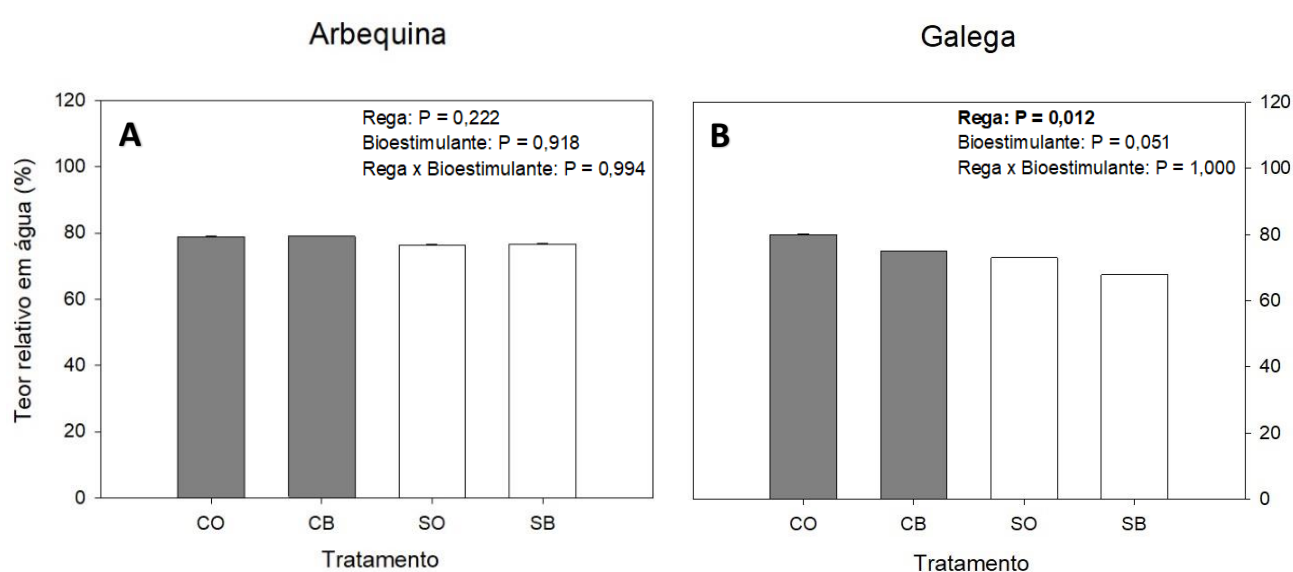


Fig.4. Teor relativo em água (TRA) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média \pm desvio padrão ($n=3-5$).

4.2. Fotossíntese

A resposta da taxa de assimilação de CO₂ (Figura 5) aos tratamentos nas duas variedades de oliveira foi diferente. Na variedade Arbequina foi observado um efeito do fator rega ($P < 0,05$) na taxa de assimilação de CO₂, e as plantas bem regadas apresentaram uma média superior à das plantas em condições de rega deficitária (Figura 5A). Na variedade Galega foi verificado uma interação entre os dois fatores rega e bioestimulante. As plantas bem regadas, CO e CB, apresentaram uma taxa de assimilação de CO₂ semelhante, mas significativamente superior às expostas a rega deficitária. Dentro do grupo da rega deficitária, as plantas do grupo SB obtiveram uma taxa de assimilação de CO₂ superior ($P < 0,05$) ao das SO (Figura 5B).

Relativamente à taxa de transpiração, nas oliveiras Arbequina foi observado um efeito do fator rega e do fator bioestimulante separadamente (Figura 5C). As plantas do grupo bem regado apresentaram uma taxa de transpiração superior às de rega deficitária, por sua vez as plantas tratadas com bioestimulante tiveram uma taxa de transpiração inferior às das não tratadas. No que respeita à variedade Galega, foi apenas verificado um efeito do fator rega, tendo as plantas bem regadas uma taxa de transpiração superior às de rega deficitária (Figura 5D).

Para a concentração intercelular de CO₂ (Ci) foi verificado, para ambas as variedades de oliveira, uma interação entre o fator rega e o fator bioestimulante (Figuras 5E e F). Em ambas as variedades, as plantas bem regadas (CO e CB) apresentaram um Ci significativamente mais baixo, e no tratamento SO foi onde se observou o Ci mais elevado ($P < 0,05$).

Em relação à eficiência do uso da água (EUA), foi verificada um efeito do fator rega e o fator bioestimulante separadamente (Figura 6A e B). As plantas do grupo bem regado apresentaram uma EUA superior ao das plantas em rega deficitária e as plantas tratadas com bioestimulante tiveram uma EUA superior aos das plantas que não tiveram tratamento.

Em relação à eficiência máxima do fotossistema II (F_v/F_m), foi apenas verificada um efeito do fator rega na variedade Arbequina, com as plantas bem regadas a apresentarem um F_v/F_m superior ao das tratadas com rega deficitária (Figuras 6C e D).

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a défice hídrico

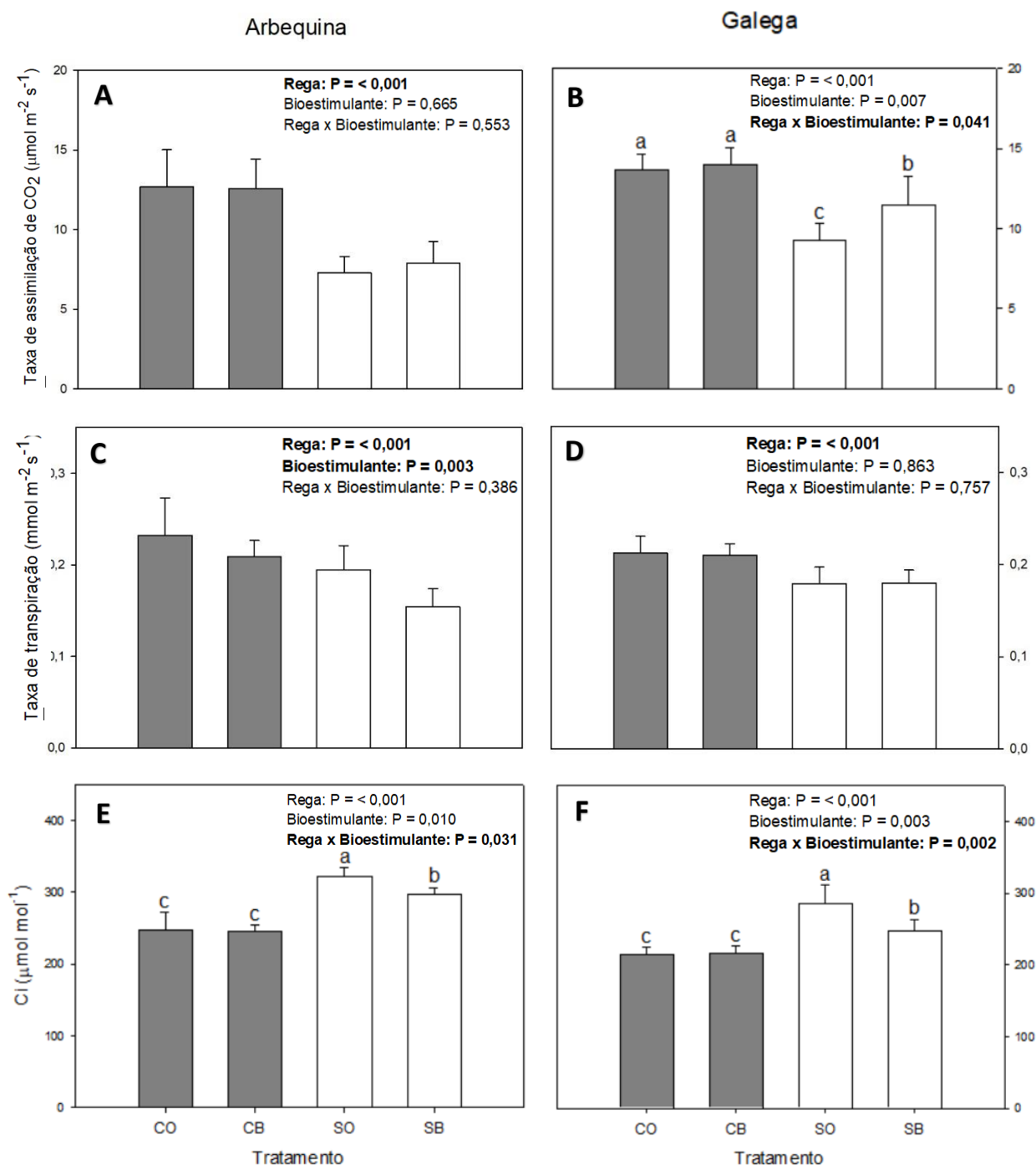


Fig.5. Taxa de assimilação de CO₂ (A e B), taxa de transpiração (C e D) e concentração intercelular de CO₂ (Ci) (E e F) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média ± desvio padrão ($n=8-9$).

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a défice hídrico

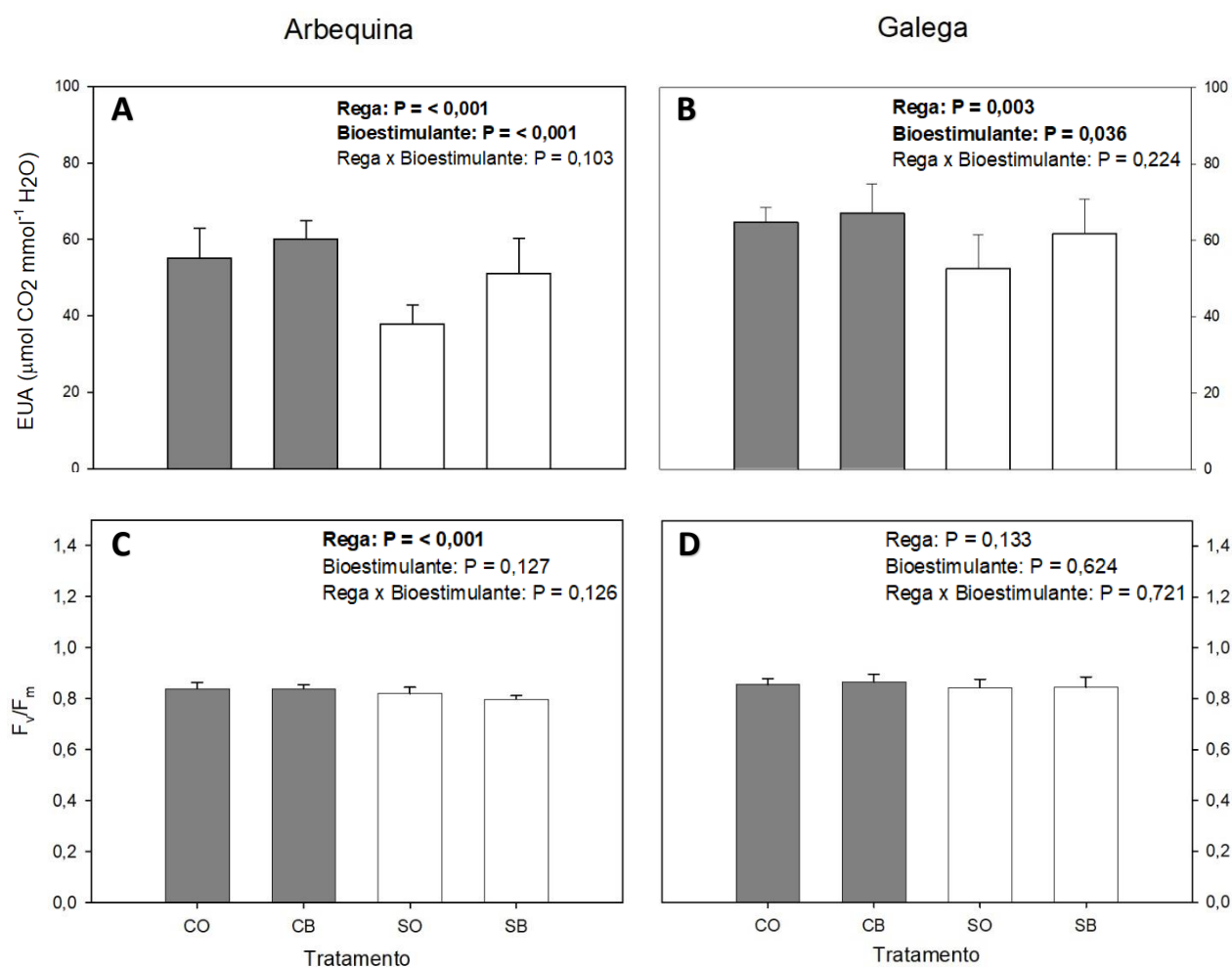


Fig.6. Eficiência do uso da água (EUA) (A e B) e eficiência máxima do fotossistema II (F_v/F_m) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média \pm desvio padrão ($n=8-9$).

