

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Jesus Pinto da Silva Figueiredo

**RESPOSTA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MEDRONHEIRO
(*ARBUTUS UNEDO* L.) AO STRESSE HÍDRICO: PERFIL
FENÓLICO E *PRIMING* IN VITRO.**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada
pelos Doutores João Filipe da Silva Martins e Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e
apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra.

julho 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Jesus Pinto da Silva Figueiredo

**RESPOSTA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MEDRONHEIRO
(*ARBUTUS UNEDO* L.) AO STRESSE HÍDRICO: PERFIL
FENÓLICO E *PRIMING* IN VITRO.**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pelos
Doutores João Filipe da Silva Martins e Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e apresentada ao
Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra.

julho 2022

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutor João Martins e professor Jorge Canhoto, por me receberem novamente e por toda a disponibilidade ao longo deste caminho.

Um agradecimento especial ao João, por toda a ajuda, paciência e conhecimentos que me transmitiu. À segunda é que foi.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal da UC, em especial à Catarina, pelo companheirismo naquela que foi uma vida de espera.

Um agradecimento à professora Teresa Batista e aos colegas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade, pela oportunidade de aprender e por toda a ajuda nas análises por HPLC.

Aos meus amigos, por acreditarem em mim, em especial à Adriana, ao André e à Marisa, por me dizerem para ir em frente.

À família, por me terem dado forças e motivarem sempre que acusei cansaço. Em especial aos meus avós, por todas as vezes que me questionaram como estava a correr a “escola” e como estavam os meus medronheiros.

Finalmente, aos meus pais e ao meu irmão, por me ampararem a queda, pelo amor incondicional e toda a paciência do mundo. Afonso, podes comprar os foguetes. E claro, à Prada, pela companhia diária e por ser uma fonte de serotonina.

Esta dissertação é dedicada à Maria Benvinda, a mulher que me ensinou a pelo menos tentar. Metade deste trajeto foi feito com a sua força e inspirado na sua coragem perante o medo. Isto é para mim e por ela, uma vitória pessoal. Cumpri a minha promessa avó. Um enorme obrigada carregado de saudade.

Índice

Agradecimentos	i
Lista de abreviaturas	iv
Abstract	v
Resumo	vii
1. Introdução	1
1.1. Contextualização	3
1.2. <i>Arbutus unedo</i> L. (Medronheiro)	4
1.2.1. Taxonomia	4
1.2.2. Descrição botânica	4
1.2.3. Ciclo reprodutivo	5
1.2.4. Ecologia e distribuição geográfica	6
1.2.5. Importância da espécie	7
1.3. Propagação de <i>Arbutus unedo</i>	8
1.4. Stresse hídrico	9
1.4.1. Causas do stresse hídrico	9
1.4.2. Efeitos nas plantas	10
1.4.3. Respostas das plantas ao stresse hídrico	11
1.4.4. Stresse hídrico em <i>Arbutus unedo</i>	13
1.5. Objetivos	15
2. Materiais e métodos	17
2.1. Análise metabolómica direcionada	19
2.1.1. Material vegetal	19
2.1.2. Análise do perfil fenólico	20
2.1.3. Análise estatística	22
2.2. Priming	22
2.2.1. Material vegetal	22
2.2.2. Indução de stresse com PEG	23
2.2.3. Enraizamento	23
2.2.4. Análises bioquímicas	24
2.2.5. Análise estatística	26
3. Resultados	28
3.1. Metabolómica direcionada	30
3.1.1. Plantas em stresse hídrico (WS)	30

3.1.2. Plantas em recuperação (RC)	38
3.1.3. Quantificação absoluta da arbutina	46
3.2. Priming	48
4. Discussão	54
4.1. Metabolômica direcionada	56
4.2. Priming	59
5. Conclusões e perspectivas futuras	64
6. Referências bibliográficas	68

Lista de abreviaturas

A – Taxa líquida de assimilação de dióxido de carbono

ABA – Ácido abscísico

ANOVA – Análise de variância

Car – Carotenoides

Chl a – Clorofila a

Chl b – Clorofila b

Ci – Concentração intercelular de dióxido de carbono

CO₂ – Dióxido de carbono

E – Taxa de transpiração

FC – Fold change

gs – Condutância estomática

HPLC-PDA – Cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de fotodíodos

IBA - Ácido-3-indol-butírico

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

NUC – Neglected or underutilized crop

PC – Componente principal

PCA – Análise de componentes principais

PEG – Polietilenoglicol

PLS-DA – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

ROS – Espécies reativas de oxigénio

RWC – Conteúdo relativo de água

VIP – Variable Importance in Projection

Abstract

In the context of global climate change, water stress has increased in recent years in Portuguese territory, affecting negatively the productivity of our crops. *Arbutus unedo* L. (strawberry tree), belongs to the Ericaceae family and is part of the current Mediterranean flora, occurring spontaneously throughout the Portuguese territory and has been valued in recent years due to its ecological and economic importance, and to the growing demand for the arbutin compound by the cosmetic industry. The strawberry tree is an isohydric species capable of conserving water and dealing with water stress, but given the severe drought we face, it is necessary to invest in plants more tolerant to drought. Tolerance is generally achieved through physiological, biochemical and molecular changes and metabolomics can be used as a selection marker for tolerant genotypes to water stress, in order to predict phenotypes and their performance under stress, with a view to future breeding program, since phenolic compounds have been identified as fundamental in protecting the plant against oxidative stress caused by water stress. In the present study, the role of secondary metabolites in water stress tolerance in strawberry tree is evaluated, through two experiments, namely, targeted metabolomics analysis to phenolic compounds and the absolute quantification of arbutin, as well as the influence of genotype, stress and plant age and also a preliminary experiment for priming studies in strawberry tree under water stress. In the present study, the genotype and the treatment did not influence the phenolic profiles of the stress and recovery plants, however, the concentration of phenolic compounds was higher in the field than in the greenhouse and the arbutin concentration was higher in the younger plants growing in the greenhouse, being of greater interest the extraction of arbutin under these conditions. In the future, the most relevant metabolites will be identified in this study and which may be metabolomic markers for the selection of genotypes more tolerant to drought and which may give us more information about the strawberry tree's responses to stress. In the biochemical analysis of the priming assay, only a significant decrease in flavonoids and an increase in proline were observed under water stress. In the future, it will be necessary to evaluate the capacity of rooting, acclimatization and development of the plants and then to induce stress in the plants again and carry out physiological studies to determine the occurrence of priming in the strawberry tree.

Keywords: arbutin, metabolomics, phenolic compounds, strawberry tree, water stress

Resumo

No contexto das alterações climáticas a nível global, o stresse hídrico tem-se acentuado nos últimos anos no território português, afetando negativamente a produtividade das nossas culturas. *Arbutus unedo* L. (medronheiro), pertence à família das ericáceas e faz parte da flora mediterrânica atual, ocorrendo espontaneamente em todo o território português, tem vindo a ser valorizado nos últimos anos devido à sua importância ecológica e económica, e à crescente procura do composto arbutina pela indústria cosmética. O medronheiro é uma espécie isohídrica com capacidade de conservar água e de lidar com o stresse hídrico, mas face à seca severa que enfrentamos é necessário investir em plantas mais tolerantes. A tolerância é geralmente alcançada através de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares e a metabolómica pode ser utilizada como marcador de seleção de génotipos tolerantes ao stresse hídrico, de forma a prever fenótipos e a sua performance sob stresse, com vista ao melhoramento vegetal, uma vez que os compostos fenólicos têm sido apontados como fundamentais na proteção da planta contra o stress oxidativo causado pelo stress hídrico. No presente estudo, é avaliado o papel dos metabolitos secundários na tolerância ao stresse hídrico no medronheiro, através de dois ensaios, nomeadamente, a análise de metabolómica direcionada aos compostos fenólicos e a quantificação absoluta de arbutina, bem como a influência do génotipo, do stress e da idade das plantas e também um ensaio preliminar para estudos de *priming* no medronheiro sob stress hídrico. No presente estudo, o génotipo e o tratamento não influenciaram os perfis fenólicos das plantas de stress e de recuperação, contudo, a concentração de compostos fenólicos foi superior no campo em relação à estufa e a concentração de arbutina foi superior nas plantas mais jovens e a crescer em estufa, sendo de maior interesse a extração da arbutina nestas condições. Futuramente, serão identificados os metabolitos mais relevantes neste estudo e que poderão ser marcadores metabolómicos para a seleção de génotipos mais tolerantes e que nos podem dar mais informação sobre as respostas do medronheiro ao stresse. Nas análises bioquímicas do ensaio de *priming* apenas se verificou uma diminuição significativa dos flavonoides e um aumento da prolina sob stress hídrico. Futuramente, será necessário avaliar a capacidade de enraizamento, aclimatização e desenvolvimento das plantas e numa fase posterior, voltar a induzir o stress nas plantas e proceder a estudos fisiológicos para determinar a ocorrência de *priming* no medronheiro.

Palavras-chave: arbutina, compostos fenólicos, medronheiro, metabolómica, stresse hídrico

1. Introdução

1.1. Contextualização

Os stresses abiótico e biótico afetam o crescimento, o metabolismo e a produtividade das plantas (Meher et al. 2018). Perante a realidade atual, no contexto das alterações climáticas, tem-se verificado um aumento da frequência e da intensidade do stresse hídrico, que é um dos tipos de stresse abiótico que mais afeta negativamente as plantas (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). Segundo dados do IPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera), em todo o território português, tem-se verificado um aumento muito significativo da área em seca severa e, por isso, é importante investir no desenvolvimento de plantas mais tolerantes ao stresse hídrico e o desempenho das plantas sob stress hídrico pode ser uma característica de seleção (Osakabe et al. 2014).

Poucas espécies conseguem tolerar e manter o rendimento sob condições de limitação de água, sendo o medronheiro uma espécie florestal com forte capacidade de tolerância ao stresse hídrico (Munné-Bosch & Peñuelas 2004). O medronheiro sempre foi utilizado por populações locais, com um aproveitamento tipicamente a nível florestal desta espécie (Anastácio 2014). *Arbutus unedo* foi considerado uma espécie NUC (neglected or underutilized crop), atualmente designadas como espécies órfãs (www.underutilized-species.org). Contudo, nos últimos anos, tem vindo a ganhar importância em termos económicos e ecológicos. Este aumento na procura pela espécie e também do seu composto arbutina levou a um maior interesse científico, tendo vindo a ser alvo de vários trabalhos com vista ao seu melhoramento (Martins et al. 2021a, 2021c).

Face aos elevados custos de produção das culturas em condições de escassez de água torna-se importante investir no estudo do medronheiro e na compreensão das suas respostas fisiológicas ou outras ao stresse hídrico, bem como no desenvolvimento de genótipos tolerantes. Em anos recentes, o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra, tem desenvolvido diferentes linhas de investigação nesta espécie algumas delas relacionadas com estratégias de resistência por parte do medronheiro, através de uma resposta mecânica (Martins et al. 2019, 2021a), tendo-se também verificado que o genótipo de medronheiro influencia a performance das plantas sob stresse hídrico (dados não publicados).

1.2. *Arbutus unedo* L. (Medronheiro)

1.2.1. Taxonomia

Arbutus unedo L., vulgarmente conhecido como medronheiro ou ervedeiro, é uma das cerca de 20 espécies que pertencem ao género *Arbutus*, da família Ericaceae, incluída na ordem Ericales, pertencente à classe Magnoliopsida. Filogeneticamente, o género *Arbutus* está relacionado com os géneros *Vaccinium* (mirtilo), *Rhododendron* (rododendro), *Corema* (camarinha), *Calluna* e *Erica* (urze), outros géneros da família das ericáceas existentes na flora portuguesa (Noronha 2001; López-Dóriga 2018).

Em Portugal é possível encontrar três espécies do género *Arbutus*, nomeadamente *A. unedo* (medronheiro comum), *Arbutus andrachne* L. (medronheiro bravo) e *Arbutus x andrachnoides* Lint., um híbrido resultante do cruzamento das outras duas espécies (Hileman et al. 2001).

1.2.2. Descrição botânica

O medronheiro é uma espécie lenhosa que pode apresentar porte arbóreo, atingindo até 10 a 12 metros de altura. No entanto, geralmente é notória a dominância do porte arbustivo (Godinho-Ferreira et al. 2005), que geralmente atinge até 5 metros de altura. Apresenta um tronco delgado, ramos vermelho-escuro ou cinza-escuro com aspeto escamoso e raízes profundas (Figura 1 A) (Gomes 2011; Ribeiro 2016).

As folhas persistentes são simples, com 5 a 10 cm de comprimento, obovado-lanceoladas, de margem serrada, com distribuição alterna e pecíolo curto (Figura 1 C) (Martins 2012). São lustrosas e de coloração verde escura na página superior e verde mais claro e baço na página inferior (Anastácio 2014). Quando jovens apresentam uma tonalidade verde-claro o que as torna muito atrativas para a preparação de arranjos florais.

As flores são hermafroditas com corola urceolada e encontram-se dispostas em panículas pendentes e terminais (Figura 1 B). Apresentam coloração esbranquiçada-esverdeada a rosada, com 10 estames inclusos (Anastácio 2014). As flores são polinizadas por insetos do género *Bombus* (Martins 2012), uma vez que o medronheiro fornece a principal fonte de alimento da espécie *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) (Rasmont et al. 2005).

O medronheiro produz, em média, 7 a 10 kg de frutos (Martins et al. 2021b). O fruto (medronho) é uma baga globosa comestível, de forma esférica, com cerca de 2 cm de diâmetro

(Oliveira et al. 2011) e revestido de pequenas estruturas com forma piramidal (papilas cónicas) (Figura 1 D). Ao longo do desenvolvimento apresenta várias colorações, desde verde a laranja, passando por amarelo, até atingir o vermelho vivo na fase final da maturação. O medronho, de sabor ligeiramente ácido antes de atingir a fase final de maturação, possui 10 a 50 sementes de pequenas dimensões (2-4 mm), dispersas por aves (Martins 2012).



Figura 1 – *A. unedo*. (A) Tronco. (B) Flores. (C) Folhas e botão floral. (D) Frutos (medronhos).

1.2.3. Ciclo reprodutivo

O ciclo reprodutivo do medronheiro é lento, demorando 1 ano completo, que é o tempo de maturação dos frutos. Os primeiros botões florais surgem em junho e permanecem num estado de aparente quiescência até outubro quando ocorre a floração que decorre até fevereiro (Martins 2012; 2021c). A maturação dos frutos ocorre no outono seguinte, de modo que podem existir simultaneamente flores e frutos no mesmo indivíduo (Noronha 2001). O medronheiro reproduz-se sexualmente por via seminal ou vegetativamente através de rebentos da raiz (Sulusoglu et al. 2011).

adaptada a stress biótico e stress abiótico (Martins et al. 2021c), sendo tolerante a condições de stress hídrico (Lagarto et al. 2013), suportando climas com períodos estivais secos (Gomes et al. 2010) e suportando geadas e baixas temperaturas, com temperaturas mínimas de até -12 °C (Mereti et al. 2002; Martins et al. 2021b).

Esta espécie cresce em solos rochosos e bem drenados (Gomes et al. 2010; Martins et al. 2021a), preferindo substratos siliciosos, profundos e soltos (Correia & Oliveira 2002; Torres et al. 2002). É uma espécie indiferente ao pH, crescendo bem em solos alcalinos ou relativamente ácidos (pH 5-7,2) (Noronha 2001; Celikel et al. 2008) e encontra-se mais frequentemente até cerca de 1200 m de altitude (Molina et al. 2011).

1.2.5. Importância da espécie

O medronheiro apresenta um elevado potencial devido às características que possui, sendo importante a nível ecológico, económico, com potencial como espécie ornamental e com aplicações a nível terapêutico e medicinal (Oliveira et al. 2011).

A nível ecológico o medronheiro é uma espécie que se adapta bem a solos pobres e degradados (Lagarto et al. 2013), desempenhando um papel importante na sua estabilização e restauração (fitoestabilização) e que contribui para a proteção contra a erosão, podendo ser considerada uma espécie interessante para silvicultura em solos marginais (Dinis 2015). Vários estudos têm apontado para a grande capacidade de regeneração do medronheiro após os incêndios florestais (Konstantinidis et al. 2006; Gomes et al. 2010), devido à sua capacidade de produzir novos rebentos a partir da raiz (Correia & Oliveira 2002; Ribeiro 2016), podendo ser utilizado para reflorestar as áreas afetadas, um aspeto importante tendo em consideração o aumento na frequência de fogos florestais nos últimos anos devido às alterações climáticas (Martins et al. 2021b). A utilização do medronheiro para a reflorestação de áreas ardidas contribui ainda para a prevenção da colonização por parte de espécies invasoras nessa mesma área (Martins et al. 2021c). Pode ainda ser utilizada como fonte de biomassa para produção de energia e ainda contribui para a manutenção da biodiversidade (Martins 2012; Martins et al. 2021b). Os frutos são fonte de alimento de muitas aves e mamíferos (Molina et al. 2011).

Atualmente, em termos económicos, o fruto do medronheiro é comumente utilizado na produção de outros produtos, como o mel, geleias, compotas e bebidas alcoólicas, sendo que em Portugal, a maior utilização do medronho passa pela produção de aguardente no Algarve e na zona Centro, em particular na Pampilhosa da Serra.

O medronheiro tem ainda potencial como espécie ornamental devido à abundância da sua floração e à sua presença em simultâneo com os frutos nos vários estágios de maturação, o que confere à planta um aspeto colorido, estando o seu uso como espécie ornamental em expansão (Ribeiro 2016).

A nível terapêutico e medicinal, as folhas podem ser utilizadas para fazer infusões, devido às suas propriedades antioxidantes, adstringentes, diuréticas, antissépticas e depurativas, podendo ainda ser utilizadas no tratamento de diabetes e da hipertensão (Barros et al. 2010; Mendes et al. 2011; Borges 2014). O medronho apresenta propriedades anti-inflamatórias, laxativas, digestivas, cardiotónicas e carminativas (Novais et al. 2004; Barros et al. 2010), sendo utilizado no tratamento de problemas gastrointestinais, renais, dermatológicos e cardiovasculares (Oliveira et al. 2011).

1.3. Propagação de *Arbutus unedo*

Dada a importância do medronheiro quer a nível ecológico quer a nível económico, como acima descrito, o medronheiro tem sido valorizado, surgindo como uma alternativa às espécies tradicionais, como o pinheiro e o eucalipto e, como tal, a procura pela espécie e de plantas de qualidade tem aumentado. Contudo, a propagação do medronheiro através de métodos convencionais, como a estacaria ou através da germinação de semente (Martins et al. 2021b), apresenta desvantagens. De facto, a germinação de sementes origina plantas com acentuada diversidade genética que não garantem o genótipo da planta-mãe e a estacaria apresenta taxas de enraizamento baixas (Pereira 2014).

Deste modo, surge como alternativa a micropropagação, uma técnica de cultura *in vitro* que consiste na obtenção rápida, de um elevado número de clones, que apresenta muitas vantagens face aos métodos convencionais, particularmente, a necessidade de pouco material vegetal para iniciar uma cultura, as condições controladas, a produção contínua sem ter em conta a sazonalidade e uma produção de plantas isentas de vírus (Pereira 2014; Sousa 2015), sendo assim possível obter e fixar um genótipo de interesse nas plantas propagadas (Pereira 2014). Uma das técnicas de micropropagação *in vitro* de plantas lenhosas é a proliferação de meristemas, uma técnica que consiste na cultura, em meios adequados, de meristemas caulinares, permitindo a propagação em larga escala e a obtenção de clones de uma planta-mãe (Martins et al. 2021b). Os meristemas desenvolvem-se formando um novo rebento caulinar constituído por vários fitómeros e estes, por sua vez, podem ser também cultivados, num processo que pode ser realizado indefinidamente (Canhoto 2010; Pereira 2014). Em algumas

situações, ocorre organogénese, onde ocorre formação de novos meristemas, originando uma massa com rebentos de tamanho reduzido ao invés da proliferação de meristemas já existentes.

1.4. Stresse hídrico

A cultura em larga escala do medronheiro é feita normalmente em terrenos marginais, com solos bem drenados e em zonas de baixa pluviosidade em que as plantas vão estar sempre expostas a ambientes extremos e face ao panorama atual da seca que afeta Portugal, as culturas podem vir a enfrentar dificuldades em obter água suficiente e, apesar de o medronheiro ser uma espécie isohídrica com capacidade de conservar água (Martins et al. 2021a), questiona-se até que ponto consegue manter essa capacidade face às alterações climáticas e, por isso, é tão importante selecionar plantas tolerantes ao stress hídrico com vista ao melhoramento vegetal.

O stress hídrico é um tipo de stress abiótico que afeta as funções fisiológicas normais das plantas, sendo determinado pela sua intensidade e extensão, pois em qualquer momento do desenvolvimento de uma planta esta pode estar sujeita a limitação de água, a curto ou longo prazo, sendo que em situações extremas e prolongadas pode levar à morte (Akinci & Lösel 2012; Lisar et al. 2012; Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). Algumas plantas tendem a desenvolver mecanismos para se adaptarem às alterações das condições ambientais, sendo que algumas têm a capacidade de se adaptar com mais facilidade do que outras (Akinci & Lösel 2012). A resposta ao stress hídrico é um processo muito complexo que ocorre em diferentes níveis e envolve diversos mecanismos (Basal et al. 2020). É por isso importante aprofundar os estudos dos efeitos do stress face ao aumento da temperatura global e em particular em áreas áridas e semiáridas (Albergaria et al. 2020).

1.4.1. Causas do stress hídrico

As alterações climáticas resultantes do aumento do aquecimento global estão na origem do stress hídrico (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). O défice de água nos meses de verão ocorre devido a fatores como temperaturas elevadas, baixa humidade do solo, baixa humidade relativa da atmosfera e ventos secos, que contribuem para a evaporação da água do solo e para o aumento das perdas de água por parte das plantas (Akinci & Lösel 2012; Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). Durante o inverno, as plantas são sujeitas a um stress hídrico designado stress fisiológico, devido à ocorrência de inundações do solo. Nesta situação, há disponibilidade de água no solo, porém são tidos em consideração fatores como a salinidade e as baixas temperaturas, levando a uma diminuição da absorção de água pelas raízes (Lisar et al. 2012).

1.4.2. Efeitos nas plantas

Os sintomas do stresse hídrico nas plantas podem variar de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento, as condições de crescimento, bem com da intensidade e duração do stresse e, ainda das condições físico-químicas do solo (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016).

De um ponto de vista geral, o primeiro efeito do stresse hídrico passa por uma redução do conteúdo relativo de água (RWC) e uma diminuição da permeabilidade no solo, levando a uma diminuição do potencial hídrico da folha (Akinci & Lösel 2012; Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). A redução do potencial hídrico nas folhas induz o fecho dos estomas (Akinci & Lösel 2012), o que implica um aumento da resistência estomática, diminuindo a taxa de transpiração e, conseqüentemente ocorre um aumento da temperatura da folha (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016).

Em termos morfológicos, a diminuição da área foliar, o fecho dos estomas, a senescência e abscisão foliar são as respostas mais evidentes quando a planta está sujeita a uma situação de stresse hídrico (Santos & Carlesso 1998), além da inibição dos processos de divisão, expansão e diferenciação celular, que levam a um menor crescimento e desenvolvimento da planta (Santos & Carlesso 1998; Akinci & Lösel 2012; Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016) e pode também ocorrer o espessamento da parede celular, a cutinização da superfície foliar e o desenvolvimento do sistema condutor (Lisar et al. 2012). A nível da raiz, o stresse hídrico induz o crescimento e a expansão, formando um sistema radicular ramificado e extenso, uma estratégia comum de plantas a crescer em ambientes secos (Lisar et al. 2012; Martins et al. 2019).

A diminuição da área foliar e o aumento da senescência foliar também contribuem para a redução da fotossíntese, pois há uma menor área para as trocas gasosas ocorrerem (Akinci & Lösel 2012; Lisar et al. 2012), além de que o stresse hídrico induz a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) que causam danos oxidativos no aparelho fotossintético (Basal et al. 2020), levando a uma diminuição do conteúdo de clorofila das folhas e dos carotenoides (Mibei et al. 2017) e a um aumento das antocianinas (Cirillo et al. 2021), que desempenham um papel protetor nas plantas sob stresse, estando envolvidas na desintoxicação de ROS (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). As plantas sensíveis à seca utilizam mais energia para absorver água do solo, especialmente sob stresse hídrico intenso e a biossíntese de

ATP é afetada negativamente, levando à diminuição da taxa de respiração (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016).

A nível metabólico, quando a disponibilidade de água no solo é limitada, ocorre um aumento do ácido abscísico (ABA), que induz o fecho dos estomas e a diminuição a condutância estomática, regulando os níveis hídricos da planta (Santos & Carlesso 1998; Osakabe et al. 2014) e é promovida a síntese de proteínas e enzimas envolvidas em mecanismos de desintoxicação de ROS, incluindo enzimas necessárias para a biossíntese de vários aminoácidos, também designados por solutos compatíveis, como a prolina (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016) e a sua acumulação nas células em crescimento da planta está envolvida no ajuste osmótico da planta, uma vez que, provoca um decréscimo do potencial hídrico das células e, conseqüente diminuição do potencial osmótico das células, promovendo a absorção de água do solo (Akinci & Lösel 2012; Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016).

1.4.3. Respostas das plantas ao stresse hídrico

As respostas das plantas ao stresse hídrico variam de acordo com a espécie, o genótipo, o estágio de desenvolvimento da planta, bem como de fatores não inerentes à planta, como a temperatura, a luminosidade, o nível de CO₂, a humidade, o tipo de solo e a disponibilidade de nutrientes. A intensidade e a duração do stresse constituem também uma forte influência nos mecanismos de resposta das plantas (Santos & Carlesso 1998; Lisar et al. 2012). A adaptação das plantas é possível através de estratégias de resistência, que envolvem respostas fisiológicas, morfológicas, fenológicas, bioquímicas e moleculares, através da acumulação de certos metabolitos ou alterações estruturais (Lisar et al. 2012). As plantas sofrem alterações a todos estes níveis, incluindo alterações na expressão genética (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016) com vista à conservação de água para assegurar a produtividade da planta (Santos & Carlesso 1998), envolvendo estratégias de prevenção, para evitar o stresse e estratégias de tolerância, para tolerar o stresse (Akinci & Lösel 2012; Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). As estratégias de prevenção passam pela capacidade das plantas em manter um elevado potencial hídrico nos tecidos quando em condições de stresse hídrico. A preservação é geralmente alcançada através de alterações morfológicas nas plantas, como a redução da condutância estomática, diminuição da área foliar e desenvolvimento de sistemas radiculares extensos. Este tipo de estratégia de resistência leva a uma perda de rendimento (Lisar et al. 2012).

A tolerância é geralmente alcançada através de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em tecidos e células específicos, incluindo expressão de genes específicos e a presença de proteínas específicas, com vista a manter as funções normais da planta mesmo com potencial hídrico reduzido (Lisar et al. 2012). As plantas adquirem a tolerância através da acumulação de solutos compatíveis e ajuste osmótico, indução de um sistema antioxidante e a alteração das vias metabólicas (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016). A reversibilidade dos diversos mecanismos de resposta induzidos vai depender dos mesmos fatores que influenciam os próprios mecanismos, nomeadamente do genótipo, da duração do stresse, da intensidade do stresse e do estágio de desenvolvimento da planta (Santos & Carlesso 1998).

Tendo em consideração que as condições propiciadoras de indução de stresse hídrico se têm vindo a acentuar nos últimos anos, afetando assim a produtividade das culturas, é necessário produzir plantas mais tolerantes à seca. Métodos genéticos clássicos, como a seleção e cruzamento de genótipos com as características desejáveis para obtenção de um genótipo mais tolerante (Lisar et al. 2012; Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam 2016), que geralmente sobrevivem e conseguem uma recuperação mais eficiente do que os genótipos suscetíveis (Akinci & Lösel 2012) têm sido utilizados. Em termos de adaptação a novas situações de stresse hídrico, plantas que foram sujeitas a este tipo de stresse em estágios iniciais do seu desenvolvimento tendem a adaptar-se mais rapidamente em relação a plantas com regime de rega normal (Santos & Carlesso 1998), o que pode indicar que as plantas foram sujeitas a um *priming*, isto é, foi estimulada a sua capacidade de defesa e as plantas passam a ser capazes de detetar o stresse e de reagir de forma mais rápida e eficaz (Avramova 2019). Deste modo, o *priming* pode ser uma ferramenta para o estudo dos mecanismos de resistência das plantas sob stresse, com vista à seleção de genótipos mais tolerantes (Turgut-Kara et al. 2020). O *priming* baseia-se no fenómeno da epigenética, em que uma planta tem maior predisposição para tolerar o stresse se já tiver sido exposta ao stresse, pois pensa-se que a planta fica marcada epigeneticamente e consegue recordar os mecanismos bioquímicos e moleculares que utilizou anteriormente (Turgut-Kara et al. 2020). Estudos de *priming* direcionados para o stresse hídrico são mais fáceis de executar em condições *in vitro*, através da utilização de polietilenoglicol (PEG), um polímero que reduz o potencial hídrico (George et al. 2013), induzindo stresse osmótico e redução da taxa fotossintética (Meher et al. 2018), com vista ao aumento da resistência das plantas às condições de stresse (Turgut-Kara et al. 2020).