4.4. Quantidade de H_2O_2 e MDA

No que toca à quantidade de H_2O_2 produzidos (Figura 7), foi verificado um efeito do fator bioestimulante na variedade Arbequina e do fator rega para a variedade Galega (Figura 7A). Na variedade Arbequina a aplicação de bioestimulante diminui o nível de H_2O_2 , na Galega a rega deficitária aumentou o nível deste ROS (Figura 7B).

Para o MDA (Figura 7C e D), foi verificada uma resposta diferente nas duas variedades de oliveira aos tratamentos estudados. Na variedade Arbequina observou-se uma interação entre o fator rega e bioestimulante. Nesta variedade, as plantas do grupo CO apresentaram o nível mais baixo ($P < 0,05$) de MDA enquanto o das do grupo

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a déficit hídrico

SO apresentaram o nível mais elevado ($P < 0,05$) deste composto. As plantas dos grupos CB e SB apresentaram um nível de MDA semelhante ($P > 0,05$). Na variedade Galega não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos.

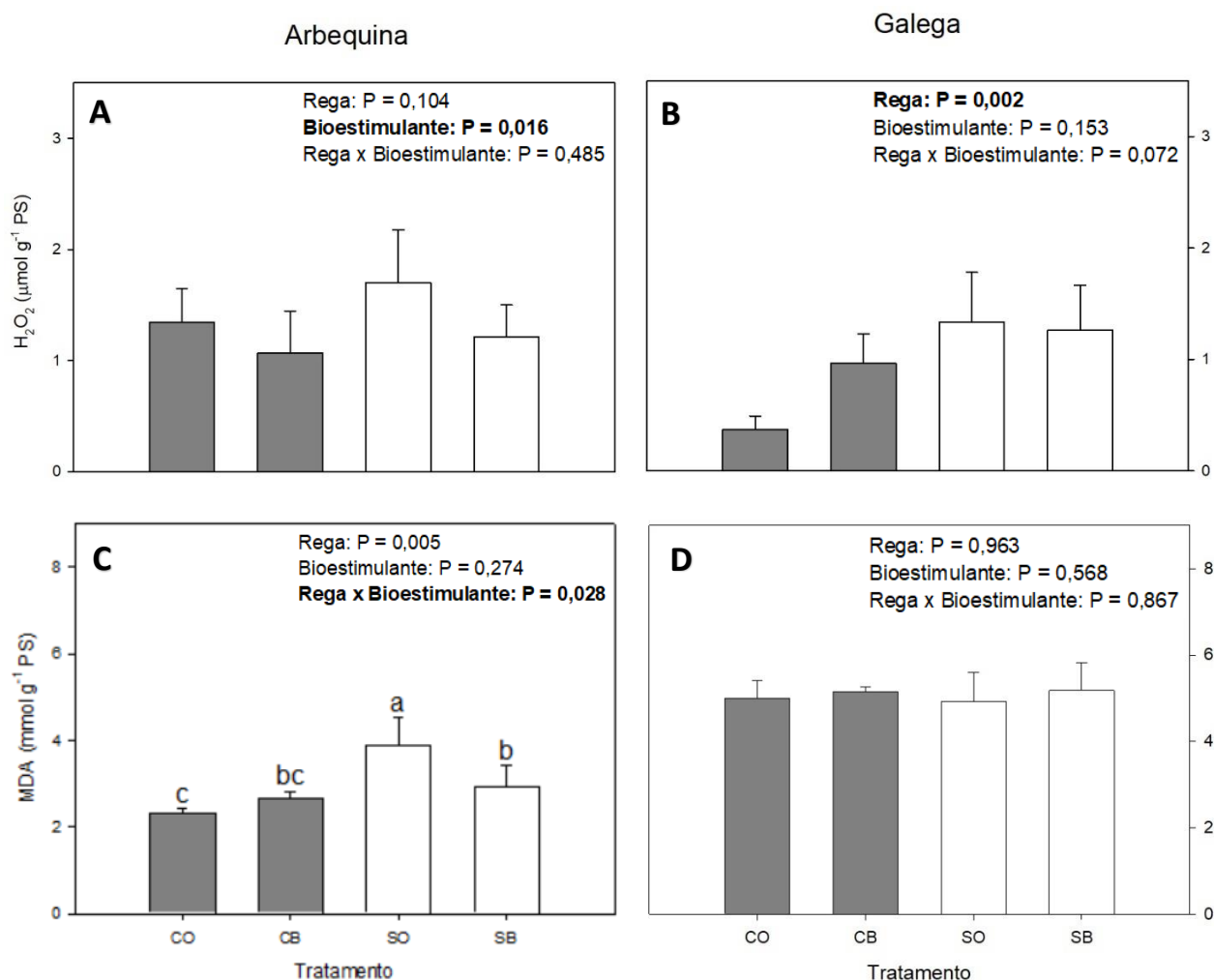


Fig.7. Nível de H_2O_2 (A e B) e de malondialdeído (MDA) (C e D) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média \pm desvio padrão ($n=5-12$).

4.5 Quantificação de solutos compatíveis

As duas variedades de oliveira apresentaram uma resposta diferente nos níveis de prolina (Figuras 8A e B). Na variedade Arbequina observou-se uma interação entre o fator rega e bioestimulante, sendo que as plantas do tratamento SO apresentaram o nível mais elevado ($P < 0,05$) deste aminoácido enquanto as do CO e CB apresentaram o nível mais baixo ($P < 0,05$). Já na variedade Galega foi observado um efeito do fator rega e bioestimulante separadamente. A rega deficitária aumentou a produção de prolina, mas a aplicação de bioestimulante diminuiu os níveis deste composto.

Em relação ao amido, verificou-se uma interação entre os fatores rega e bioestimulante na variedade Arbequina (Figura 8C), sendo que as plantas do grupo CB apresentaram o maior conteúdo em amido ($P < 0,05$) e as da rega deficitária, grupo SO e SB, o menor conteúdo ($P < 0,05$) deste carboidrato. Na variedade Galega apenas se verificou um efeito do fator rega e bioestimulante separadamente, sendo que as plantas em rega deficitária apresentaram níveis de amido mais baixos que o das plantas bem regadas (Figura 8D). As plantas tratadas com bioestimulante apresentaram um nível de amido maior do que aquelas sem tratamento.

No que toca aos AST, na variedade Arbequina observou-se um efeito do fator rega, e as plantas em rega deficitária apresentaram o maior nível de AST (Figura 8E). Na variedade Galega foi verificada uma interação significativa entre os dois fatores. As plantas do grupo CB obtiveram o maior nível ($P < 0,05$) de AST, e as plantas em rega deficitária, os grupos SO e SB, o nível mais baixo ($P < 0,05$) destes açúcares (Figura 8F).

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a défice hídrico

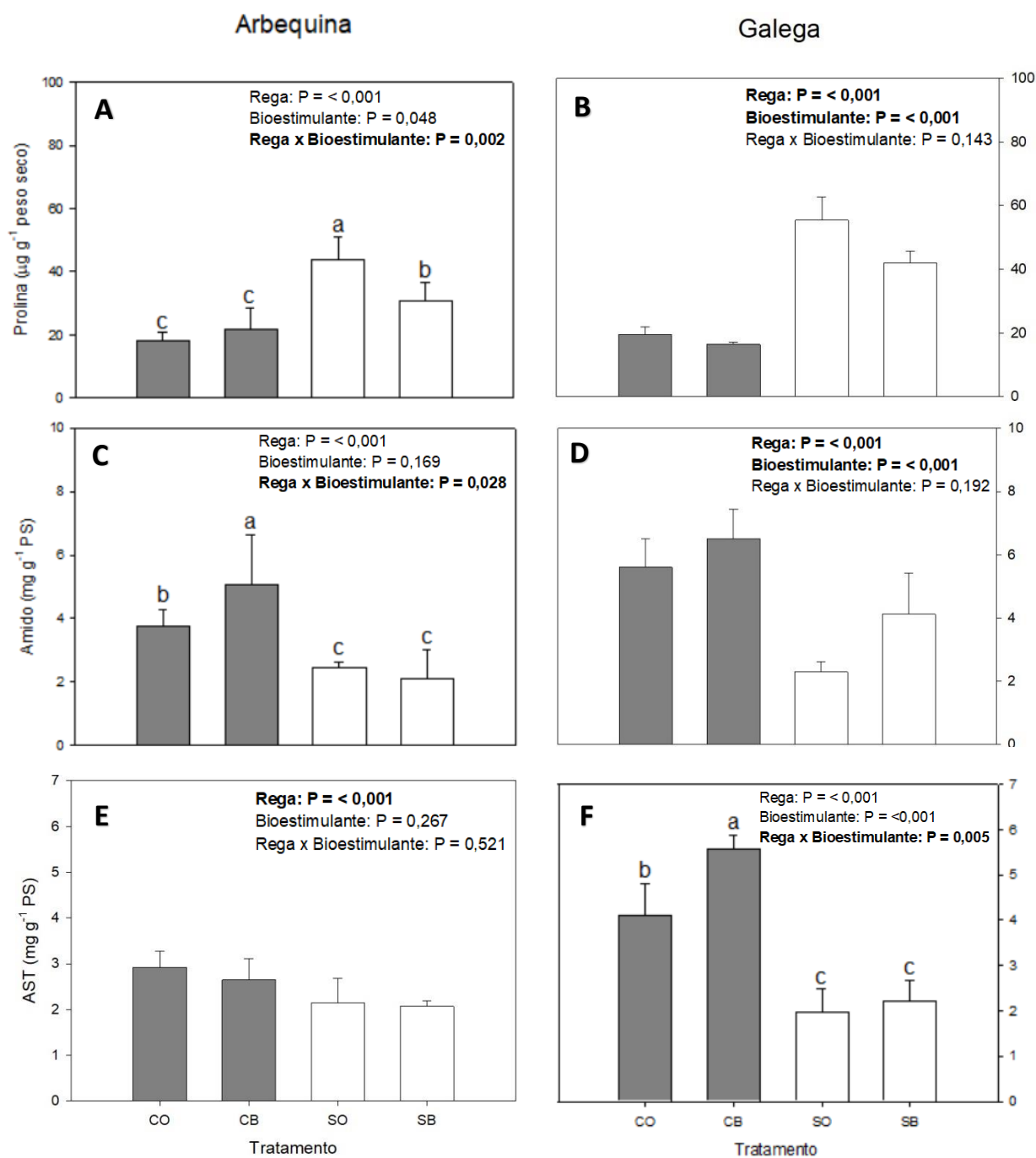


Fig.8. Quantidade de prolina (A e B), açúcares solúveis totais (AST) (C e D) e amido (E e F) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média \pm desvio padrão ($n=5-8$).