1.4.4. Stresse hídrico em *Arbutus unedo*

O medronheiro apresenta diferentes estratégias de prevenção face ao stresse hídrico, como as ceras epicuticulares (Martins et al. 2021a) que permitem reduzir as perdas de água e o desenvolvimento das raízes (Vasques et al. 2013) que permitem a absorção da água em grandes profundidades. Um estudo com plantas híbridas de medronheiro sujeitas a stresse hídrico, mostrou alterações consideráveis ao nível da condutância estomática (gs), da taxa líquida de assimilação de dióxido de carbono (A), da taxa de transpiração (E) bem como um aumento da concentração intercelular de dióxido de carbono (Ci), o que indica que o medronheiro apresenta uma resposta mecânica ao fechar os estomas, devido à hormona ABA (Martins et al. 2021a).

Para além do mecanismo desencadeado pela hormona ABA, existem mecanismos mais complexos independentes do ABA, associados à capacidade de tolerância, quer a nível genético quer a nível metabólico (Turgut-Kara et al. 2020). Todavia, os estudos genéticos no medronheiro apresentam limitações, uma vez que o genoma do medronheiro ainda não foi sequenciado. Para estudos do fenótipo, é mais importante o metaboloma, a composição em metabolitos que resultam da atividade metabólica das plantas (Sousa 2015). A concentração dos metabolitos secundários nas plantas varia entre genótipos, local da planta, estágios de desenvolvimento e varia com as condições de crescimento (Sánchez-Rodríguez et al. 2011), uma vez que pode ser influenciada quer por fatores abióticos da variação sazonal, como a temperatura, a luz e a disponibilidade de água e o próprio substrato (Martins et al. 2021c).

Num outro estudo realizado pelo nosso grupo (dados não publicados) foi demonstrado que o genótipo do medronheiro parece ter importância no seu desempenho fisiológico na resposta ao stresse hídrico, tendo esta espécie a capacidade de desenvolver diferentes estratégias para tolerar o stresse, mas que a proveniência das plantas não tem influência. Este estudo consistiu numa análise não direcionada da metabolómica de genótipos de medronheiro sob stresse hídrico e em recuperação pós-stresse, com vista à identificação de metabolitos e sua quantificação relativa. Alguns dos metabolitos, nomeadamente compostos fenólicos, demonstraram ter particular relevância na resposta das plantas ao stresse. Neste contexto podem referir-se os compostos miricetina, quercetina, quercitrina, luteolina, ácido α -linolénico, epicatequina, ácido abscísico, ácido jasmónico e ácido salicílico, tornando-se importante investir numa análise direcionada deste grupo de metabolitos para validar os dados já existentes (Figura 3) (dados não publicados).

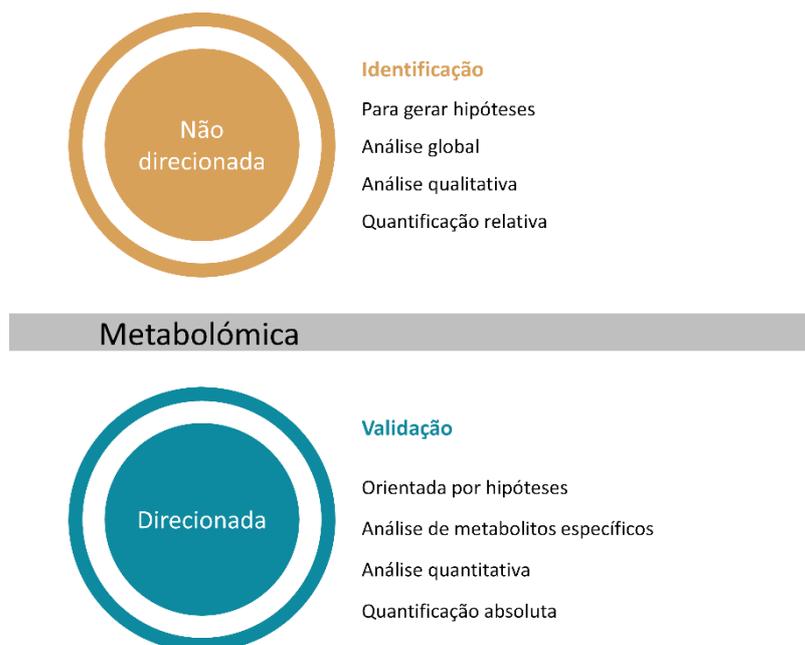


Figura 3 – Análise da metabolómica (adaptado de Schrimpe-Rutledge et al. 2016).

Os metabolitos secundários desempenham funções nos processos fisiológicos das plantas, bem como na resposta adaptativa a fatores abióticos e bióticos (Albergaria et al. 2020). Como mecanismo de defesa para prevenir a oxidação causada pelos radicais livres e ROS e, conseqüente falha da atividade fotossintética, bem como a inibição do crescimento da planta, as células sintetizam compostos fenólicos, com atividade antioxidante, com vista à desintoxicação e redução dos danos oxidativos (Sánchez-Rodríguez et al. 2011; Albergaria et al. 2020).

Dentro dos compostos fenólicos identificados no medronheiro, a arbutina, um derivado da hidroquinona, tem particular interesse devido à sua capacidade de inibir a atividade da tirosinase e a síntese de melanina, funcionando como agente clareador da pele, sendo atualmente um composto muito interessante para a indústria de cosmética (Lima 2017). A arbutina é um composto mais seguro e vantajoso face à hidroquinona, devido à sua estabilidade e não toxicidade, sendo menos irritante para a pele (Sousa 2015). Estes dois compostos também apresentam propriedades antissépticas, propriedades de antienvelhecimento, antioxidantes e antibacterianas, efeito analgésico e efeito anti-inflamatório e ainda funcionam como filtro de radiações ultravioleta (Jurica et al. 2015; Lima 2017; Martins et al. 2021b). Existe pouca bibliografia relativamente ao papel da arbutina e da hidroquinona nos mecanismos de defesa do medronheiro, mas pensa-se que será produzida como mecanismo de resposta da planta a condições de stresse abiótico, como temperaturas extremas e, stresse biótico, como patógenos (Jurica et al. 2015).

1.5. Objetivos

Num cenário climático em constante mudança, a análise de compostos como os fenóis, a prolina, os pigmentos fotossintéticos e as hormonas pode ser utilizada como um indicador do desempenho das plantas e como marcador de seleção de génotipos tolerantes ao stresse hídrico, bem como ser utilizados para prever fenótipos e a sua performance sob stresse em programas de melhoramento vegetal do medronheiro.

Face aos resultados já obtidos pelo nosso grupo, que apontam para a importância dos metabolitos secundários nos mecanismos de resposta das plantas ao stresse hídrico, e tendo em consideração o interesse económico, bem como a relevância ecológica do medronheiro face ao panorama climático atual, o presente trabalho surge como um contributo adicional para a compreensão do papel dos metabolitos secundários na tolerância ao stresse hídrico. Assim, foram definidos dois objectivos principais e planeados dois tipos de ensaios.

O primeiro ensaio teve como objetivos mais específicos (i) avaliar a metabolómica para uma melhor compreensão do papel do perfil fenólico na resposta do medronheiro ao stresse, (ii) avaliar a influência do génotipo, do tratamento e da idade na metabolómica das plantas (iii) identificar metabolitos que possam ser potenciais marcadores de seleção para selecionar génotipos tolerantes a stresse hídrico (iv) quantificar a arbutina para determinar se o stresse hídrico tem algum efeito na sua concentração nas plantas. Para a concretização destes objetivos foram analisados perfis metabólicos de plantas de *A. unedo* com diferente proveniência em condições de déficit hídrico e durante a recuperação das mesmas, através de uma análise de metabolómica direcionada.

O segundo ensaio consiste num estudo preliminar para determinar a possibilidade de associar a ferramenta de *priming* à micropropagação com vista ao melhoramento vegetal, com o objetivo de estabelecer a base para estudos de *priming* no medronheiro. Para este objetivo realizou-se um ensaio em plantas micropropagadas de dois génotipos sob stresse hídrico simulado com PEG e posterior avaliação da performance das plantas através de parâmetros bioquímicos, para observar se as condições do ensaio foram suficientes para induzir o stresse e desenvolver uma resposta típica ao stresse hídrico.

2. Materiais e métodos

2.1. Análise metabolómica direcionada

2.1.1. Material vegetal

Na realização do ensaio foram utilizadas folhas apicais de plantas micropropagadas e a crescer numa câmara de cultura, com 2 anos de idade e que, posteriormente, foram transferidas para o campo, onde se procedeu também à colheita de folhas apicais das plantas depois de 2 anos. Este material vegetal foi obtido através da micropropagação de clones de quatro génotipos previamente estabelecidos *in vitro* da coleção do laboratório de Biotecnologia Vegetal, conforme descrito em Martins et al. (2019) e que foi utilizado pelo nosso grupo num estudo iniciado em 2017 (dados não publicados).

O génotipo A1 foi inicialmente estabelecido *in vitro* a partir de uma árvore adulta, enquanto os génotipos A2, A3 e A4 foram estabelecidos a partir de plântulas com origem seminal. Os génotipos A1 e A3 são provenientes da região centro de Portugal, de uma área com uma média de pluviosidade alta (>1000 mm) e média (500-1000 mm), respetivamente e, os génotipos A2 e A4 da zona sul de Portugal, de uma área com uma média de pluviosidade baixa (<500 mm).

A micropropagação do material vegetal foi realizada através da proliferação de meristemas axilares, conforme descrito por Martins et al. (2019). As culturas foram realizadas em recipientes plásticos Microbox (O118/80+OD118 com filtro branco, Sac O2, Deinze, Bélgica) com 100 mL de meio, numa câmara de fluxo laminar e mantidas numa câmara de crescimento sob um fotoperíodo de 16 h, irradiância de 15 - 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes brancas frias), e temperatura de 25 °C, com intervalos de cultura de 8 semanas. As plantas foram enraizadas através de choque auxínico, quando colocadas numa solução de IBA (ácido-3-indol-butírico) (1 g L⁻¹, Fluka Biochemika, Buschs, Switzerland) durante 30 segundos e deixadas a crescer numa câmara de cultura (FitoClima 10000 HP, Aralab, Rio de Mouro, Portugal) sob fotoperíodo de 16 h a 25 °C, 70% de humidade e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, em junho de 2017 e durante dois anos foram regadas até 70-80% da capacidade de campo.



Figura 4 – Linha temporal dos ensaios efetuados

As plantas com dois anos de idade, foram sujeitas a três regimes hídricos: *WW* – *well watered* (regadas até 70% da capacidade de campo durante 20 dias), *WS* – *water stressed* (regadas até 18% da capacidade de campo durante 20 dias) e *RC* – *recover* (regadas a 18% durante 20 dias e depois a 70% da capacidade de campo durante 5 dias, assim como o respetivo controlo). Em junho de 2019, foram recolhidas folhas apicais, congeladas e maceradas em azoto líquido, com recurso a almofariz e pilão, para preservar a atividade metabólica do material vegetal e, armazenadas a -80 °C até à análise do presente estudo. Posteriormente, as plantas foram transferidas para o campo em 2020 e depois de 2 anos a crescer no campo, foram colhidas folhas apicais dessas plantas em janeiro de 2022, congeladas e maceradas em azoto líquido e, armazenadas a -80 °C até ao procedimento da análise metabólica (Figura 4).

Para o presente ensaio foram amostradas três plantas de cada genótipo para os grupos *WW* (grupo controlo), *WS* e *RC*, tanto para as amostras da estufa como do campo. Cada grupo *WS* e *RC* teve o seu próprio grupo controlo.

2.1.2. Análise do perfil fenólico

Extração de compostos fenólicos

A extração foi realizada com metanol absoluto (Fisher Scientific, Leicestershire, UK), na proporção de 4 mL de solvente para cada 400 mg de amostra. O processo extrativo decorreu num homogeneizador T25 digital ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Alemanha), durante 5 minutos a 20000 rpm, seguindo-se uma centrifugação durante 30 minutos a 5000 rpm e 4 °C. Após a centrifugação das amostras, recolheu-se o sobrenadante e o volume de cada amostra foi

ajustado a 4 mL com metanol. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de -20 °C até serem analisadas num prazo de 48h.

Determinação do rendimento extrativo

Para a determinação do rendimento extrativo, utilizaram-se alíquotas de 200 µL, que foram evaporadas numa estufa de vácuo a uma temperatura de 49,9 °C e pressão de 100 mbar até à eliminação do solvente extrativo, ou seja, até peso constante. O rendimento extrativo foi determinado através de uma análise gravimétrica.

Cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de fotodíodos (HPCL-PDA)

Para o HPLC, alíquotas de 1 mL dos extratos de metanol foram inicialmente concentrados num evaporador rotativo (Buchi R-114, Flawil, Suíça), a uma temperatura de 40 °C, sob vácuo, até à obtenção dos resíduos secos, que foram solubilizados em 2 mL metanol a 10%, com auxílio de um agitador vórtex e ultrassons e, posteriormente, foram centrifugados, a 2500 rpm, durante 15 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram filtrados com filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (0,22 µm, Ø13 mm, Labfil, Zhejiang, China). Por fim, foram desgaseificados num aparelho de ultra-sons e volumes de 100 µL de cada extrato e padrão foram injetados no cromatógrafo líquido de alta resolução.

A análise realizou-se num cromatógrafo GILSON equipado com um detetor de fotodíodos (PDA) (Gilson® Electronics SA, Villiers le Bel, França), com uma coluna de fase reversa, Spherisorb S5 ODS2 (250 mm x 4,6 mm d.i.; partícula de 5 µm; Waters® Corp., Milford, MA, EUA), protegida por uma pré-coluna Nucleosil C18 (30 mm x 4 mm d.i; partícula de 5 µm; Macherey – Nagel, Düren, Alemanha), a 25°C. Foi utilizada na fase móvel uma solução aquosa de ácido fórmico a 5%, como solvente A e metanol puro, como solvente B. Para isso recorreu-se a um período de eluição isocrática (0-7 min) e a um gradiente descontínuo de 0-5% B (7-10 min), 5 -25% B (10-20 min), 25-30% B (20-40 min), 30-50% B (40-50 min) e 50-80% B (50-60 min), seguido por outra eluição isocrática aos 60 min, durante 5 min, a uma taxa de fluxo da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹. Os perfis cromatográficos foram adquiridos utilizando o software Unipoint® (versão 2.10, Gilson®), numa faixa de comprimentos de onda entre os 200 e os 600 nm e registados a 280 nm.

Para a quantificação de arbutina, utilizou-se a equação da reta da regressão linear, obtida através da curva de calibração, em função dos padrões de arbutina (Sigma-Aldrich) (0,02-1,5 mg mL⁻¹, $y = 4 * 10^8 x + 2 * 10^6$, $R^2 = 0,9999$) para as amostras da estufa e (0,02-1,5 mg mL⁻¹,

$y = 5 * 10^8 x + 3 * 10^7$, $R^2 = 0,9970$) para as amostras do campo. Os resultados foram expressos em mg por g de peso fresco da folha.