4.6. Antioxidantes não enzimáticos

Em relação às defesas antioxidantes da oliveira (Figura 9), tanto na variedade Arbequina como na Galega, foi verificada uma interação entre o fator rega e o fator bioestimulante (Figuras 9A e B). Em relação à variedade Arbequina, as plantas tratadas com bioestimulante em rega deficitária (SB) evidenciaram-se com o maior conteúdo ($P < 0,05$) em fenóis totais. Na variedade Galega, foram também as plantas tratadas com bioestimulantes, mas em regime de rega normal (CB), que apresentaram o nível de fenóis totais mais elevado ($P < 0,05$).

Na análise dos flavonoides totais, na variedade Arbequina, foi verificado um efeito tanto do fator rega como do fator bioestimulante (Figura 9C). A rega deficitária diminuiu o nível destes antioxidantes, mas a aplicação de bioestimulante favoreceu a sua acumulação. Para a variedade Galega foi apenas verificado um efeito da rega, onde as plantas em rega deficitária mostraram um nível de flavonoides inferior ao das bem regadas (Figura 9D).

Na quantidade de ortodifenóis, apenas foi verificada uma interação para a variedade Galega. As plantas tratadas com bioestimulantes e expostas a rega deficitária (SB) obtiveram o nível de ortodifenóis mais baixo ($P < 0,05$) (Figura 9F). Na variedade Arbequina verificou-se apenas um efeito do fator rega, sendo que a quantidade de ortodifenóis aumentou com a aplicação da rega deficitária (Figura 8 E).

Relativamente à capacidade antioxidante total (ABTS), foi verificada uma interação entre os dois fatores na variedade Arbequina. As plantas tratadas com bioestimulante e expostas a rega deficitária (SB) apresentaram a menor ($P < 0,05$) capacidade antioxidante total, seguida das do grupo SO. As plantas do grupo bem regado, CO e CB, obtiveram uma capacidade antioxidante total semelhante (Figura 9G). Para a variedade Galega foi verificada um efeito do fator rega e do fator bioestimulante separadamente (Figura 9H). As plantas bem regadas apresentaram maior capacidade antioxidante total, mas o bioestimulante promoveu esta capacidade.

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a défice hídrico

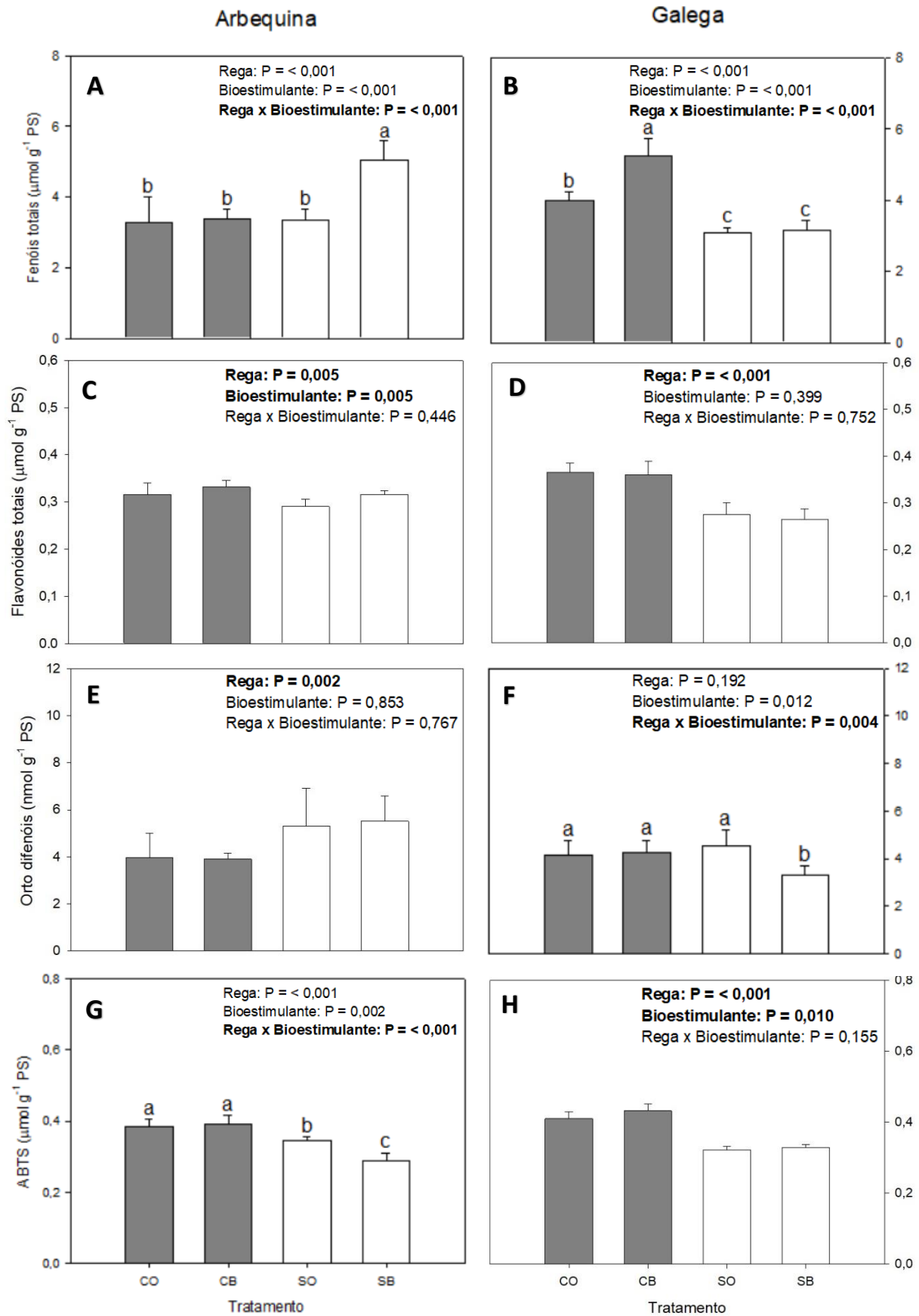


Fig.9. Conteúdo de fenóis totais (A e B), flavonóides totais (C e D), ortodifenóis (E e F) e ABTS (G e H) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média \pm desvio padrão ($n=6-8$).

4.7. Atividade das enzimas antioxidantes

No que diz respeito à parte antioxidante enzimática da oliveira (Figura 10), em relação à enzima CAT, foi verificada uma interação entre os dois fatores para ambas as variedades (Figuras 10A e B). No caso da variedade Arbequina, o grupo de plantas bem regado (CO) foi onde se verificou a atividade mais baixa ($P<0,05$), os outros 3 grupos apresentaram atividades semelhantes ($P>0,05$) (Figura 10A). Na variedade Galega, foi no grupo SB, plantas tratadas com bioestimulante e em rega deficitária, onde se obteve a menor ($P<0,05$) atividade da CAT, seguido do grupo SO (Figura 10B).

Em relação à SOD, não foram verificadas quaisquer diferenças significativas para a variedade Galega (Figura 10D). Na variedade Arbequina foi verificada uma interação entre os dois fatores em estudo, sendo que se verificou que as plantas do grupo de rega deficitária (SO) apresentavam a atividade mais elevada ($P<0,05$) da SOD, seguido das plantas do mesmo grupo, mas com aplicação de bioestimulante (SB) (Figura 10C).

Relativamente à atividade da GPOX, na variedade Arbequina verificou-se um efeito do fator rega e do fator bioestimulante (Figura 10E). A aplicação da rega deficitária diminuiu a atividade da GPOX, e o bioestimulante reduziu essa atividade. Na variedade Galega observou-se uma interação entre os dois fatores, rega e bioestimulante, sendo que as plantas em rega deficitária do grupo SO apresentaram a atividade mais elevada ($P<0,05$) desta enzima (Figura 10F).

Quanto à atividade da APX, apenas na variedade Galega se observaram diferenças significativas (Figuras 10G e H), uma interação entre os dois fatores. As plantas tratadas com bioestimulante em rega deficitária (SB) apresentaram a atividade mais elevada desta enzima ($P<0,05$).

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com bioestimulante e exposta a déficit hídrico