2.1.3. Análise estatística

Antes das análises estatísticas, os dados metabolômicos foram normalizados por normalização mediana, transformação de raiz cúbica e escala de Pareto. Os valores foram dados como média \pm desvio padrão.

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e os *heatmaps* foram realizadas no software MetaboAnalyst v. 5.0 (Pang et al. 2022) para avaliar os dados e a sua interação. O dendrograma do *heatmap* foi calculado com a distância euclidiana como medida de dissimilaridade. O Volcano Plot foi realizado no MetaboAnalyst para identificar a existência de uma variação estatisticamente significativa nos metabolitos entre os grupos controlo (WW) e tratamento (WS e RC) tanto da estufa como do campo ($FC > 2$, $P < 0,05$). A concentração de arbutina foi analisada através de ANOVA de duas vias (GraphPad Prism v. 9.0.0 para Windows, San Diego, CA, EUA), seguido por um teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

2.2. Priming

2.2.1. Material vegetal

Para este ensaio foram utilizados dois genótipos já estabelecidos *in vitro* da coleção do laboratório de Biotecnologia Vegetal, nomeadamente os genótipos A4, obtido a partir de uma plântula de origem seminal e A5, obtido a partir de uma árvore adulta. O primeiro passo para o desenvolvimento deste ensaio consistiu na propagação de clones já existentes para garantir o material vegetal necessário para a realização do mesmo, através da proliferação de meristemas.

Foram inoculados fitómeros com 2 cm de comprimento em meio de Anderson Rhododendron (Anderson, 1980; Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, The Netherlands) suplementado com zeatina (2 mg L^{-1} , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e sacarose (3%, p/v, Duchefa) como fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado a 5,65 através da utilização de soluções de KOH e HCl ($0,01 \text{ M}$ – 1 M). Posteriormente, foi adicionado ágar (0,6%, p/v, Duchefa) ao meio que foi aquecido e distribuído por frascos de cultura (25 mL de meio). O meio foi depois autoclavado durante 20 minutos a $120 \text{ }^\circ\text{C}$. Com recurso ao bisturi e à pinça, foram inoculados na câmara de fluxo laminar cinco explantes por frasco de cultura. Todas as culturas foram mantidas numa câmara de cultura, com temperatura a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e um fotoperíodo de 16 horas de $15\text{--}20 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes brancas frias). A cada 4 semanas

o processo foi repetido para assegurar a quantidade de plantas necessárias para a realização do ensaio.

2.2.2. Indução de stresse com PEG

Para a realização do ensaio utilizou-se polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) para induzir o stresse hídrico *in vitro*, ao influenciar o potencial osmótico das células. Foi necessário otimizar as condições do ensaio, particularmente as concentrações de PEG-6000 nos meios. Foram avaliados três tratamentos, PEG 5%, PEG 7,5% e o controlo. O meio de controlo consistiu no meio acima descrito. O meio de PEG 5% e o de PEG 7,5% consistiram no meio acima descrito, com a adição do PEG-6000 numa concentração de 5% e 7,5%, respetivamente. Os meios foram preparados como acima descrito, tendo em consideração que, a adição do PEG altera o pH dos meios e, como tal o PEG-6000 deve ser adicionado antes do ajuste de pH.

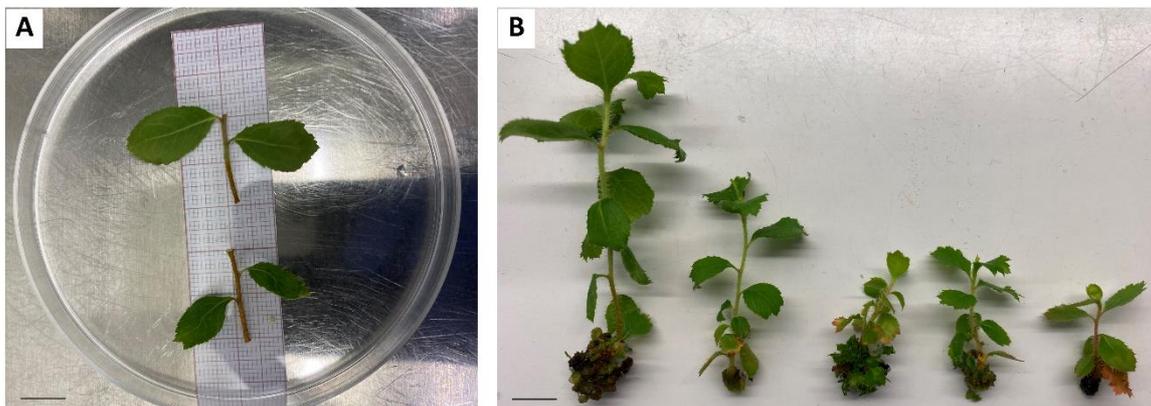


Figura 5 – Segmentos nodais com 2 cm de comprimento (A) e rebentos com 60 dias de crescimento em meio controlo (B).

Foram inoculados cinco segmentos nodais de 1,5 – 2 cm de comprimento por frasco de cultura nos três meios (Figura 5A). As culturas foram deixadas na câmara de cultura, com temperatura a 25 °C e um fotoperíodo de 16 horas de 15–20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes brancas frias) durante 60 dias. Após os 60 dias, para cada tratamento, foram congelados em azoto líquido cinco rebentos de cada frasco de cultura ($n=3$, Figura 5B), para posteriormente se realizarem análises bioquímicas.

2.2.3. Enraizamento

Para determinar o efeito do priming a longo prazo e numa exposição posterior ao stresse hídrico, os rebentos foram enraizados e aclimatizados. Para o enraizamento, colocaram-se os rebentos numa solução de IBA (1 g L⁻¹, Fluka Biochemika) durante 30 segundos e,

posteriormente, foram transferidos para um recipiente com perlite autoclavada, cobertas por película filme, numa câmara de cultura (FitoClima 10,000 HP, Aralab) a 25 °C, 70% de humidade e fotoperíodo de 16 horas ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2.4. Análises bioquímicas

O material vegetal congelado e armazenado a -80 °C foi macerado em azoto líquido, com recurso a almofariz e pilão e vários parâmetros bioquímicos foram avaliados: clorofila a e b, carotenoides, antocianinas, fenóis, ortofenóis, flavonoides e prolina.

Clorofila e carotenoides

O total de clorofila e carotenóides foi estimado seguindo o protocolo de Sims & Gamon (2002). Foram adicionados 2 mL de tampão acetona:Tris 50 mM (80:20) pH 7,8 a 50 mg de material vegetal macerado com azoto líquido e, posteriormente, fez-se vórtex durante 30 segundos e de seguida centrifugou-se por 10 min (5.000 g, 4 °C). O sobrenadante foi recolhido e a extração foi repetida com 3 mL de acetona:Tris. Após as extrações, o volume final foi ajustado para 6 mL. Durante todo o procedimento, as amostras foram protegidas da luz e mantidas em gelo. A absorvância dos sobrenadantes foi lida a 470 nm, 537 nm, 647 nm e 663 nm num espectrofotómetro UV-Vis. A solução de acetona:Tris 50 mM (80:20) tampão pH 7,8 foi usado como branco. Os teores de clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) e carotenoides (Car) foram calculados de acordo com as seguintes equações: $\text{Chla} = 0,01373 * A_{663} - 0,000897 * A_{537} - 0,003046 * A_{647}$; $\text{Chlb} = 0,02405 * A_{647} - 0,004305 * A_{537} - 0,005507 * A_{663}$; $\text{Car} = ((A_{470} - (17,1 * (\text{Chla} + \text{Chlb}) - 9,479 * \text{Antocianinas})) / 119,26$ e $\text{Antocianinas} = 0,08173 * A_{537} - 0,00697 * A_{647} - 0,002228 * A_{663}$.

Antocianinas

O total de antocianinas foi estimado de acordo com Close et al. (2004) com algumas adaptações. Foram adicionados 2 mL de etanol acidificado (etanol:HCl, 99:1, v/v) a 50 mg de material vegetal macerado, seguido de vórtex durante 30 segundos. O homogeneizado foi imerso em água a ferver por 90 segundos e mantido no escuro durante 24 horas a 4 °C. Após a centrifugação (5.000 g, 20 min, a 4 °C), a absorvância dos sobrenadantes foi medida com recurso a um espectrofotómetro UV-Vis a 530 e 657 nm e a fórmula $A_{530} - 0,25 * A_{657}$ foi utilizada para calcular o teor de antocianinas.

Fenóis

O total de fenóis nas amostras foi determinado de acordo com Attard (2013). Para a extração, foram adicionados 1,5 mL de metanol (70%, v/v) a 40 mg do material vegetal congelado e macerado. As amostras foram mantidas num agitador orbital durante uma hora, a 420 rpm e 25 °C e centrifugadas por 25 min, a 5.000 g e a 4 °C e, posteriormente, o sobrenadante foi recolhido. A extração foi realizada três vezes. Após as extrações, o volume final foi ajustado para 10 mL com metanol (70%, v/v). Para a quantificação de fenóis, foram misturados 20 µL da amostra, 90 µL de água destilada, 10 µL de solução reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 80 µL de carbonato de sódio (7%, p/v). Após 2 horas de incubação no escuro, a absorvância foi lida a 520 nm num leitor de microplacas. A concentração de fenóis foi determinada como equivalentes de ácido gálico a partir de uma curva padrão (17,1-137,5 µg, $y = 2,0473x + 0,0587$, $R^2 = 0,9652$).

Ortofenóis

Os extratos metanólicos foram preparados como descrito anteriormente. A quantificação de ortofenóis foi realizada de acordo com Maestro Durán R et al. (1991), misturando-se 160 µL de amostra com 40 µL de molibdato de sódio (5%, p/v). Após 15 min de incubação no escuro, a absorvância foi lida a 370 nm num leitor de microplacas. A concentração de ortofenóis foi determinada como equivalentes de ácido gálico a partir de uma curva padrão (17,1-1100 µg, $y = 3,5834x + 0,0591$, $R^2 = 0,9999$).

Flavonoides

O total de flavonoides foi determinado de acordo com Zhishen et al. (1999). Os extratos metanólicos foram preparados conforme descrito anteriormente. Para a quantificação foram misturados 60 µL da amostra com 28 µL de nitrito de sódio (5%, p/v). Após 6 min de incubação no escuro, foram adicionados 28 µL de cloreto de alumínio (10%, p/v) e as amostras foram novamente incubadas no escuro por 6 min. Por fim, 120 µL de hidróxido de sódio (4%, p/v) foram adicionados à mistura e a absorvância foi lida a 510 nm em um leitor de microplacas. A concentração de flavonoides foi determinada como equivalentes de catequina a partir de uma curva padrão (15,6-1000 µg, $y = 3,844x + 0,2809$, $R^2 = 0,98$).

Prolina

A prolina total nos extratos foi estimada de acordo com Bates et al. (1973). Para a quantificação, foram adicionados a 50 mg de material vegetal congelado, 750 µL de ácido sulfossalicílico (3%, v/v) e, posteriormente, centrifugados por 20 min, a 5.000 g e a 4 °C. Foram

recolhidos 500 µL de sobrenadante, aos quais foram adicionados 500 µL de ninidrina-ácida e 500 µL ácido acético glacial. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 hora e resfriadas em gelo. Por fim, a mistura da reação foi extraída com 1 mL de tolueno e a absorbância do tolueno contendo o cromóforo foi lida a 520 nm num espectrofotômetro UV-Vis. A concentração de prolina foi determinada a partir de uma curva padrão de L-Prolina ($1,17-18,7 \mu\text{g}$, $y = 31,924x + 0,0093$, $R^2 = 0,9991$).

2.2.5. Análise estatística

Os valores são dados como média \pm desvio padrão de 3 réplicas (N=18) para as clorofilas, carotenoides, antocianinas e prolina e 6 réplicas, 3 biológicas e 3 técnicas (N=54) para os fenóis, ortofenóis e flavonoides. Para comparar os dois genótipos e os diferentes tratamentos, em relação aos parâmetros bioquímicos das plantas, os dados foram analisados através de uma ANOVA de duas vias no GraphPad Prism (v. 9.0.0 para Windows), seguida por um teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$). A análise de componentes principais (PCA) e o *heatmap* foram realizados no software MetaboAnalyst v. 5.0 (Pang et al. 2022) para avaliar os dados e a sua interação. O dendrograma do *heatmap* foi calculado com a distância euclidiana como medida de dissimilaridade.

3. Resultados

3.1. Metabolómica direcionada

3.1.1. Plantas em stresse hídrico (WS)

Na análise metabolómica direcionada aos fenóis das amostras WS (*water stressed*), verificam-se diferenças em função da idade das plantas, mas não em função do genótipo ou do tratamento (controlo e stresse). Esta diferença pode ser observada no *heatmap* que revela dois *clusters* distintos nos perfis fenólicos entre as plantas WS da estufa e as plantas WS do campo (Figura 6A). A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) também confirma este resultado, revelando dois grupos distintos: (i) amostras WS e controlos da estufa (S1 e W1) e (ii) amostras WS e controlos do campo (S2 e W2), com uma contribuição de 28,1 % e 22,5 % para a variância do componente 1 e do componente 2, respetivamente (Figura 6B).

Apesar de não haver diferenças entre os perfis fenólicos dos diferentes genótipos, como confirmado através de uma análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) que não revela *clusters* distintos, é possível observar que os genótipos A1 e A4 apresentam os perfis mais distintos entre si (Figura 6C). Uma análise PLS-DA comparando os metabolitos nos diferentes locais e tratamentos, confirma que a idade onde as plantas se encontram influencia o perfil metabólico, mas que o regime hídrico não influencia os perfis metabólicos quer na estufa (S1 = W1) quer no campo (S2 = W2) (Figura 6D).