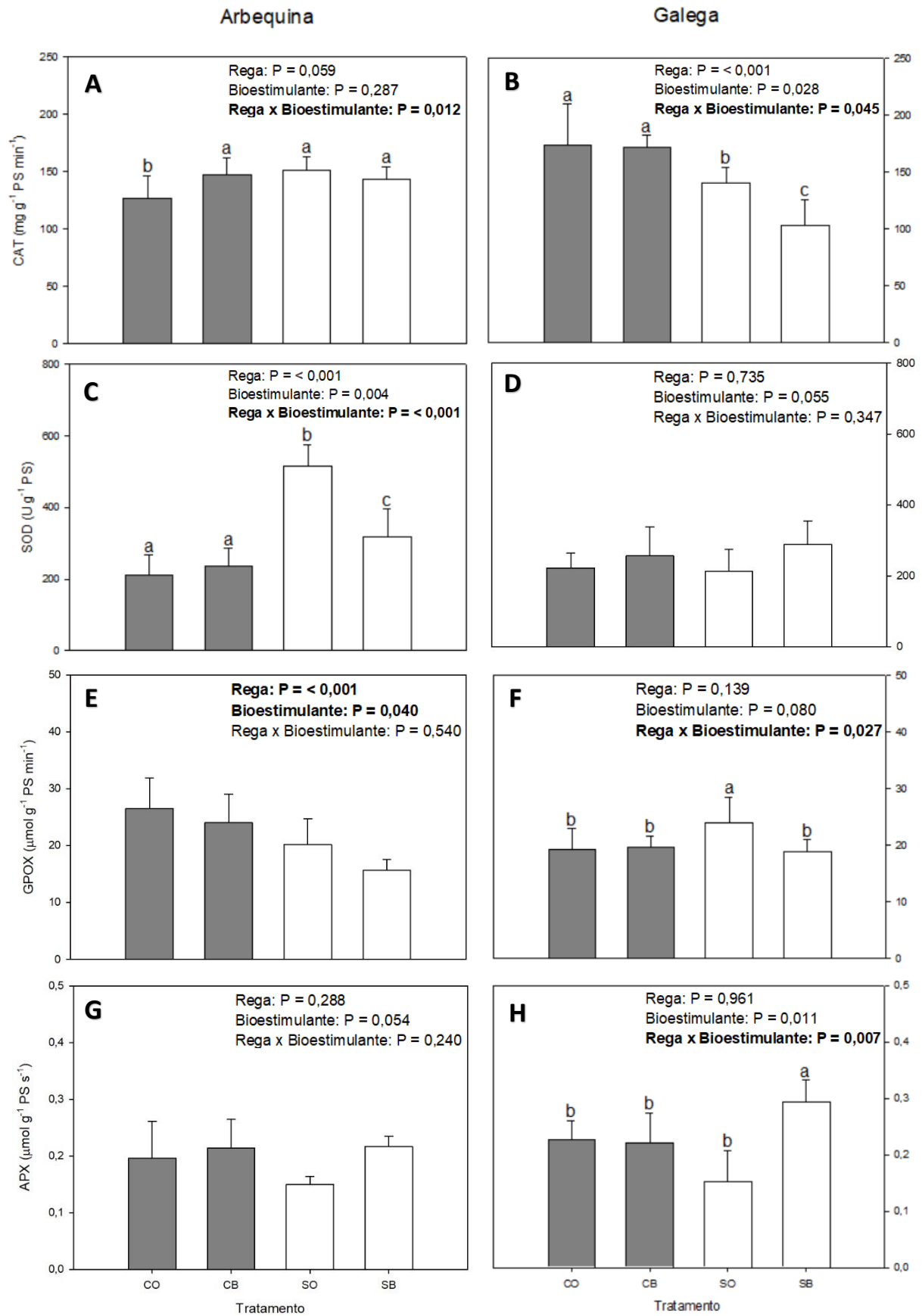


Fig.10. Atividade enzimática da catalase (CAT) (A e B), superóxido dismutase (SOD) (C e D), peroxidase do guaiacol (GPOX) (E e F) e peroxidase do ascorbato (APX) (G e H) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média \pm desvio padrão ($n=3-8$).

4.8. Conteúdo total em proteínas

Quanto ao conteúdo de proteínas totais, foi verificada uma interação entre os dois fatores analisados para ambas as variedades (Figuras 11A e B). Relativamente à variedade Arbequina, verificou-se que as plantas do grupo SO em rega deficitária apresentavam um nível de proteínas semelhante ($P>0,05$) a SB, mas inferior ($P<0,05$) às bem regadas com e sem bioestimulante, grupos CO e CB (Figura 11A). Já na variedade Galega foi verificado que as plantas em rega deficitária, SO, apresentavam um conteúdo em proteínas mais baixo ($P<0,05$) (Figura 11B).

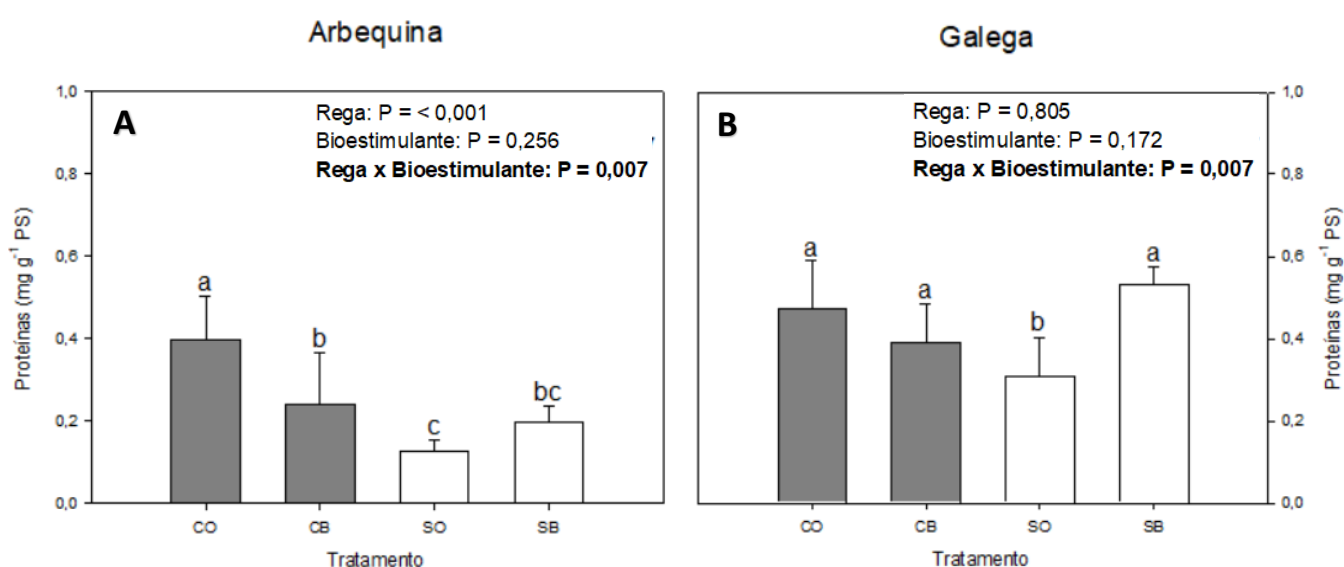


Fig.11. Conteúdo em proteínas (A e B) para as variedades de oliveira Arbequina e Galega relativamente aos tratamentos de rega a 100% capacidade de campo (CO), rega a 100% capacidade de campo com bioestimulante (CB), rega a 50% da capacidade de campo (SO) e rega a 50% capacidade de campo com bioestimulante (SB). Valores representam média \pm desvio padrão ($n=4-7$).

5. Discussão

5.1. Respostas fisiológica e antioxidante da oliveira ao tratamento de bioestimulante em condições de rega normal - 100% de capacidade de campo

Os bioestimulantes tem vindo a ser descritos como compostos que melhoram o desempenho fisiológico de muitas hortícolas e frutícolas (Shuckla et al. 2019). Neste trabalho, verificou-se que a aplicação de um bioestimulante à base de *A. nodosum*, em condições de rega normal, não alterou o estado hídrico nem promoveu a fotossíntese das oliveiras das duas variedades. Num trabalho realizado por Almadi et al. (2020), em oliveiras da variedade Leccino, a aplicação de um bioestimulante à base de *A. nodosum* melhorou a taxa de assimilação de CO₂ e aumentou a condutância estomática. Já em tomateiro, Yao et al. (2020) demonstraram que, para além da melhoria da taxa fotossintética e da condutância estomática, também o nível de pigmentos fotossintéticos aumentou, após o tratamento com um bioestimulante à base da mesma alga.

O parâmetro EUA é considerado muito importante, pois dá indicação da quantidade de água que se perde na transpiração em relação a uma determinada quantidade de matéria seca (Pereira-Netto et al., 2012). O bioestimulante parece favorecer o EUA em condições de rega ótima. Em alguns trabalhos onde foi usado um bioestimulante à base de ácido fúlvico, verificou-se que este diminuía a perda de água em várias espécies (ex: trigo), devido à redução da condutância estomática, o que se traduziu numa melhoria do EUA (Nardi et al., 2002), aspeto cada vez mais relevante para a gestão de água na produção agrícola.

A eficiência máxima do PSII, F_v/F_m , também não parece ser influenciada pelo bioestimulante. No entanto, num estudo realizado por Chrysargyris et al. (2018), foi verificado que a aplicação foliar de um bioestimulante, também à base de *A. nodosum*, aumentava o F_v/F_m em alface, o que aponta para a necessidade de estudar a influência deste bioestimulante em função do genótipo/espécie, e/ou condições ambientais, cuja interação é ainda desconhecida.

Em linha com a resposta da fotossíntese, também os níveis de carboidratos (AST e amido) foram sensíveis ao tratamento com bioestimulante. Contudo, em feijoeiro, Kocira et al. (2020) verificou uma diminuição da acumulação de amido após aplicação de um bioestimulante à base de *Ecklonia maxima*, uma alga originária da África do Sul. Num estudo levado a cabo por Yao et al. (2020) em tomateiro, este observou que a

aplicação de o bioestimulante, também à base de uma alga, *Sargassum horneri*, reduzia a produção de AST, em condições de rega normal.

Os vários constituintes dos bioestimulantes, como por exemplo os aminoácidos, tem um papel muito importante no armazenamento e transporte do azoto nas plantas (Calvo et al., 2014). Arafa et al. (2012), Farouk (2015), Mystkowska (2018) e Mystkowska et al. (2018), reportaram um aumento do nível de proteínas em plantas tratadas com bioestimulantes. Em oliveira foram obtidos resultados diferentes. Na variedade Galega, o bioestimulante não afetou o conteúdo de proteínas, mas na variedade Arbequina este composto baixou os seus níveis indicando uma repressão da sua produção ou aumento da sua degradação. No caso do aminoácido prolina, frequentemente associado a condições de stresse e sobretudo a seca, este bioestimulante não parece afetar o seu nível. Contudo, Kocira et al. (2020) relataram um decréscimo na acumulação deste aminoácido em feijoeiro tratado com o bioestimulante à base de *E. maxima*.

Mesmo em condições ótimas de crescimento, a produção de ROS nas plantas constitui um fenómeno natural do metabolismo celular. Neste trabalho, o bioestimulante não aumentou nem a produção de H₂O₂ nem a peroxidação lipídica. Resultados semelhantes foram obtidos por Islam et al. (2021), em que este verificou que a aplicação do bioestimulante cúprico-clorofilino à base de plantas, em *Arabidopsis thaliana*, também não alterou os níveis de H₂O₂. Turan et al. (2021) observou que a aplicação de um bioestimulante à base de microorganismos (bactérias) em tomateiro tinha efeitos antioxidantes, reduzindo os níveis de peroxidação lipídica.

Para além das vantagens da aplicação de bioestimulantes no aumento do crescimento e produção de muitas culturas, os bioestimulantes também estão descritos como agentes que estimulam a atividade antioxidante das plantas (Shuckla et al., 2019). Neste trabalho em oliveira, a variedade Galega parece mais responsiva ao bioestimulante aumentando os níveis de fenóis totais. Resultados similares foram descritos por Kocira et al. (2020) em tomateiros tratados com um bioestimulante à base da alga *E. maxima*. O mesmo autor também verificou que os níveis de flavonoides totais não respondem à aplicação de bioestimulante, mas a atividade total antioxidante (ABTS) foi estimulada. Em relação aos antioxidantes enzimáticos, a variedade Arbequina foi mais responsiva ao bioestimulante, promovendo a atividade da enzima CAT. Resultados diferentes foram descritos por Murtic et al. (2019) e Turan et al. (2021), em tomateiros tratados com vários tipos de bioestimulantes à base de *A. nodosum* e com microorganismos, onde a atividade da CAT não foi afetada ou diminuiu, respetivamente. Na oliveira, o bioestimulante não alterou a resposta das outras enzimas antioxidantes.

Resultados similares foram descritos por Murtic et al. (2019), em tomateiro, para a enzima SOD e GPOX, mas Turan et al. (2021), na mesma espécie, já registou uma diminuição da atividade destas enzimas depois da aplicação de *A. nodosum*. Em relação à enzima APX, Murtic et al. (2019) observou uma diminuição da sua atividade no tomateiro tratado com o mesmo bioestimulante, mas Akhtar et al. (2020), em milho, não obteve alterações na atividade da desta enzima.