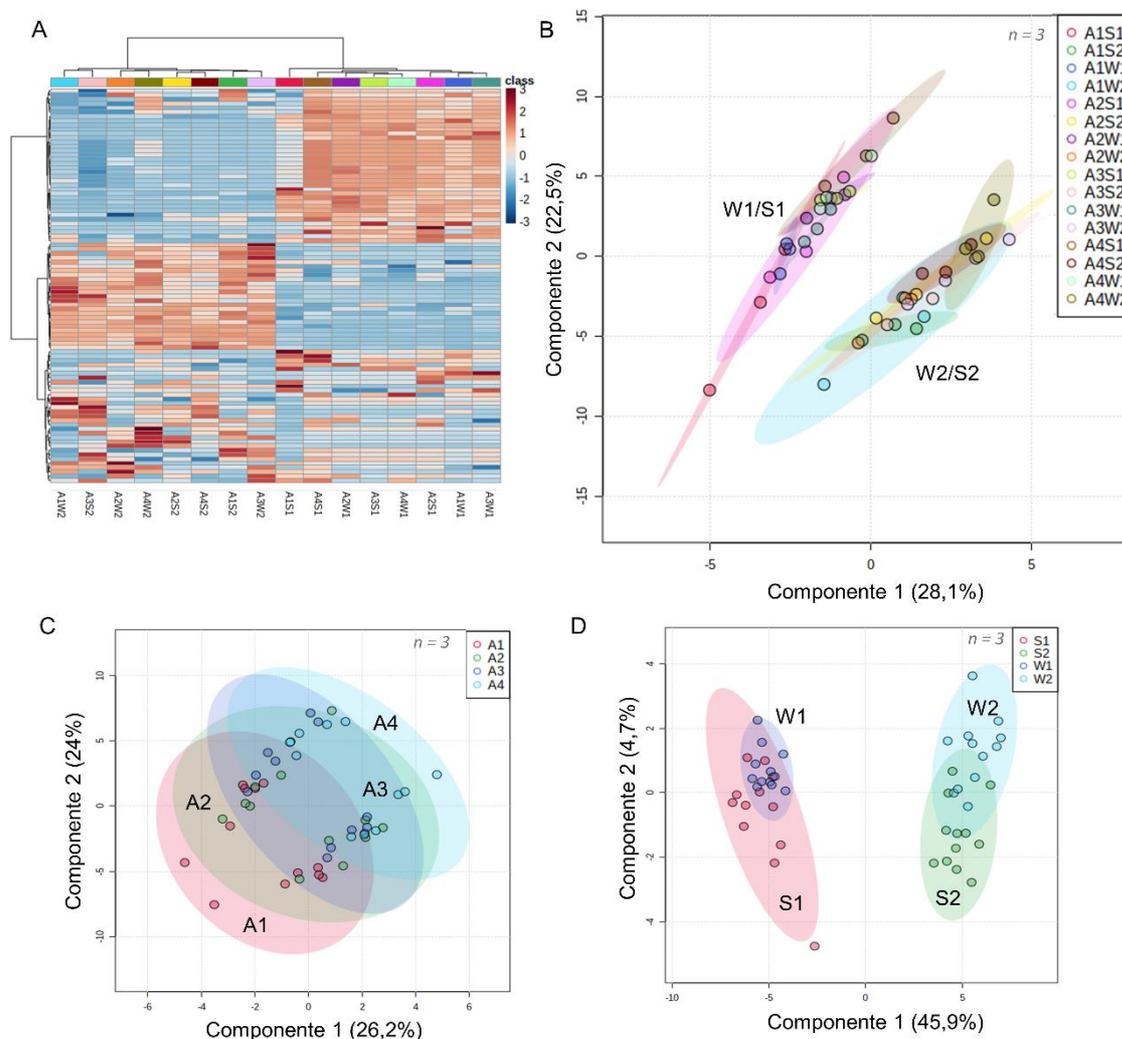


Figura 6 – Análise metabolómica direcionada das amostras quatro genótipos (A1, A2, A3 e A4): *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os grupos WS da estufa (S1) e os grupos WS do campo (S2), bem como os respetivos controlos (W1 e W2) (grupos indicados na parte inferior da figura (A)), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os metabolitos de todos os grupos (B), PLS-DA comparando os metabolitos dos diferentes genótipos (C), PLS-DA comparando os metabolitos nos diferentes locais e tratamentos (D).

Estufa

Numa análise mais focada nas amostras WS da estufa, não se verificam diferenças entre genótipos e entre os tratamentos. Esses resultados são visíveis através de um *heatmap*, revela ainda um perfil metabólico distinto do genótipo A1 sob stresse (A1S1), ao apresentar um conteúdo mais elevado de vários metabolitos em comparação com os outros grupos, incluindo o seu grupo de controlo (A1W1), que também apresenta outros metabolitos com conteúdo elevado (Figura 7A). Também uma análise de PLS-DA confirma estes resultados, não indicando diferenças significativas entre os grupos de stresse e os grupos de controlo em nenhum dos genótipos. No entanto, é possível observar uma tendência entre os genótipos A1 e A4, que formam *clusters* distintos (Figura 7B). Os VIP scores são metabolitos identificados na análise de PLS-DA que foram considerados metabolitos significativos ($VIP > 1$) e importantes na construção do modelo da análise PLS-DA, podendo ser utilizados para diferenciar os diferentes grupos em estudo (no lado direito é indicada a concentração relativa de cada metabolito por baixo de cada grupo). Nas amostras WS da estufa, dos VIP scores utilizados na construção do modelo PLS-DA, destacam-se no genótipo A1, os metabolitos 46, 7, 24, 57 que apresentam uma elevada concentração relativa nos grupos de stresse face aos grupos de controlo, enquanto que no genótipo A4 se destaca o aumento do metabolito 55. Nos genótipos A2 e A3 verificam-se variações menores e nenhum metabolito em elevada concentração nos grupos de stresse (Figura 7C).

Numa análise para comparar apenas os genótipos A1 e A4 das amostras do tratamento WS na estufa, verifica-se no *heatmap* que o genótipo A1 é agrupado consoante o regime hídrico aplicado e no genótipo A4 não se verifica diferenças entre as amostras de stresse e de controlo (Figura 8A). O mesmo resultado é confirmado com o gráfico do PLS-DA, verificando-se também que o grupo de stresse do A1 é mais distante do controlo do A4 (Figura 8B). No entanto, quando analisadas individualmente (A1WWvsA1WS e A4WWvsA4WS), as amostras do genótipo A1 são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 8C) e um Volcano Plot ($FC > 2$ e $P \leq 0,05$) revelou que a concentração do metabolito 13 diminuiu entre o tratamento e o controlo do genótipo A1 (Figura 8D). Na análise individual do genótipo A4 as amostras do genótipo são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 8E) e um Volcano Plot ($FC > 2$ e valor de $P \leq 0,05$) revelou que a concentração dos metabolitos 4 e 55 aumentou entre o tratamento e o controlo do genótipo A4 (Figura 8F).

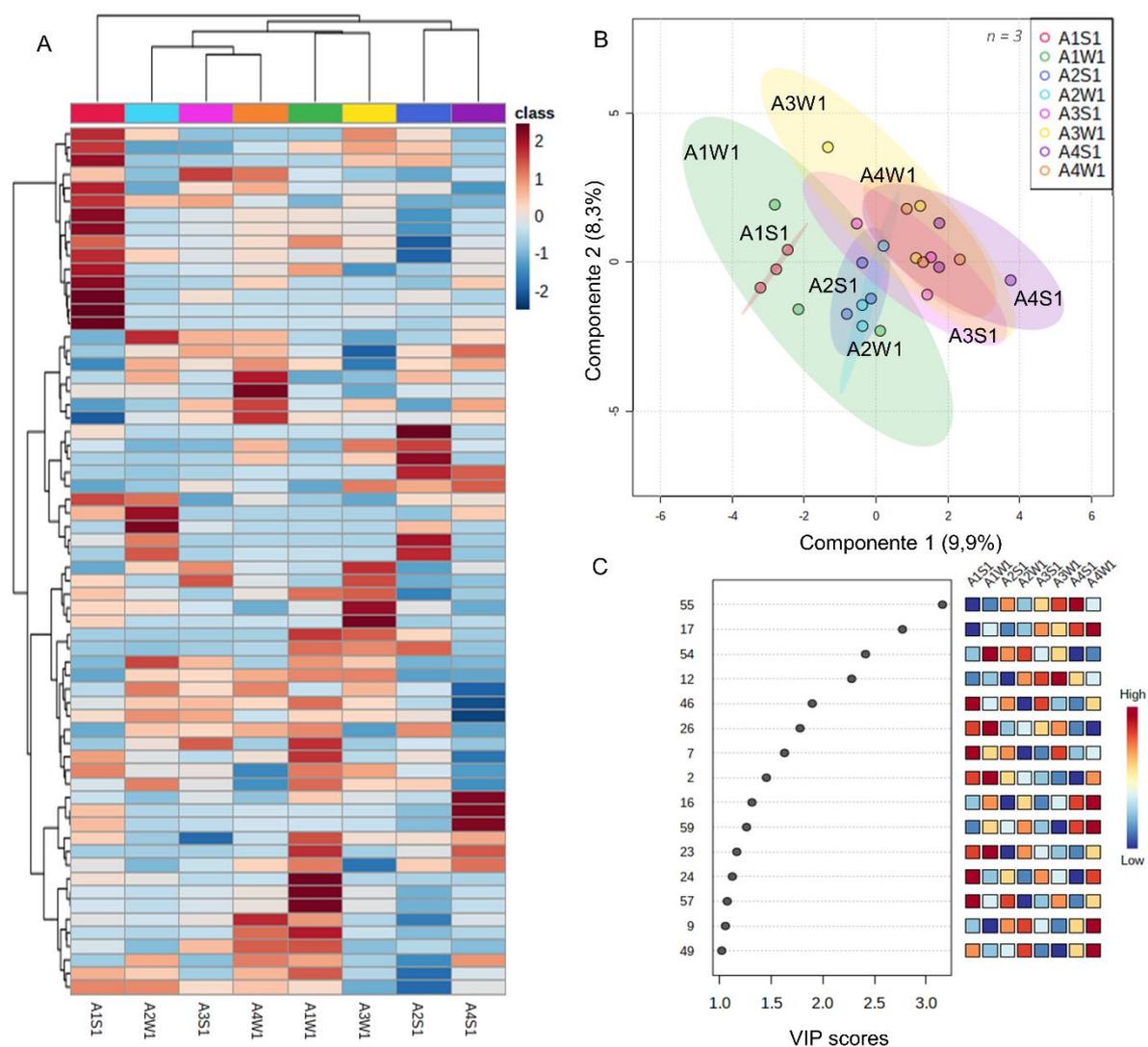


Figura 7 – Análise metabólica direcionada das amostras WS da estufa (S1) e respetivos controlos (W1) de quatro génotipos (A1, A2, A3 e A4): *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os grupos (indicados na parte inferior da figura) (A), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com todos os metabolitos dos quatro génotipos (B), metabolitos importantes identificados por PLS-DA e a sua concentração relativa em todos os grupos (C). Os dados foram normalizados pela mediana, transformação da raiz cúbica e escala de Pareto ($n = 3$).

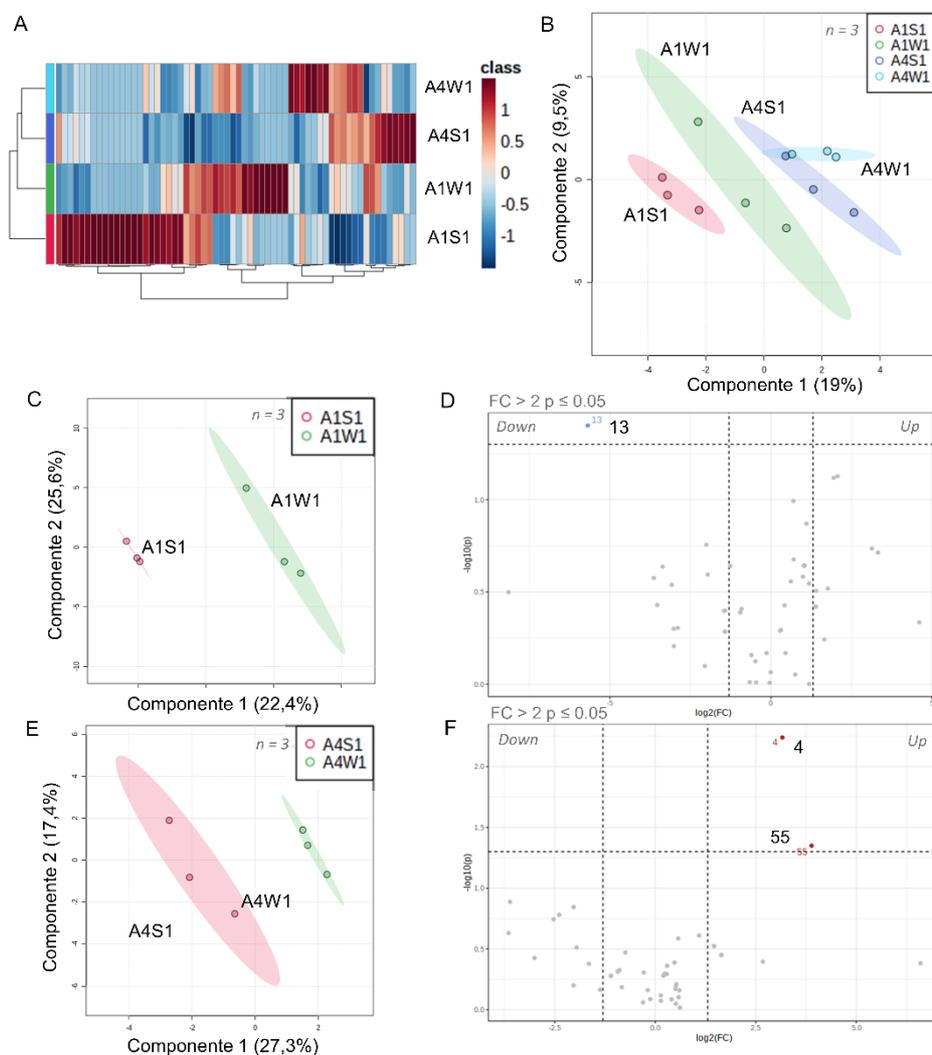


Figura 8 – Análise metabolómica direcionada das amostras dos genótipos A1 e A4 do grupo WS da estufa: *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os dois genótipos (grupos indicados na parte inferior da figura (A)), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os metabolitos dos dois genótipos (B), PLS-DA para o genótipo A1 (C), Volcano Plot para o genótipo A1 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativa ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (D), PLS-DA para o genótipo A4 (E), Volcano Plot para o genótipo A4 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativa ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (F).

Campo

Nas amostras WS do campo não se verificam diferenças significativas entre genótipos e entre os tratamentos, como se pode observar no *heatmap* (Figura 9A). Uma análise de PLS-DA não demonstra diferenças entre os grupos de controlo e de stresse em nenhum dos genótipos, mas demonstra que genótipo A4 não está agrupado com os genótipos A1 e A2, estando mais distante do genótipo A1 (Figura 9B). Na construção do modelo PLS-DA, destaca-se o aumento da concentração dos metabolitos 57, 69, 43, 66 e, particularmente do 11, que apresenta uma elevada concentração relativa. No genótipo A2 aumentou a concentração relativa dos metabolitos 77, 23, 22 e, particularmente do 57, que apresenta uma concentração elevada. Os metabolitos 46, 7, 24, 57 que apresentam uma elevada concentração relativa nos grupos de stresse face aos grupos de controlo, enquanto que no genótipo A4 se destaca o aumento do metabolito 55. Nos genótipos A3 verifica-se um aumento da concentração dos metabolitos 3, 43, 23, 22 e, particularmente do metabolito 67. No genótipo A4, houve um aumento face ao grupo de controlo dos metabolitos 77, 46, 11, 2, 67 e, particularmente, dos metabolitos 23 e 22 (Figura 9C).

Numa análise para comparar apenas os genótipos A1 e A4 das amostras do tratamento WS no campo, verifica-se com um *heatmap* que os grupos do genótipo A1 são agrupados num *cluster* e os grupos do genótipo A4 são agrupados noutra (Figura 10A). Este resultado é confirmado no gráfico do PLS-DA, onde também se verifica que as amostras do genótipo A1 são agrupadas conforme o regime hídrico e que o grupo A1S2 está mais distante do grupo A4W2 (Figura 10B). Quando analisadas individualmente (A1WWvsA1WS e A4WWvsA4WS), as amostras do genótipo A1 são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 10C) e um Volcano Plot ($FC > 2$ e valor de $P \leq 0,05$) revelou que a concentração dos metabolitos 44 e 71 aumentou entre o tratamento e o controlo do genótipo A1 (Figura 10D). Na análise individual do genótipo A4 as amostras do genótipo são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 10 E) e o Volcano Plot ($FC > 2$ e valor de $P \leq 0,05$) revelou que a concentração do metabolito 60 aumentou entre o tratamento e o controlo do genótipo A4 (Figura 10F).

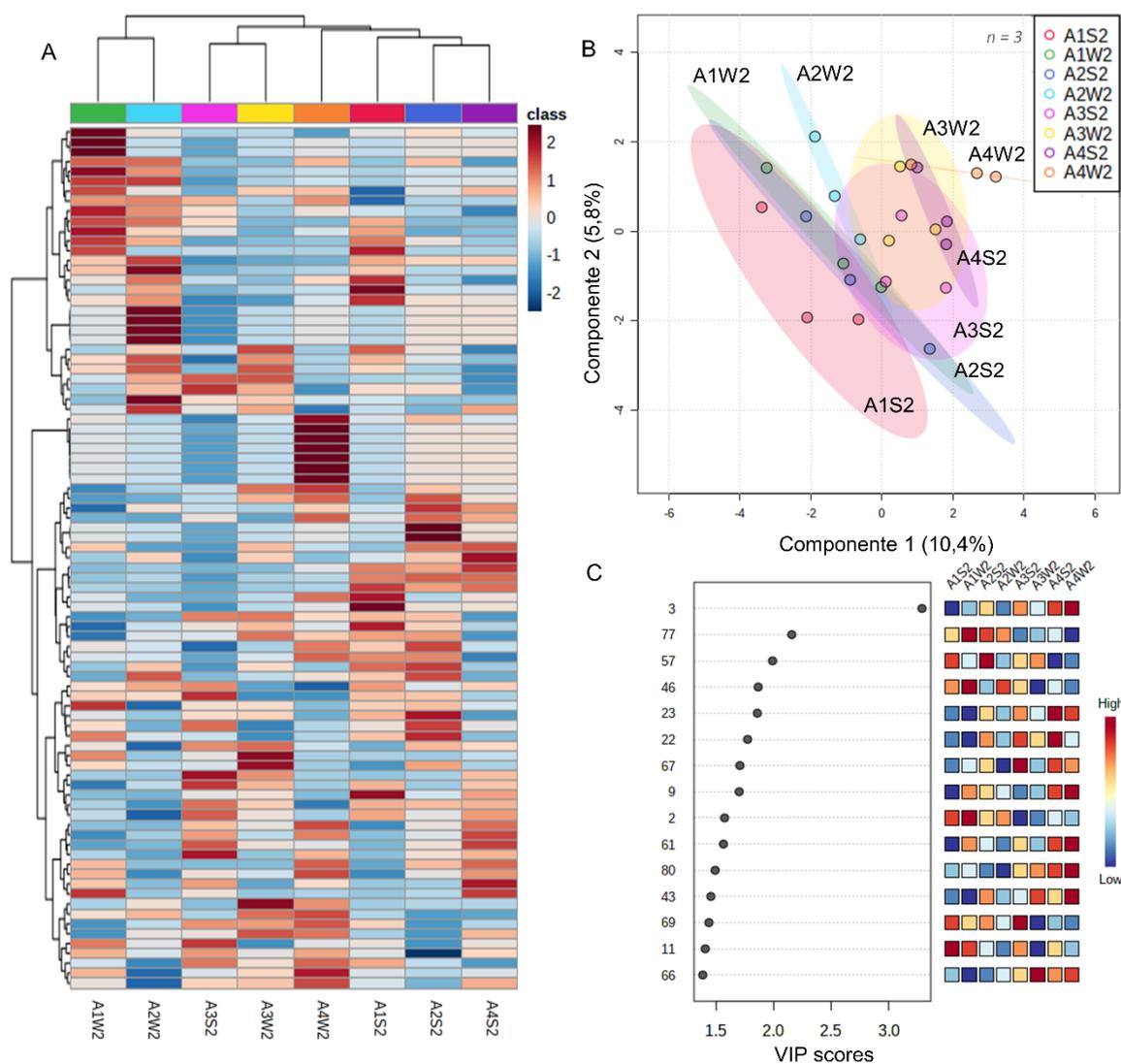


Figura 9 – Análise metabolómica direcionada das amostras WS do campo (S2) e respetivos controlos (W2) de quatro genótipos (A1, A2, A3 e A4): *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os grupos (indicados na parte inferior da figura) (A), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com todos os metabolitos dos quatro genótipos (B), metabolitos importantes identificados por PLS-DA e a sua concentração relativa em todos os grupos (C). Os dados foram normalizados pela mediana, transformação da raiz cúbica e escala de Pareto ($n = 3$).

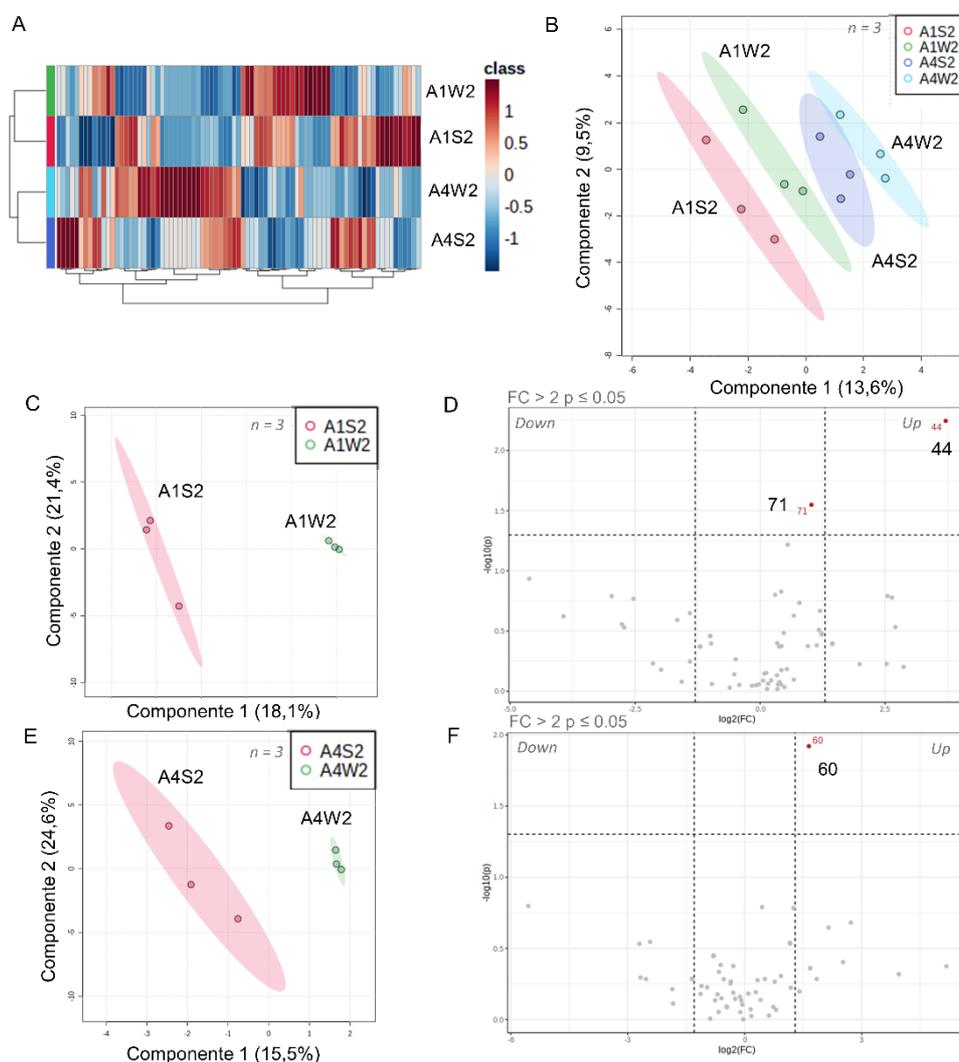


Figura 10 – Análise metabolómica direcionada das amostras dos genótipos A1 e A4 do grupo WS do campo: *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os dois genótipos (grupos indicados na parte inferior da figura (A), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os metabolitos dos dois genótipos (B), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para o genótipo A1 (C), Volcano Plot para o genótipo A1 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativamente ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (D), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para o genótipo A4 (E), Volcano Plot para o genótipo A4 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativamente ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (F).

3.1.2. Plantas em recuperação (RC)

Na análise metabolómica direcionada das amostras RC (*recover*), verificam-se diferenças em função da idade, mas não em função do genótipo ou do tratamento (controlo e stresse). Esta diferença pode ser observada no *heatmap* que revela dois *clusters* distintos nos perfis metabólicos entre as plantas RC da estufa e as plantas RC do campo (Figura 11A). A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) também confirma este resultado, revelando dois grupos distintos: (i) amostras RC e controlos da estufa (RC1 e W1) e (ii) amostras RC e controlos do campo (RC2 e W2), com uma contribuição para a variância de 16.2 % e 8.8 % do componente 1 e do componente 2, respetivamente (Figura 11B).

Apesar de não haver diferenças entre os perfis metabólicos dos diferentes genótipos, como confirmado através de uma análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) que não revela *clusters* distintos, é possível observar que os genótipos A1 e A4 apresentam os perfis mais distintos entre si (Figura 11C). Uma análise PLS-DA comparando os metabolitos nos diferentes locais e tratamentos, confirma que a idade das plantas influencia o perfil metabólico, mas que o regime hídrico não influencia os perfis metabólicos quer na estufa (RC1 = W1) quer no campo (RC2 = W2) (Figura 11D).

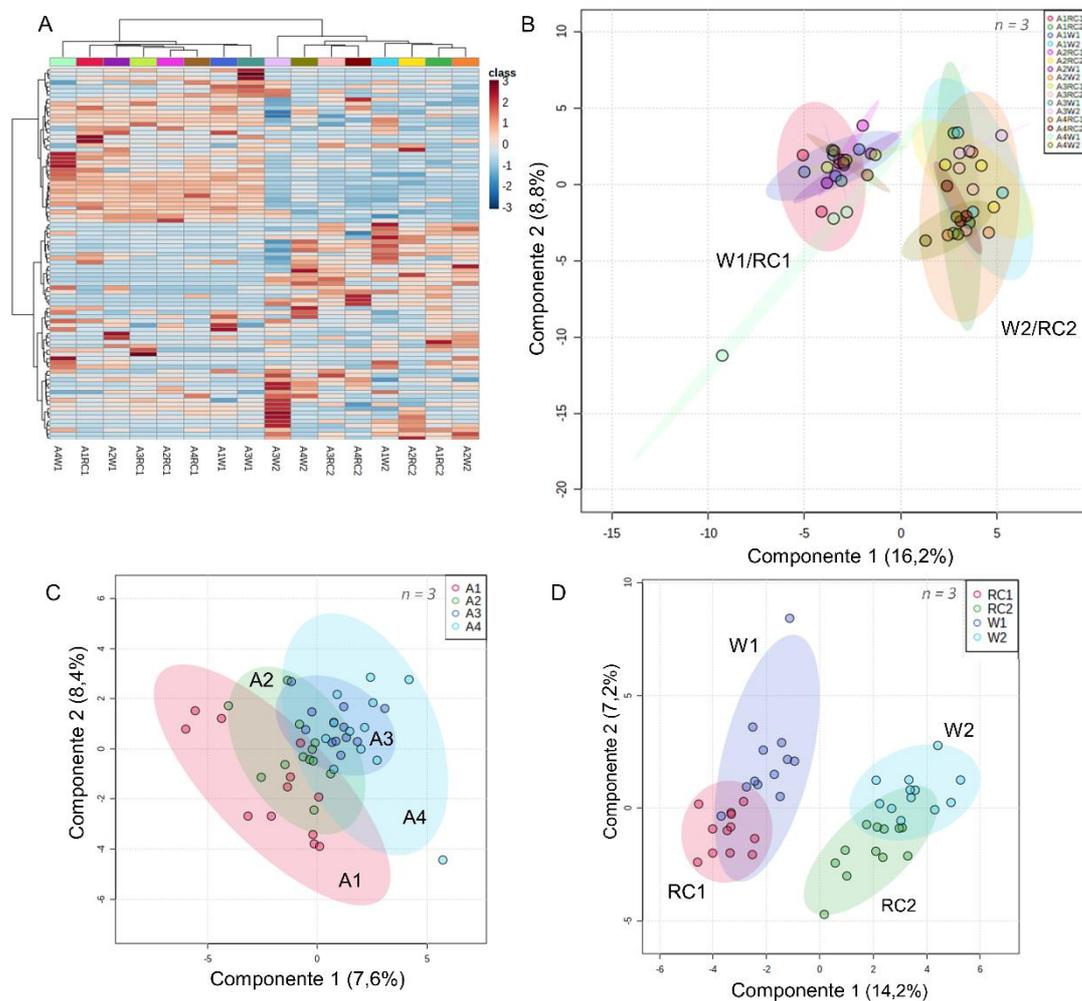


Figura 11 – Análise metabolómica direcionada das amostras quatro genótipos (A1, A2, A3 e A4): *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os grupos WS da estufa (RC1) e os grupos WS do campo (RC2), bem como os respectivos controlos (W1 e W2) (grupos indicados na parte inferior da figura (A)), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os metabolitos de todos os grupos (B), PLS-DA comparando os metabolitos dos diferentes genótipos (C), PLS-DA comparando os metabolitos nos diferentes locais e tratamentos (D).