5.2 Respostas fisiológica e antioxidante da oliveira ao tratamento de bioestimulante em condições de rega deficitária - 50% de capacidade de campo

Neste trabalho, verificou-se que a aplicação de bioestimulante em condições de rega deficitária, não alterou o estado hídrico das oliveiras. Contudo, em termos de resposta à rega deficitária, as duas variedades responderam de forma diferente. A variedade Arbequina parece ser mais tolerante, uma vez que a rega deficitária não afetou o estado hídrico da planta. Já as plantas da variedade Galega, expostas ao défice hídrico, sofreram uma perda de água, pois apresentaram um TRA inferior ao das plantas bem regadas. A oliveira é reconhecida por ser uma espécie bem adaptada a condições de seca (Fernández, 2014). Esta espécie desenvolveu vários mecanismos responsáveis por esta tolerância, nomeadamente uma elevada capacidade de controlo da abertura estomática e acumulação de solutos compatíveis (ex: polióis, açúcares e aminoácidos, tal como a prolina) (Fernández, 2014; Silva et al., 2018; Brito et al., 2019). Num trabalho realizado por Dias et al. (2018), em várias variedades de oliveira, a crescer em vaso e sem serem regadas durante 20 dias, as oliveiras da variedade Cobraçosa conseguiram manter o TRA, mas nas variedades Cordovil de Serpa e de Castelo Branco houve diminuição da disponibilidade de água. Também num trabalho de Santaniello et al. (2017), em oliveiras da variedade Arbequina expostas a stresse salino e tratadas com bioestimulante à base de *A. nodosum*, este também não afetou o TRA.

A aplicação de bioestimulante não afetou a taxa de transpiração, parâmetro relacionado com a abertura estomática, mas a rega deficitária induziu uma redução da abertura estomática. Esta resposta (diminuição da abertura estomática) foi eficaz na variedade Arbequina, prevenindo a perda de água (manteve o TRA). No entanto, na variedade Galega, não foi suficiente, uma vez que a disponibilidade de água baixou. Noutros trabalhos, onde foram aplicados tratamentos de rega deficitária com capacidade de campo inferior a 50% (Bacelar et al., 2006; Silva et al., 2018), as oliveiras não conseguiram manter o estado hídrico, reduzindo assim o TRA das folhas. Num

trabalho de Bueno et al. (2021), verificou-se ainda que em oliveiras da variedade Arbequina expostas a stresse salino, a taxa de transpiração diminuiu em resposta a um bioestimulante à base *A. nodosum*.

A acumulação de hidratos de carbono em resposta à seca pode contribuir para a osmorregulação dos tecidos, protegendo as estruturas celulares da desidratação (Azoulay-Shemer et al., 2016). Araújo et al. (2019), observou um aumento dos AST em oliveiras da variedade Arbequina expostas a défice hídrico durante um mês, mas esta resposta não foi suficiente para manter a hidratação das folhas de oliveira. Tal não se verificou no presente trabalho na variedade Galega, onde se observou uma diminuição dos níveis de AST e TRA. O bioestimulante não afetou os níveis de AST em condições de rega deficitária nas duas variedades de oliveira. Num trabalho desenvolvido por Moolphuerk and Pattanagul (2020) com plantas de arroz tratadas com um bioestimulante à base de quitosano, e em condições de rega deficitária, também não se observou alteração dos níveis de AST. Noutro trabalho desenvolvido por EI-Mageed et al. (2017), mas em plantas de abóbora, aplicando um bioestimulante à base de extratos de *Moringa oleifera*, na estação do ano mais seca, aumentou o conteúdo em AST.

A prolina é igualmente considerada um importante osmoprotetor das células, sendo que em oliveira o aumento da sua concentração foi relacionado com um ajustamento osmótico para manter a turgescência celular (Bacelar et al., 2006; Silva et al., 2018), sendo a sua concentração elevada um indicador de stresse abiótico. Neste trabalho, o défice hídrico aumentou a disponibilidade deste aminoácido em ambas as variedades, contudo, apenas na variedade Arbequina, a hidratação celular (TRA) foi mantida. O bioestimulante diminuiu a acumulação deste aminoácido nas duas variedades, sugerindo uma menor situação de stresse nestas plantas (SB). Resultados semelhantes foram descritos por Campobenedetto et al. (2021). Estes autores verificaram que em plantas de tomateiro expostas a défice hídrico, a aplicação do bioestimulante à base de *A. nodosum* e de *Laminaria digitata*, os níveis de prolina desciam para valores próximos do grupo controlo.

A rega deficitária durante 69 dias apesar de só ter alterado o estado hídrico da variedade Galega, não afetou a eficiência máxima do fotossistema II (F_v/F_m) desta variedade, mas diminuiu na variedade Arbequina. Contudo, os valores obtidos encontram-se dentro do intervalo 0,75 e 0,80 que indica que as plantas estão saudáveis (Dias et al., 2018a). Noutras variedades de oliveira a aplicação de seca e outros stresses abióticos manteve ou reduziu o valor de F_v/F_m , mas os valores obtidos também estiveram dentro do intervalo 0,75-0,80 (Dias et al., 2018; Silva et al., 2018). A aplicação de bioestimulante nas duas variedades de oliveira parece não afetar este parâmetro.

Resultados semelhantes foram descritos por Santaniello et al. (2017) mas em plantas de *A. thaliana* expostas a condições de défice hídrico e tratadas com *A. nodosum*.

Ao contrário do verificado para o F_v/F_m , o défice hídrico afetou a taxa de assimilação de CO_2 nas duas variedades. Contudo, o tratamento com bioestimulante em condições de rega deficitária (SB) melhorou esta resposta apenas na variedade Galega. Estes resultados estão em linha com os trabalhos realizados em outras espécies (ex: morango, tomate e milho), onde se demonstrou que a aplicação de bioestimulantes à base de *A. nodosum* melhorou a resposta aos stresses abióticos nestes parâmetros (Bulgari et al., 2019; Shuckla et al. 2019; Kerchev et al., 2020). A descida da taxa de assimilação de CO_2 nas duas variedades de oliveira pode estar associada com efeitos estomáticos (diminuição da disponibilidade de CO_2 nos espaços intercelulares), diminuição da disponibilidade de NADPH ou ATP, ou efeitos bioquímicos (Ying et al., 2020). A diminuição da abertura estomática, para prevenir a perda de água, é uma das primeiras linhas de defesa das plantas ao défice hídrico (Dias et al., 2014).

As duas variedades de oliveira, responderam ao défice hídrico, diminuindo a abertura estomática, mas esta resposta não diminuiu a entrada de CO_2 nas folhas pois o C_i (disponibilidade de CO_2 nos espaços intercelulares) manteve-se elevado (acima dos tratamentos bem regados). Para além disso, o tratamento de rega deficitária sem bioestimulante (SO) apresentou um C_i superior ao do mesmo tratamento com bioestimulante (SB). Isto sugere que o bioestimulante (SB) pode estimular mais a fixação de CO_2 , provavelmente para a realização da fotossíntese. Esta hipótese, pode ser em parte corroborada para a variedade Galega pelo facto da taxa de assimilação de CO_2 ser superior no tratamento SB, quando comparado com o SO.

Os níveis elevados de C_i nas duas variedades de oliveira associados a uma taxa de assimilação de CO_2 mais reduzida no tratamento de rega deficitária, pode sugerir que limitações bioquímicas possam estar a ocorrer. Estas limitações podem ocorrer devido a uma inibição da atividade de enzimas do ciclo de Calvin, como por exemplo a Ribulose-1,5-bifosfatase carboxilase/oxigenase (RuBisCO), ou a redução da regeneração do substrato da RuBisCO (Dias et al. 2018b; Brito et al., 2019). Também num trabalho de Buono et al. (2021) este verificou que a taxa de assimilação de CO_2 e o C_i em oliveiras da variedade Arbequina, expostas a stresse salino e tratadas com o bioestimulante à base de *A. nodosum*, se mantinham em níveis semelhantes aos do controlo.

A importância do parâmetro de eficiência do uso da água (EUA) prende-se com o facto de este ser um indicador da capacidade que as espécies têm para se estabelecer em áreas com limitações hídricas (Ferreira et al., 2012). Neste trabalho, em ambas as

variedades, a rega deficitária diminuiu o EUA, mas o bioestimulante aumentou este parâmetro. Estes dados sugerem que aplicação deste bioestimulante pode ajudar a reduzir a quantidade de água transpirada, o que pode levar a uma menor necessidade de água de rega. Num trabalho desenvolvido por Santaniello et al. (2017), foi verificado que em plantas de *A. thaliana*, expostas a défice hídrico e tratadas com um bioestimulante à base de *A. nodosum*, o EUA melhorava, cimentando os resultados obtidos neste trabalho em oliveiras.

O amido é um polissacarídeo de reserva, e foi demonstrado em algumas espécies, como por exemplo na oliveira (Araújo et al., 2019), que a seca aumenta o nível deste açúcar. Esse aumento pode estar relacionado com a regulação da abertura estomática (manter os estomas mais fechados) ou com uma repressão da sua mobilização para outras células não fotossintéticas da planta (Bacelar et al., 2006). Neste trabalho, ambas as variedades de oliveira, apresentaram uma diminuição dos níveis de amido em resposta ao défice hídrico, mas o bioestimulante na variedade Galega (SB) aliviou essa redução. Uma maior mobilização de amido em condições de défice hídrico pode representar maiores necessidades energéticas para a manutenção celular ou mesmo para a reparação ou ajuda no combate ao stresse. Num trabalho realizado por Moolphuerk and Pattanagul (2020), foi verificado também que o nível de amido, em plantas de arroz, diminuía em resposta ao tratamento com bioestimulante à base de quitosano e exposição a défice hídrico.

De um modo geral, a seca influencia os níveis de proteína nas plantas, levando a uma diminuição do seu conteúdo (Schulze et al., 2021). Na variedade Galega, a aplicação de bioestimulante teve um papel positivo em condições de rega deficitária (SB), pois este ajudou a manter um nível de proteínas semelhante ao do controlo (CO e CB). Na variedade Arbequina, este efeito já não é tão acentuado, sendo que as plantas do grupo SB e CB apresentaram níveis semelhantes de proteínas, mas inferiores ao CO. Num trabalho efetuado por Mutlu-Durak and Kutman (2021), estes verificaram que em plantas de milho expostas a stresse salino e tratadas com um bioestimulante à base de extrato de salgueiro a quantidade de proteínas também aumentava.

A aplicação da rega deficitária induziu a produção de ROS, nomeadamente aumento de H_2O_2 , na variedade Galega. Na variedade Arbequina o tratamento com bioestimulante ajudou a diminuir a produção destes ROS. O défice hídrico pode elevar a produção de ROS levando assim a stresse oxidativo e danos nas membranas celulares. (Ying et al., 2020). Contudo, neste trabalho, na variedade Galega, apesar do aumento dos níveis de H_2O_2 nas plantas em rega deficitária não se verificou um aumento da peroxidação lipídica. Já na variedade Arbequina, o bioestimulante parece ter uma

ação efetiva na redução da peroxidação lipídica. Por exemplo, a aplicação de bioestimulante em rega deficitária (SB) levou a uma menor produção de H_2O_2 e MDA em comparação com as plantas sem bioestimulante nas mesmas condições (SO). Resultados semelhantes foram descritos por Buono et al. (2021) em oliveiras da variedade Arbequina expostas a stresse salino e tratadas com um bioestimulante à base de *A. nodosum*.