Estufa

Numa análise mais focada nas amostras RC da estufa, um *heatmap* agrupou o grupo de stresse do genótipo A1 (A1RC1) com o próprio controlo (A1W1) e com os controlos dos genótipos A2 (A2W1) e A4 (A4W1) e agrupou o grupo de controlo do genótipo A3 (A3W1) com o respetivo grupo stresse (A3RC1) e com os grupos de stresse dos genótipos A2 (A2RC1) e A4 (A4RC1) (Figura 12A). Uma análise de PLS-DA não indica diferenças significativas entre os grupos de stresse e os grupos de controlo em nenhum dos genótipos demonstra que genótipo A1 não está agrupado com os genótipos A3 e A4, estando mais distante do genótipo A4 (Figura 12B). Na construção do modelo PLS-DA, destaca-se o aumento da concentração de vários metabolitos no genótipo A1, nomeadamente os metabolitos 57, 62, 17, 39, 3 e 69. No genótipo A4 verifica-se o aumento de vários metabolitos, como o 3, 15, 57, 17, contudo, nenhum apresenta uma elevada concentração relativa no grupo de stresse face ao grupo de controlo. Nos genótipos A2 e A3 verifica-se o aumento da concentração de vários metabolitos, com destaque dos metabolitos 3 e 26 e o metabolito 58, respetivamente, com elevada concentração relativa (Figura 12C).

Numa análise para comparar apenas os genótipos A1 e A4 das amostras do tratamento RC na estufa, verifica-se que as amostras do genótipo A1 são agrupadas conforme o regime hídrico aplicado como representado no gráfico do PLS-DA através dos *clusters* formados (Figura 13B). Quando analisadas individualmente (A1WWvsA1WS e A4WWvsA4WS), as amostras do genótipo A1 são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 13C) e o Volcano Plot ($FC > 2$ e valor de $P \leq 0,05$) revelou que uma alteração na concentração de 5 metabolitos entre o tratamento e o controlo do genótipo A1 (16, 17 e 18 aumentaram e 10 e 65 diminuíram) (Figura 13D). Na análise individual do genótipo A4 as amostras do genótipo são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 13E) e o gráfico do Volcano Plot ($FC > 2$ e valor de $P \leq 0,05$) revelou que uma alteração na concentração de 2 metabolitos entre o tratamento e o controlo do genótipo A4 (3 aumentou e 33 diminuiu) (Figura 13F).

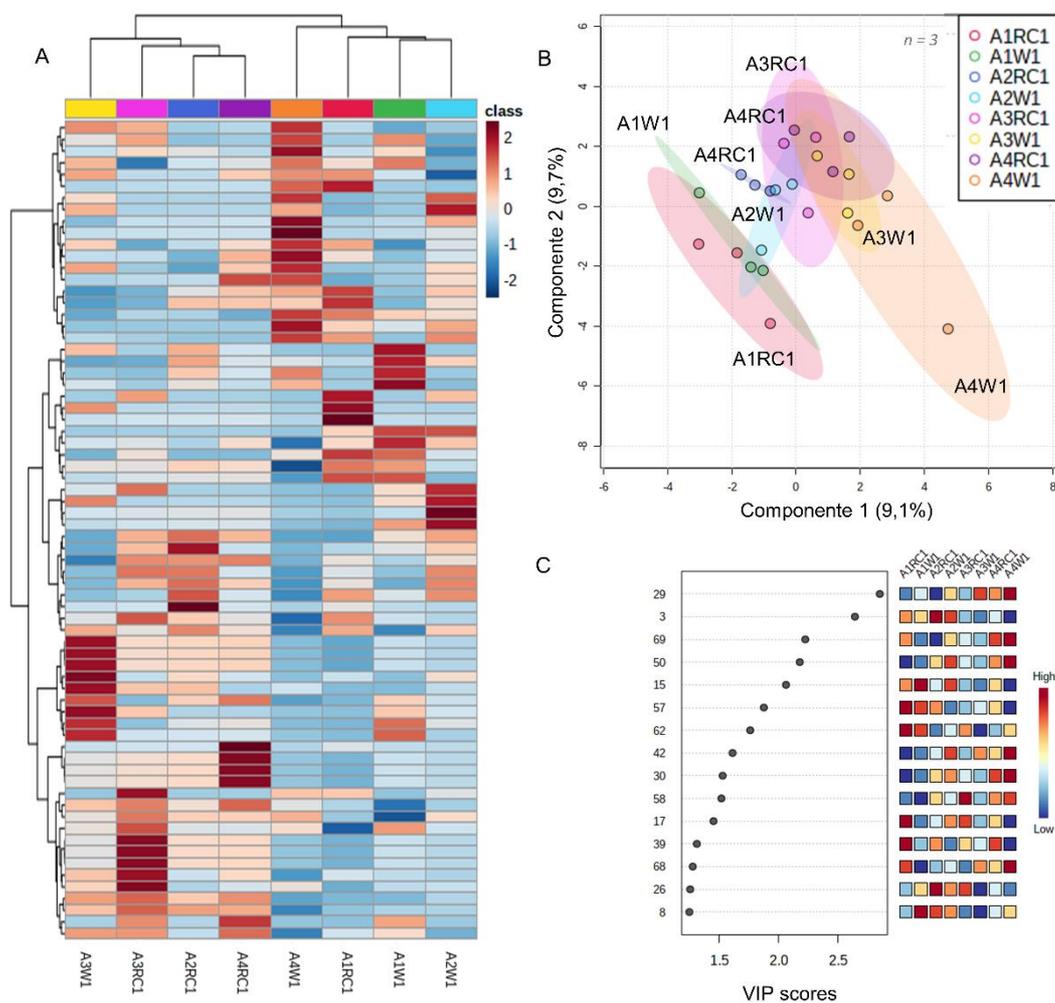


Figura 12 – Análise metabólica direcionada das amostras RC da estufa (RC1) e respectivos controles (W1) de quatro genótipos (A1, A2, A3 e A4): *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os grupos (indicados na parte inferior da figura) (A), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com todos os metabolitos dos quatro genótipos (B), metabolitos importantes identificados por PLS-DA e a sua concentração relativa em todos os grupos (C). Os dados foram normalizados pela mediana, transformação da raiz cúbica e escala de Pareto ($n = 3$).

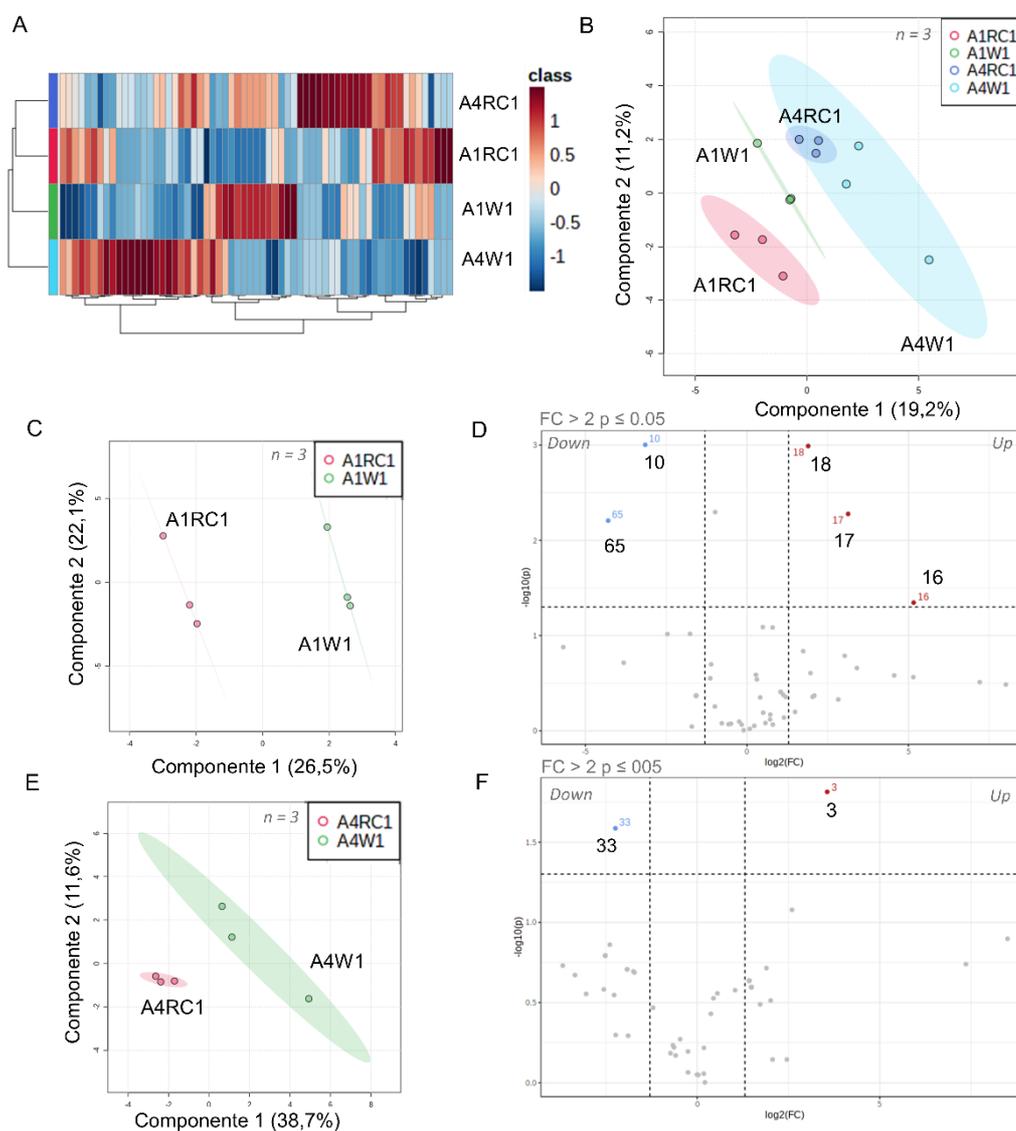


Figura 13 – Análise metabolómica direcionada das amostras dos génotipos A1 e A4 do grupo RC da estufa: *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os dois génotipos (grupos indicados na parte inferior da figura (A)), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os metabolitos dos dois génotipos (B), análise PLS-DA para o génotipo A1 (C), Volcano Plot para o génotipo A1 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativamente ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (D), análise PLS-DA para o génotipo A4 (E), Volcano Plot para o génotipo A4 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativamente ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (F).

Campo

Quando se analisaram as amostras RC do campo, os dados revelaram não haver diferenças significativas entre os grupos do genótipo A4 (A4W2 e A4RC2) e que os grupos do genótipo A1 (A1W2 e A1RC2) apresentam um perfil metabólico distinto entre si (Figura 14A). A análise de PLS-DA não indica diferenças significativas entre os grupos de stresse e os grupos de controlo em nenhum dos genótipos e, apesar de não demonstrar diferenças significativas entre genótipos, é possível observar que o genótipo A1 não está agrupado com os genótipos A4 (Figura 14B). Na construção do modelo PLS-DA, destacam-se no genótipo A1, os metabolitos 67, 18, 65, e particularmente, o 30 que apresenta uma elevada concentração relativa, enquanto que no genótipo A4 se destaca o aumento dos metabolitos 67, 79 e 65. Nos genótipos A2 destaca-se o aumento do metabolito 30, com elevada concentração e também dos metabolitos 76, 83, 15, enquanto que no genótipo A3 se destacam vários metabolitos com elevada concentração no grupo de stresse face ao controlo, nomeadamente os metabolitos 13, 41, 56, 61 (Figura 14C).

Numa análise para comparar apenas os genótipos A1 e A4 das amostras do tratamento RC no campo, verifica-se que o genótipo A1 é diferente do genótipo A4, sendo o grupo de stresse do A1 mais distante do controlo do A4, como se pode confirmar no *heatmap* (Figura 15A) e através dos *clusters* formados na análise de PLS-DA (Figura 15B). Quando analisadas individualmente (A1WWvsA1WS e A4WWvsA4WS), as amostras do genótipo A1 são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 15C) e o Volcano Plot ($FC > 2$ e valor de $P \leq 0,05$) revelou que uma alteração na concentração de 2 metabolitos entre o tratamento e o controlo do genótipo A1 (37 aumentou e 36 diminuiu) (Figura 15D). Na análise individual do genótipo A4 as amostras do genótipo são agrupadas de acordo com o regime hídrico aplicado (Figura 15E) e no Volcano Plot ($FC > 2$ e valor de $P \leq 0,05$) verifica-se que a concentração do metabolito 58 diminuiu entre o tratamento e o controlo do genótipo A4 (Figura 15F).

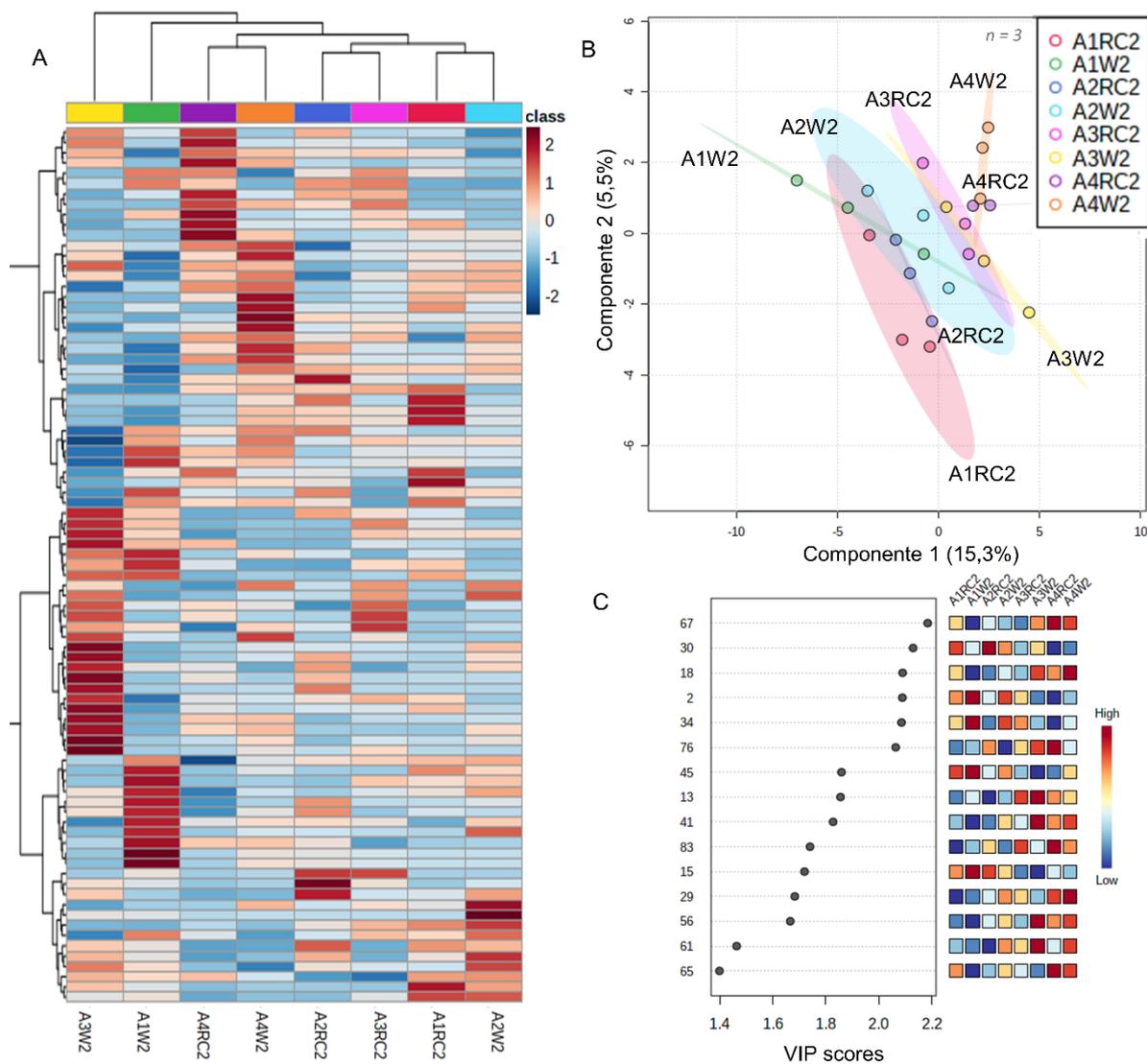


Figura 14 – Análise metabolómica direcionada das amostras RC do campo (RC2) e respetivos controlos (W2) de quatro genótipos (A1, A2, A3 e A4): *heatmap* representativo dos metabolitos principais significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os grupos (indicados na parte inferior da figura) (A), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com todos os metabolitos dos quatro genótipos (B), metabolitos importantes identificados por PLS-DA e a sua concentração relativa em todos os grupos (C). Os dados foram normalizados pela mediana, transformação da raiz cúbica e escala de Pareto ($n = 3$).