Para minimizar os danos induzidos pelo stresse oxidativo, as plantas desenvolveram um sistema antioxidante muito eficiente constituído por antioxidantes não enzimáticos (ex: flavonoides, glutatona e ascorbato) e enzimas antioxidantes (ex: SOD, CAT, GPOX e APX) (Dias et al., 2020). Na variedade Galega, em condições de défice hídrico, apesar de haver maior produção de H_2O_2 , os níveis de MDA mantiveram-se semelhantes para as plantas bem regadas. Este perfil, pode estar relacionado com a ativação do sistema de defesa enzimático. Nas plantas do grupo SO a enzima GPOX pode ter um papel mais relevante para o controlo do stresse oxidativo, enquanto nas plantas do grupo SB já parece ser outra enzima, neste caso a APX. Esta última enzima parece ser estimulada pela aplicação do bioestimulante. Num trabalho realizado por Buono et al. (2021), onde também foi verificada a atividade das 4 enzimas estudadas neste trabalho, em oliveiras da variedade Arbequina expostas a stresse salino, foi verificado que todas as enzimas aumentaram a sua atividade em resposta ao bioestimulante (*A. nodosum*) para valores iguais aos do grupo controlo. Ao contrário dos resultados observados nem todas as enzimas testadas aumentaram a sua atividade em condições de stresse, sendo que algumas até diminuíram a sua atividade com a aplicação do bioestimulante.

Já na variedade Arbequina, em condições de défice hídrico, o bioestimulante parece ser mais benéfico na redução do stresse oxidativo devido a uma ativação da produção de fenóis totais (polifenóis) e não tanto à ação das enzimas antioxidantes. As folhas de oliveira são muito ricas nestes compostos antioxidantes (ex: flavonóides, secoiridóides e ácido hidroxicinâmicos) (Dias et al., 2020). Dentro do grupo dos polifenóis, os ortodifenóis como o hidroxitirosol, oleuropeína e verbascosído são descritos como sendo dos mais importantes antioxidantes nesta espécie com elevada capacidade de neutralização de ROS (Soufi et al., 2014). Contudo, na Arbequina, apenas se observou o efeito da rega no aumento da acumulação de ortodifenóis. Também na rega deficitária, nesta variedade, aumentou a atividade da SOD (particularmente no tratamento SO), possivelmente para aumentar a destoxificação do $O_2^{\cdot-}$ e produção de H_2O_2 . Contudo, nestas plantas em rega deficitária, sem aplicação de bioestimulante foi onde se observou a maior peroxidação lipídica. Num trabalho

realizado por Hidalgo-Santiago et al. (2021), foi verificado que em alfices expostas a défice hídrico e tratadas com um bioestimulante à base de silício, a concentração de compostos fenólicos e de flavonóides totais diminuía.

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

A aplicação de bioestimulante nas duas variedades de oliveira, em condições de rega normal (100% da capacidade de campo), parece não alterar o estado hídrico das plantas, a taxa fotossintética nem a eficiência máxima do PSII. Contudo, o bioestimulante parece ter um efeito positivo na promoção da EUA. Para além disso, a aplicação de bioestimulante na variedade Arbequina ajudou a reduzir a produção de H_2O_2 , estimulou a atividade da enzima CAT e a produção de amido. Já na variedade Galega, o bioestimulante atuou ao nível dos antioxidantes não enzimáticos, estimulando a produção de fenóis totais e a acumulação de AST. Já em condições de rega deficitária (50% da capacidade de campo), a aplicação de bioestimulante não afetou o estado hídrico das oliveiras. A rega deficitária na variedade Galega reduziu o TRA, mas a Arbequina parece ser mais eficiente nos mecanismos de controlo da perda de água mantendo o TRA. Em termos de performance fisiológica, o bioestimulante parece ter um papel importante no aumento da EUA, mas é na variedade Galega que se destaca mais o aumento da taxa de assimilação de CO_2 . Já na resposta oxidativa e antioxidante, estas variedades apresentam estratégias de resposta diferentes. A variedade Galega parece ser mais tolerante em termos oxidativos, e a aplicação do bioestimulante aumentou tanto a atividade do sistema de defesa enzimático (APX) como a produção de proteínas e acumulação de amido. Já na variedade Arbequina, o bioestimulante teve um papel mais relevante, melhorando o controlo dos danos oxidativos e aumento de ROS, e ativando a produção de antioxidantes não enzimáticos (fenóis totais). Estes resultados sugerem que a aplicação de bioestimulantes em condições de défice hídrico podem melhorar a performance fisiológica das oliveiras e ajudar a responder mais eficientemente a episódios de stresse abiótico.

Este trabalho abre assim algumas perspetivas futuras em relação ao uso de bioestimulantes na agricultura para melhorar a performance das plantas sendo que se pode estudar melhor os seus princípios ativos e o seu modo de ação. A análise dos efeitos sinérgicos que eventualmente possam ocorrer na ação antiseca de modo a poder ser aplicado numa altura mais propícia à sua ação. Também é importante avaliar em ensaios de campo a ação deste bioestimulante, pois dará ideia das condições reais de resistência ao stresse hídrico, bem como a reação a outros agentes abióticos e

Resposta fotossintética e antioxidante da oliveira tratada com
bioestimulante e exposta a défice hídrico

também bióticos, nomeadamente os agentes patogénicos. Para se perceber melhor o efeito e o modo de ação dos bioestimulantes nas plantas, análises de transcriptómica e metabolómica em resposta ao défice hídrico devem também de ser conduzidos.

7. Referências

- Abboud S, Dbara S, Abidi W, Braham M (2019). Differential agro-physiological responses induced by partial root-zone drying irrigation in olive cultivars grown in semi-arid conditions. *Environmental and Experimental Botany* 167: 103863
- Abenoza M, Benito M, Oria R, Sánchez-Gimeno AC (2014). Quality characterization of the olive oil from Var.Tosca 07 grown in a commercial high-density orchard. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 91: 613-644
- Abogadallah GM (2011). Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Science* 180: 540-547
- Agarwal S, Sairam R, Srivastava G, Meena R (2005). Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum* 49: 541-550
- Agati G, Azzarelo E, Pollastri S, Tattini M (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196: 67-76
- Agrawal S, Singh S, Agrawal M (2009). Chapter 3 Ultraviolet-B induced changes in gene expression and antioxidants in plants. *Advances in Botanical Research* 52: 47-86
- Agustí, M (2004). *Fruticultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 493
- Ain-Lhout F, Zunzunegui FA, Díaz Barradas MC, Tirado R, Clavijo A, García Novo F (2001) Comparison of proline accumulation in two shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil* 230: 175–183.
- Akhtar SS, Mekureyaw M, Pandey C, Roitsch T (2020). Role of cytokinins for interaction of plants with microbial pathogens and pest insects. *Frontiers in Plant Science* 10: 1777
- Albuquerque TG, Costa HS, Oliveira MBPP (2019). An overview of Portuguese olive oils and table olives with protected designation of origin. *European Journal of Lipid Science and Technology* 121: 1800129
- Almadi L, Paoletti A, Cinosi N, Daher E, Rosati A, Di Vaio C, Famiani F (2020). A biostimulant based on protein hydrolysates promotes the growth of young olive trees. *Agriculture* 10: 618
- Amarowicz R, Weidner S (2009). Biological activity of grapevine phenolic compounds. In *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 389-405
- Anjum NA, Singh HP, Khan MI, Massod A, Per TS, Negi A, Batish DR, Khan NA, Duarte AC, Pereira E et al. (2015). Too much is bad-an appraisal of phytotoxicity of elevated

- plant-beneficial heavy metal ions. *Environmental Science and Pollution Research International* 22: 3361-3382
- Anjum NA, Sharma P, Gill SS, Hasanuzzaman M, Khan EA, Kachhap K, Mohammed AA, Thangavel P, Devi GD, Vasudhevan P, et al. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 19002-19029
- Arafa AA, Hussien SFM, Mohamed HSG (2012). Response of tuber yield quantity and quality of potato plants and its economic consideration to certain bioregulators or effective microorganisms under potassium fertilization. *Journal of Plant Production* 3: 131-150
- Araújo M, Santos C, Costa M, Moutinho-Pereira, Correia C, Dias MC (2016). Plasticity of young *Moringa oleífera* L. plants to face water deficit and UVB radiation challenges. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 162: 278-285
- Araújo M, Ferreira de Oliveira JMP, Santos C, Moutinho-Pereira J, Correia C, Dias MC (2019). Responses of olive plants exposed to different irrigation treatments in combination with heat shock: physiological and molecular mechanisms during exposure and recovery. *Planta* 249: 1583-1598
- Araújo M, Prada J, Mariz-Ponte N, Santos C, Pereira JA, Pinto DCGA, Silva AMS, Dias MC (2021). Antioxidant adjustments of olive trees (*Olea europaea*) under field stress conditions. *Plants* 10: 684
- Ashraf M, Foolad MR (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216
- Azoulay-Shemer T, Bagheri A, Wang C, Palomares A, Stephan AB, Kunz HH, Schroeder JI (2016). Starch biosynthesis in guard cells but not in mesophyll cells is involved in CO₂ induced stomatal closing. *Plant Physiology* 171: 788-798
- Bacelar EA, Santos DL, Moutinho-Pereira JM, Gonçalves BC, Ferreira HF, Correia CM (2006). Immediate responses and adaptive strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science* 170: 596-605
- Bacelar EA, Santos DL, Moutinho-Pereira JM, Lopes JI, Gonçalves BC, Ferreira HF, Correia CM (2007). Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. *Plant Soil* 292: 1–12.
- Baker EA, Procopiu J (2000) The leaf and fruit cuticles of selected drought tolerant plants. *Acta Horticulturae* 527: 85–93.