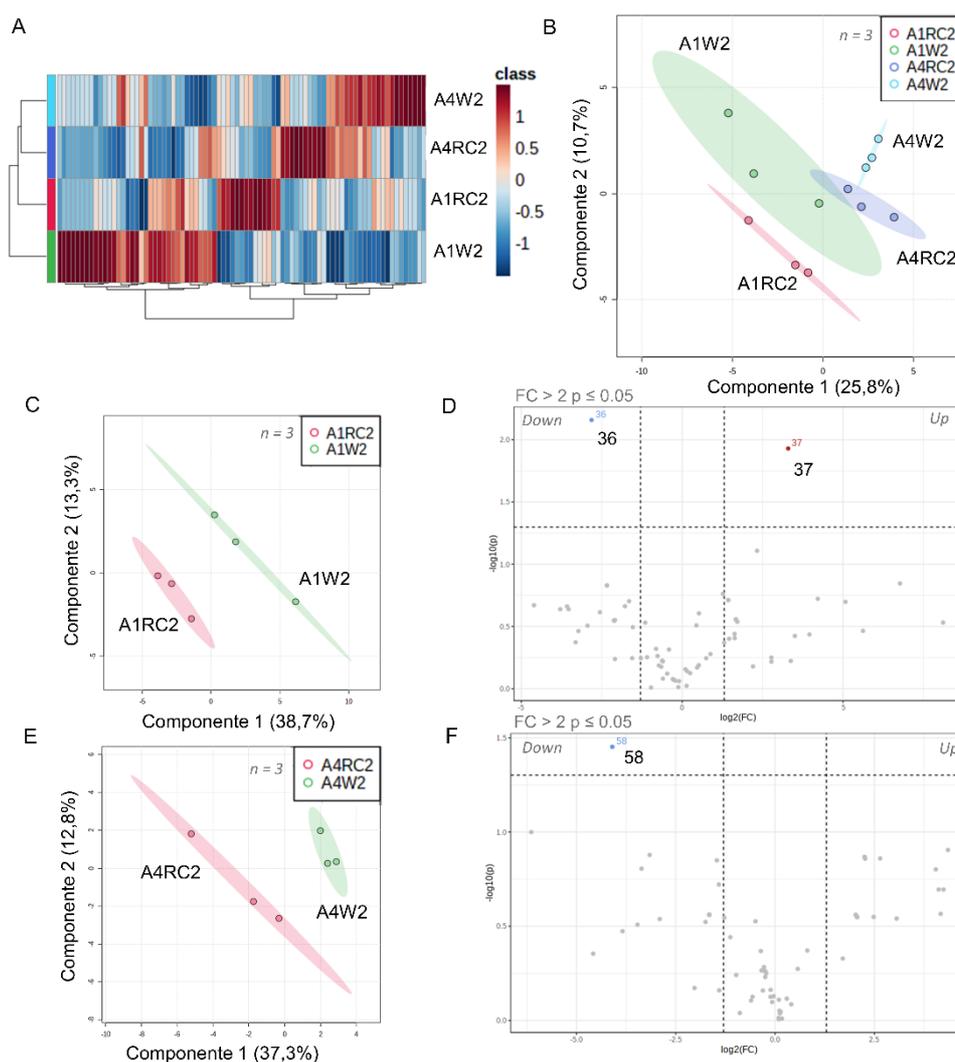


Figura 15 – Análise metabolómica direcionada das amostras dos genótipos A1 e A4 do grupo RC do campo: *heatmap* representativo dos metabolitos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os dois genótipos (grupos indicados na parte inferior da figura (A), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os metabolitos dos dois genótipos (B), análise PLS-DA para o genótipo A1 (C), Volcano Plot para o genótipo A1 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativamente ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (D), análise PLS-DA para o genótipo A4 (E), Volcano Plot para o genótipo A4 com os metabolitos significativos regulados positiva e negativamente ($P < 0,05$ e $FC > 2$) no grupo de controlo quando comparado com o grupo de stresse (F).

3.1.3. Quantificação absoluta da arbutina

Nas 24 amostras do grupo WS (*water stressed*) da estufa (S1) e respetivo controlo (W1), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no conteúdo de arbutina entre os grupos de controlo e de stresse em nenhum dos quatro genótipos (Figura 16A) e nas 24 amostras do campo (S2) e respetivo controlo (W2), também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no conteúdo de arbutina entre os grupos de controlo e de stresse em nenhum dos quatro genótipos (Figura 16B). Numa análise com as 48 amostras para comparar o conteúdo de arbutina dos grupos WS e dos respetivos controlos na estufa com os mesmos grupos no campo, não se verificam diferenças significativas entre tratamentos e genótipos (Figura 16C).

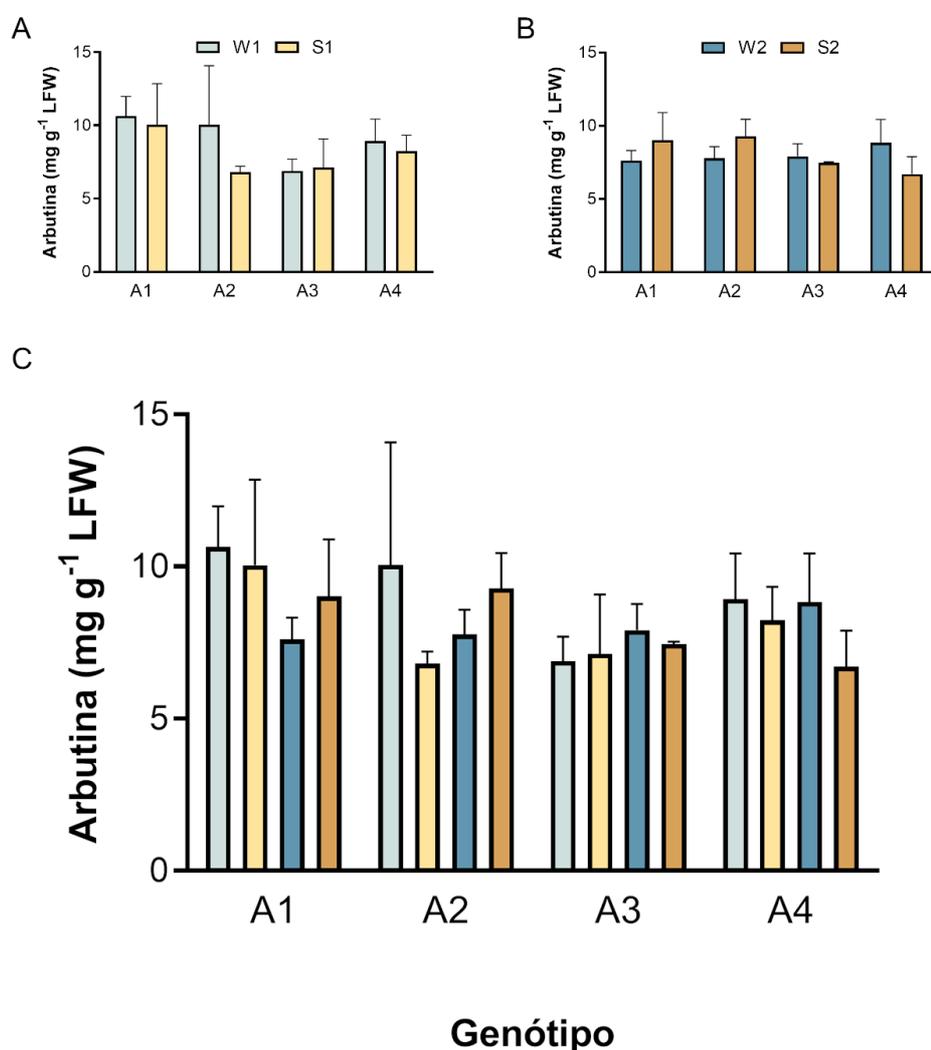


Figura 16 – Concentração de arbutina expressa em mg g⁻¹ de massa de folha fresca de quatro genótipos (A1, A2, A3 e A4) dos grupos WS e respetivos controlos na estufa (W1 e S1) (A), no campo (W2 e S2) (B) e comparação geral dos grupos da estufa em relação aos grupos do campo (C). Médias ± desvio padrão, n = 3, para $P \leq 0.05$.

Nas 24 amostras do grupo RC (recover) da estufa (RC1) e respetivo controlo (W1), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no conteúdo de arbutina entre os grupos de controlo e de stresse em nenhum dos quatro genótipos (Figura 17A) e nas 24 amostras do campo (RC2) e respetivo controlo (W2), também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no conteúdo de arbutina entre os grupos de controlo e de stresse (Figura 17B). Numa análise com as 48 amostras para comparar o conteúdo de arbutina dos grupos RC e dos respetivos controlos na estufa com os mesmos grupos no campo, verifica-se uma diminuição estatisticamente significativa das amostras RC e respetivos controlos do campo em relação às amostras RC da estufa, em todos os genótipos (Figura 17C-E).

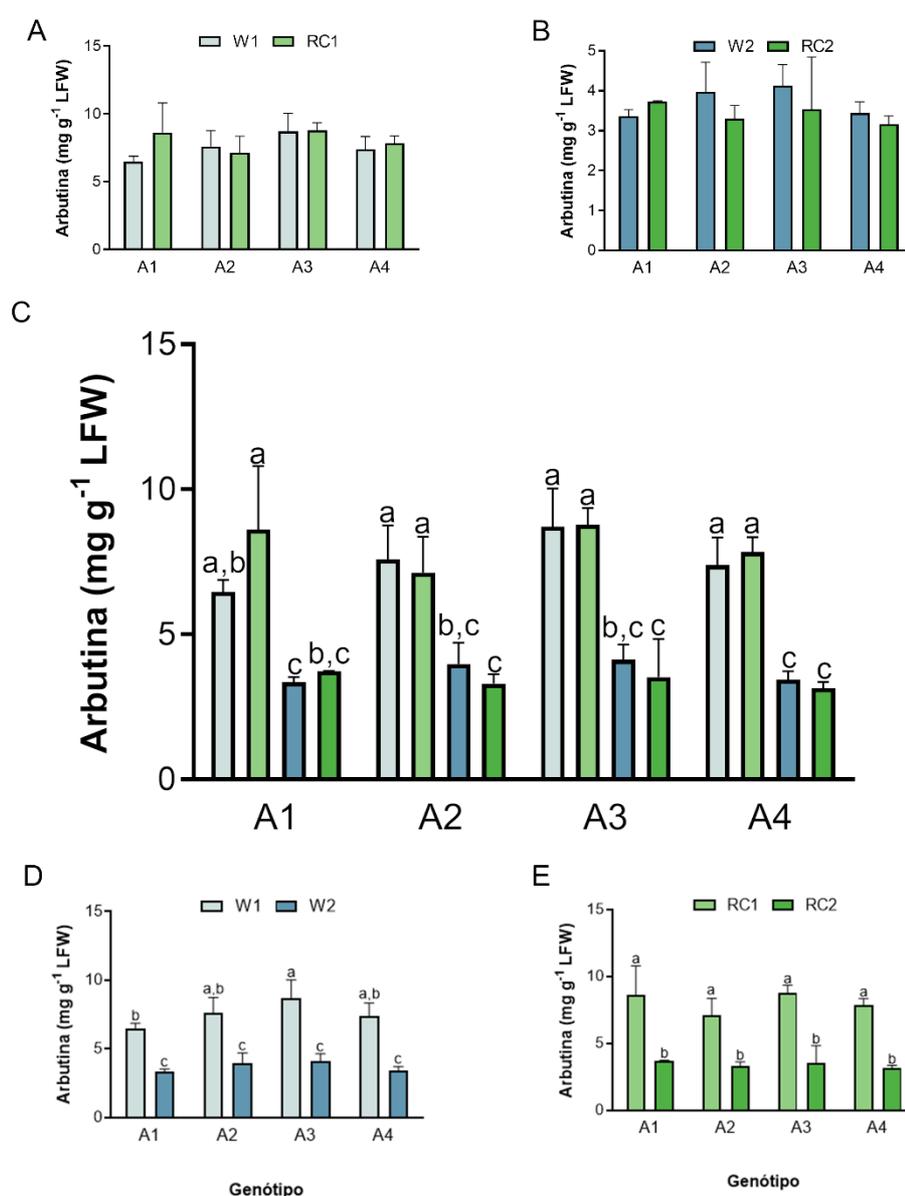


Figura 17 – Concentração de arbutina expressa em mg g⁻¹ de massa de folha fresca de quatro genótipos (A1, A2, A3 e A4) dos grupos RC e respetivos controlos na estufa (W1 e RC1) (A), no campo (W2 e RC2) (B), comparação geral dos grupos da estufa em relação aos grupos do campo (C), comparação entre os

grupos de controlo da estufa em relação ao campo (D) e comparação entre os grupos de stresse na estufa em relação ao campo (E). Médias \pm desvio padrão, $n = 3$, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para $P \leq 0.05$.

3.2. Priming

Após 60 dias da inoculação, foi possível observar diferenças a nível morfológico nos rebentos caulinares. Os rebentos dos controlos dos dois genótipos apresentavam maior comprimento e folhas mais verdes (Figura 18A e B) em relação aos rebentos dos tratamentos quer com PEG 5% (Figura 18C e D) quer com PEG 7,5% (Figura 18E e F), que apresentavam menores dimensões, folhas com um tom mais avermelhado e com mais vitrificação. Não se verificaram diferenças a olho nu relativamente aos rebentos do tratamento com PEG 5% em relação ao tratamento com PEG 7,5% quer no genótipo A4 quer no genótipo A5.