- Barbosa MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR (2014). Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. *Ciência Rural* 44(3): 453-460
- Barranco D (2008). "Variedades y patrones". In: Barranco D, Fernandez-Escobar R and Rallo L. *El cultivo del olivo*. Junta de Andalucía e Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 6ª edição, pp. 63-92
- Beers R, Sizer I (1952). A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195: 133-140
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithviraj B (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196: 39–48.
- Bhattacharjee S (2010). Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: Gupta SD *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers pp. 1-30
- Bohm J (2013). Domesticação da oliveira na antiguidade na bacia mediterrânica. In *O Grande Livro da Oliveira e do Azeite-Portugal Oleícola*; Bohm J Ed.; Dinalivro Editora: Lisboa, Portugal pp.52-65
- Brito C, Dinis LT, Moutinho-Pereira J, Correia CM (2019). Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate. *Plants* 8: 1-20
- Bolger A, Scossa F, Bolger ME, Lanz C, Maumus F, Tohge T, Quesneville H et al. (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum penellii*. *Nature Genetics* 46: 1034-1038
- Boughalleb F, Hajlaoui H (2011). Physiological and anatomical changes induced by drought in two olive cultivars (cv Zalmati and Chemlali). *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 53–65
- Bulgari R, Franzoni G, Ferrante A (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy* 9: 1-30
- Buono DD, Regni L, Pino AMD, Bartucca ML, Palmerini CA, Proietti P (2021). Effects of Megafol on the olive cultivar "Arbequina" grown under severe saline stress in terms of physiological traits, oxidative stress, antioxidant defenses, and cytosolic Ca²⁺. *Frontiers in Plant Science* 11: 603576
- Calvo P, Nelson L, Kloepper JW (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* 383: 3-41
- Campobenedetto C, Agliassa C, Mannino G, Vigliante I, Contartese V, Secchi F, Berteau CM (2021). A biostimulant based on seaweed (*Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata*) and yeast extracts mitigates water stress effects on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Agriculture* 11: 557

- Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzaroto F, Margis-Pinheiro M (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidante protection. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1011-1019
- Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattazio V, Martens S (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 1-20
- Choi CY, Song JA, Choi YU, Lee TH, Ryu HS (2020). Effects of green wavelength light on antioxidant responses in olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to starvation and re-feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 20: 659-669
- Choudhury A, Lahiri A (2011). Comparative analysis of abscisic acid-regulated transcriptomes in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 13: 28-35
- Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 8: 4 e23681
- Chouliaras V, Tasioula M, Chatzissavvidis C, Therios I, and Tsabolatidou E (2009). 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 Food Science and Agriculture* 89: 984–988
- Chrysargyris A, Xylia P, Anastasiou M, Pantelides I, Tzortzakis N (2018). Effects of *Ascophyllum nodosum* seaweed extract on lettuce growth, physiology an fresh-cut salad storage under potassium deficiency. *Journal of Agriculture and Food Science* 98: 5861-5872
- Connor DJ, Fereres E (2005). The Physiology and Adaptation and Yield Expression in Olive. In: Jajick J eds. *Horticultural Reviews*, Volume 31, John Willey and Sons Inc., United States, pp.155-200
- CONSULAI; Juan-Vilar (2020), Consultores Estratégicos. Alentejo: A Liderar a Olivicultura Moderna Internacional. *Olivum*. Available online: https://13b249f8-94d9-4c10-832b9c2323cab575.filesusr.com/ugd/a303d9_5993f29b65054e46a54acc_8c90cf7f.pdf
- Cordeiro AM, Calado ML, Morais N, Miranda A, Carvalho MT (2010). *Variedades de Oliveira: Galega Vulgar*; Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro: Castelo Branco, Portugal. Available online: https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/018_variedades_oliveira_galega_vulgar_nov10.pdf

- Cordeiro AM, Martins PCS, Ramos A, Sequeira P (2011). Characterization of olive cultivars fruit set in self-pollination. In : Atas Portuguesas de Horticultura 14, Proceedings of the 5th Simpósio Nacional de Olivicultura, Santarém, Portugal, 24-26 September 2009; Associação Portuguesa de Horticultura : Lisboa, Portugal, pp.23-30
- Dabrowska G, Kata A, Goc A, Szechynska-Hebda M, Skrzypek E (2007). Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia* 49(1): 7-17
- Dag A, Naor A, Ben-Gal A, Harlev G, Zipori I, Schneider D, Birger R, Peres M, Gal Y, Kerem Z (2014). The Effect of Water Stress on Super-high Density 'Koroneiki' Olive Oil Quality. *Journal of Science and Food Agriculture*. 95: 2016–2020
- Das K, Roychoudhury A (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2: 53.
- Dias MC, Pinto G, Santos C (2011). Acclimatization of micropropagated plantlets induces an antioxidative burst: a case study with *Ulmus minor* Mill. *Photosynthetica* 49: 259-266
- Dias MC, Azevedo C, Costa M, Pinto G, Santos C (2014a). *Melia azedarach* plants show tolerance properties to water shortage treatment: An ecophysiological study. *Plant Physiology and Biochemistry* 75: 123-127
- Dias MC, Correia C, Moutinho-Pereira J, Oliveira H, Santos C (2014b). Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117: 214-224
- Dias MC, Correia S, Serôdio J, Silva AMS, Freitas H, Santos C (2018a). Chlorophyll fluorescence and oxidative stress endpoints to discriminate olive cultivars tolerance to drought and heat episodes. *Scientia Horticulturae* 231: 31-35
- Dias MC, Pinto DCGA, Correia C, Moutinho-Pereira J, Oliveira H, Freitas H, Silva AMS, Santos C (2018b). UV-B radiation modulates physiology and lipophilic metabolite profile in *Olea europaea*. *Journal of Plant Physiology* 222: 39-50
- Dias MC, Figueiredo C, Pinto DCGA, Freitas H, Santos C, Silva AMS (2019). Heat shock and UV-B episodes modulate olive leaves lipophilic and phenolic metabolite profiles. *Industrial Crops and Products* 133: 269-275
- Dias MC, Pinto DCGA, Freitas H, Santos C, Silva AMS (2020). The antioxidant system in *Olea europaea* to enhanced UV-B radiation also depends on flavonoids and secoiridoids. *Phytochemistry* 17: 112199

- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Catálogo de Variedades <https://www.dgav.pt/plantas/conteudo/sementes-plantas-e-variedades/catalogos-de-variedades/> (consultado a 29 de Agosto de 2021)
- Doblas-Miranda E, Alonso R, Arnan X, Bermejo V, Brotons L, de las Heras J, Estiarte M, Hódar JA, Llorens P, Lloret F, López-Serrano FR, Martínez-Vilalta J, Moya D, Peñuelas J, Pino J, Rodrigo A, Roura-Pascual N, Valladares F, Vila M, Zamora R, Retana J (2013). The Mediterranean Basin as a global change hotspot: unpredictable interactions beyond drought effects. *Earth Science Reviews*, in press.
- Du Jardin P (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196: 3–14.
- Eef B, Marlies D, van Swam K, Veen A, Burger L (2018). Identification of the Seaweed Biostimulant Market (Phase 1); The North Sea Farm Foundation: AD Den Haag, The Netherlands.
- El-Mageed TAA, Semida WM, Rady MM (2017). Moringa leaf extract as biostimulant improves water use efficiency, physio-biochemical attributes of squash plants under deficit irrigation. *Agricultural Water Management* 193: 46-54
- Ertani A, Francioso O, Tinti A, Schiavon M, Pizzeghello D, Nardi S (2018). Evaluation of Seaweed Extracts From *Laminaria* and *Ascophyllum nodosum* spp. as Biostimulants in *Zea mays* L. Using a Combination of Chemical, Biochemical and Morphological Approaches. *Front. Plant Sci.* 9: 428.
- Farmer EE, Mueller MJ (2013). ROS-mediated lipid peroxidation RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* 64: 429-50
- Farouk S (2015). Improving growth and productivity of potato (*Solanum tuberosum* L.) by some biostimulant and lithovit with or without boron. *Journal of Plant Productivity* 6: 2187-2206
- Fernández JE (2014). Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environmental and Experimental Botany* 103: 158-179
- Ferreira MJ, Gonçalves JFC, Ferraz JBS (2012). Crescimento e eficiência do uso da água de plantas jovens de castanheira da amazônia em área degradada e submetidas à adubação. *Ciência Florestal* 22: 393-401
- Fink RC, Scandalios JG (2002). Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relation to other eukaryotic and procaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 399: 29.36
- Fleskens L (2008). A typology of sloping and mountainous olive plantation systems to address natural resources management. *Annals of Applied Biology* 153: 283-297

- Flora SJS, Mittal M, Mheta A (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by quelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* 128: 501-523
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G (2009). Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* 60: 455-484
- Gemas VJ, Almadanim MC, Tenreiro R, Martins A, Fevereiro P (2004). Genetic diversity in the olive tree (*Olea europea* L. subsp. *Europea*) cultivated in Portugal by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 501-511
- Giertych MJ, Karolewski P, Temmerman LOD (1999). Foliage age and pollution alter content of phenolic compounds and chemical elements in *Pinus nigra* needles. *Water, Air and Soil Pollution* 110: 363-377
- Godoy F, Olivos-Hernández K, Stange C, Handford M (2021). Abiotic Stress in Crop Species: Improving tolerance by applying plant metabolites. *Plants Theory* 10: 186
- Gupta AK, Kaur N (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-76
- Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S (2015). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europea* (olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015: 541591
- Hasanuzzaman M, Oku H, Nahar K, Bhuyan MHMB, Mahmud JA, Baluska F, Fujita M (2018). Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnology Reports* 12: 77-92
- Haworth M, Marino G, Brunetti C, Killi D, De Carlo A, Centritto M (2018). The impact of heat stress and water deficit on the photosynthetic and stomatal physiology of olive (*Olea europea* L.)-A case study of the 2017 heat wave. *Plants* 7: 76
- Hernandez I, Alegre L, Van Breusegem F, Munne-Bosch S (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 14: 125-132
- Hernández-Santana V, Fernández JE, Cuevas MV, Perez-Martin A, Diaz-Espejo A (2017). Photosynthetic limitations by water deficit: effect on fruit and olive oil yield, leaf area and trunk diameter and its potential use to control vegetative growth of super-high density olive orchards. *Agricultural Water Management* 184: 9-18
- Hidalgo-Santiago L, Navarro-Léon E, López-Moreno FJ, Arjó G, González LM, Ruiz JM, Blasco B (2021). The application of the silicon-based biostimulant Codasil® offset water deficit of lettuce plants. *Scientia Horticulturae* 285: 110177
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001). A large family of classe III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42: 462-468

- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611
- Instituto Nacional de Estatística (INE). Estatísticas Agrícolas. Available online: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOES_pagenumber=1&PUBLICACOEScolecao=107660&PUBLICACOESTipo=ea&selTab=tab0 (accessed on 22 August 2021)
- Internacional Olive Council (IOC). Economic Affairs & Promotion Unit-Figures. Available online: <https://www.internacionaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures> (accessed on 21 August 2021)
- IPCC (2014a). Global Warming Of 1.5 C. An IPCC report on the impacts of global warming of 1.5 C above Pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways in the context of strengthening the global response to the threat of climate change.
- IPCC (2014b). Climate change 2014 impacts, adaptation, and vulnerability. part A: global and sectoral aspects. In: Field CB, Barros VR, eds. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp.1142
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) (2021). Portal do Clima, (<http://portaldoclima.pt/pt/>) (consultado a 19 de Outubro de 2021).
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84: 55-60
- Islam MT, Ckurshumova W, Fefer M, Liu J, Uddin W, Rosa C (2021). A plant based modified biostimulant (cooper chlorophyllin), mediates defense response in *Arabidopsis thaliana* under salinity stress. *Plants* 10: 625
- Kauffman GL, Kneivel DP, Watschke TL (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass, *Crop Science* 47: 261–267.
- Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5(6): 709-725
- Kerchev P, Van der Meer T, Sujeeth N, Verlee A, Stevens CV, Van Breusegem F, Gechev T (2020). Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants. *Biotechnology Advances* 40: 10750

- Kerupin LV, Zaman M, Pharis RP (2014). Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators, *Journal of Science and Food Agriculture* 94: 1715–1722.
- Khedr AH, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2553-2562
- Kocira S, Szparaga A, Hara P, Treder K, Findura P, Bartos P, Filip M (2020). Biochemical and economical effect of application biostimulants containing seaweed extracts and amino acids as an element of agroecological management of bean cultivation. *Scientific Reports* 10: 17759
- Kohli SK, Handa N, Gautam V, Bali S, Sharma A, Khanna K, Arora S, Thukral AK, Ohri P, Karpets YV, Kolupaev YE Bhardwaj R (2017). ROS signaling in plants under heavy metal stress. Springer Nature Singapore: 185-214
- Koubouris GC, Kavroulakis N, Metzidakis IT, Vasilakakis MD, Sofo A (2015). Ultraviolet-B radiation or heat cause changes in photosynthesis: antioxidant enzyme activities and pollen performance in olive tree. *Photosynthetica* 53: 279–287
- Krasenky J, Jonak C (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory net-works. *Journal of Experimental Botany* 63: 1593-1608
- Kunicki E, Grabowska A, Sekara A, Wojciechowska R (2010). The Effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Folia Horticulturae* 22: 9-13
- Liu J, Fu C, Li G, Khan MN, Wu H (2021). ROS homeostasis and plant salt tolerance: plant nanobiotechnology updates. *Sustainability* 13: 3552
- Lopes PS (2021). Viveiros de Oliveira, A Cultura da Oliveira (https://soareslopes.tripod.com/a_cultura_da_oliveira.htm) (consultado a 19 de Outubro de 2021)
- López-Orenes A, Dias MC, Ferrer MA, Calderón A, Moutinho-Pereira J, Correia C, Santos C (2018). Different mechanisms of the metalliferous *Zygophyllum fabago* shoots and roots to cope with Pb toxicity. *Environmental, Science, Pollution Research* 25: 1319–1330
- Maia FB (2010). Contribuição para o estudo da fenologia de quatro variedades de oliveira (*Olea europea* L.): “Arbequina”, “Cobrançosa”, “Galega Vulgar” e “Picual”. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

- Matesanz S, Valladares F (2014). Ecological and evolutionary responses of Mediterranean plants to global change. *Environmental and Experimental Botany* 103: 53-67
- Maxwell K, Johnson GN (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668
- Mengel K (2002). Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition. *Acta Horticulturae* 594: 33–47
- Michalak I, Chojnacka K (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences* 14: 581–591.
- Mika A, Luthje S (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology* 132: 1489-1498
- Moolphuerk N, Pattanagul W (2020). Pretreatment with different molecular weight chitosans encourages drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj Napoca* 48: 2072-2084
- Mooney HA, Cleland EE (2001). The evolutionary impact of invasive species. *Colloquium* 98: 5446-5451
- Mota M, Lopes JPS (2012). Resultados preliminares do efeito da aplicação de um extrato de algas em oliveiras ‘Cobrançosa’ e ‘Galega’. VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela, 15 a 17 de novembro de 2012. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 21: 147
- Mota M, Paço T, Darouich H (2018). O rendimento em azeite na cultivar de oliveira “Arbequina”. *Agrotec, revista técnico-científica agrícola* (<http://www.agrotec.pt/noticias/o-rendimento-em-azeite-na-cultivar-de-oliveira-arbequina/>) (consultado a 19 de Outubro de 2021)
- Mullen RT, Trelease RN (2000). The sorting signals for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase are within its C-terminal tail. *Journal of Biological Chemistry* 275: 16337-16344
- Murtic S, Oljaca R, Murtic MS, Koleska I, Muhic A (2019). Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in cherry tomato subjected to drought. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 29: 1664-1672
- Mutlu-Durak H, Kutman BY (2021). Seed treatment with biostimulants extracted from weeping willow (*Salix babylonica*) enhances early maize growth. *Plants* 10: 1449
- Myers N, Mittermier RA, Mittermier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858

- Mylona PV, Polidoros AN (2010). ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA SD. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants Enfiled: Science Publishers Cap 6, pp 101-128
- Mystkowska IT (2018). Content of total and true protein in potato tubers in changing weather conditions under the influence of biostimulators. *Acta Agrophysica* 25: 475-483
- Mystkowska IT, Zarzecka K, Gugala M, Sikorska A (2018). The polyphenol content in three edible potato cultivars depending on the biostimulant used. *Agriculture* 10: 269
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki et al. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant Journal* 77: 367-379
- Nakado Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific-peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1527-1536
- Niedre M, Patterson MS, Wilson BC (2002). Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 75: 383-391
- Oliveira A (2020). Recorde de Produção de 2020 deverá descer em 40 mil toneladas nesta campanha. In: Grande Plano. Frutas, Legumes e Flores pp. 42-45
- Osaki M, Shinano T, Tadano T (1991). Redistribution of carbon and nitrogen compounds from the shoot to the harvesting organs during maturation in field crops. *Soil Science and Plant Nutrition* 37: 117-128
- Pedrero F, Grattan SR, Bem-Gal A, Vivaldi GA (2020). Opportunities for expanding the use of wastewaters for irrigation of olives. *Agricultural and Water Management*. 241: 106333
- Pereira-Netto A (2012). Stigmasterol-driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the marubakaido apple rootstock. *Trees* 26: 581-586
- Pereira L, Morrison L, Shuckla PS, Critchey AT (2020). A concise review of the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis. *Journal of Applied Phycology* 32: 3561-3584
- Pérez-Tortosa V, López-Orenes A, Martínez-Pérez A, Ferrer MA, Calderón AA (2012). Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry* 130: 362-369

- Pirasteh-Anosheh H, Saed-Moucheshi A, Pakniyat H, Pessarakii M (2016). Stomatal responses to drought stress. In: Ahmad P eds. Water Stress in Crop Plants Ed. 1, Willey Blackwell, Srinagar, India, pp. 24-40
- Proietti P, Nasini L, Ilaroni L (2012). Photosynthetic behavior of Spanish Arbequina and Italian Maurino olive (*Olea europea* L.) cultivars under super-intensive grove conditions. *Photosynthetica* 50: 239-246
- Rai VK (2002). Role of aminoacids in plant responses to stress. *Biologia Plantarum* 45: 481-487
- Rajput VD, Harish, Singh RK, Verma KK, Sharma L, Quiroz-Figueroa FR, Meena Mukesh, Vinod Singh Gour, Minkina T, Sushkova S, Mandzhieva S (2021). Recent developments in enzymatic antioxidante defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology* 10: 267
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237
- Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell and Environment* 29: 426-434.
- Rosa M, Hilal M, González JA, Prado FE (2009a). Low-temperature Effect on enzymes activities involved in sucrose-starch partitioning in salt-stress salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 300-307
- Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M, Prado FE (2009b). Soluble sugars-Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signal and Behavior* 4: 388-393
- Rubio de Casas R, Vargas P, Perez-Corona E, Manrique E, Garcia-Verdugo C, Balaguer L (2011). Sun and shade leaves of *Olea europea* responde differently to plant size, light availability and genetic variation. *Functional Ecology* 25: 802-812
- Rundel PW, Arroyo MTK, Cowling RM, Keeley JE, Lamont BB, Vargas P (2016). Mediterranean biomes: evolution of their vegetation, floras and climate. *Annual reviews of Ecology, Evolution and Systematics* 47: 383-407
- Sales H, Nunes J, Patto MCV (2020). Achievements and challenges towards a sustainable conservation and use of “Galega vulgar” *Olea europea* variety. *Agronomy* 10: 1467
- Santaniello A, Scartazza A, Gresta F, Loreti E, Biasone A, Di Tomasso D, Piaggese A, Perata P (2017). *Ascophyllum nodosum* seaweed extract alleviates drought stress in

- Arabidopsis by affecting photosynthetic performance and related gene expression. *Frontiers in Plant Science* 8: 1362
- Santelia D, Zeeman SC (2011). Progress in *Arabidopsis* starch research and potencial biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 271-280
- Saramago ISL (2009). Master thesis: Olival em modo de produção biológico. Instituto politécnico de Beja, Escola Superior Agrária, Beja, Portugal.
- Schulze WX, Altenbuchinger M, He M, Kranzlein M, Zorb C (2021). Proteome profiling of repeated drought stress reveals genotype-specific responses and memory effects in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* 159: 67-79
- Sharma A, Shazad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24: 2452
- Shroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C (2002). MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging* 23: 861-880
- Shuckla PS, Mantin EG, Adil M, Bajpai S, Critchey AT, Prithiviraj B (2019). Ascophyllum nodosum-based biostimulants: sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance and disease management. *Frontiers in Plant Science* 10: 665
- Silva S, Santos C, Serôdio J, Silva A, Dias MC (2018). Physiological performance of drought-stressed olive plants when exposed to a combined heat UV-B shock and after stress relief. *Functional Plant Biology* 45: 1233-1240
- Smart RE, Bingham GE (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology* 53: 258-260
- Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004). Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologiae Plantarum* 121: 58–65.
- Soufi O, Romero C, Hayette L (2014). Ortho-diphenol profile and antioxidant activity of Algerian black olive cultivars: Effect of dry salting process. *Food Chemistry* 157: 504-510
- Stephenie S, Chang YP, Gnanasekaran A, Esa NM, Gnanaraj C (2020). An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants or mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods* 68: 103917
- Stitt M, Zeeman SC (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 282-292

- Tanase C, Bujor O-C, Popa, VI (2019). Phenolic natural compounds and their influence on physiological processes in plants. In Polyphenols in Plants, 2nd edicion; Watson RR, Ed; Academic Press: Cambridge, MA, USA pp 45-58
- Thalmann M, Santelia, D (2017). Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* 214: 943-951
- Thompson JD (2005). Plant evolution in the mediterranean. Oxford, UK: Oxford University Press
- Tous J, Romero A, Hermoso JF, Mallén N (2007). Sistemas de producción del olivo en seto. *Experiencias en Cataluña. Agricultura* 896: 360-367
- Triantaphilidès C, Krischke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M et al. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology* 148: 960-968
- Turan M, Ekici EYM, Argin S (2021). Effect of biostimulants on yield and quality of cherry tomatoes grown in fertile and stressed soils. *American Society for Horticultural Science* 56: 414-423
- Vass I, Cser K (2009). Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. *Trends in Plant Science* 14: 200-205
- Vossen P (2007). Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *Horticultural Science* 42: 1093-1100
- Yao Y, Chen XWB, Zhang M, Ma J (2020). Seaweed extract improved yields, leaf photosynthesis, ripening time, and net returns of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *ACS Omega* 5: 4242-4249
- Ying M, Dias MC, Freitas H (2020). Drought and salinity stress responses and microbe-induced tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science* 11: 591911
- Zeeman SC, Koomann J, Smith AM (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 209-234
- Zoeller M, Stingl N, Krischke M, Fekete A, Waller F, Berger S, Mueller M (2012). Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology* 160: 365-378
- Zou P, Lu X, Zhao H, Yuan Y, Meng L, Zhang C, Li Y (2019). Polysaccharides Derived From the Brown Algae *Lessonia nigrescens* Enhance Salt Stress Tolerance to Wheat Seedlings by Enhancing the Antioxidant System and Modulating Intracellular Ion Concentration. *Frontiers in Plant Science* 10: 48.

Zulfiqar F, Casadesús A, Brockman H, Munné-Bosch S (2020). Na overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts.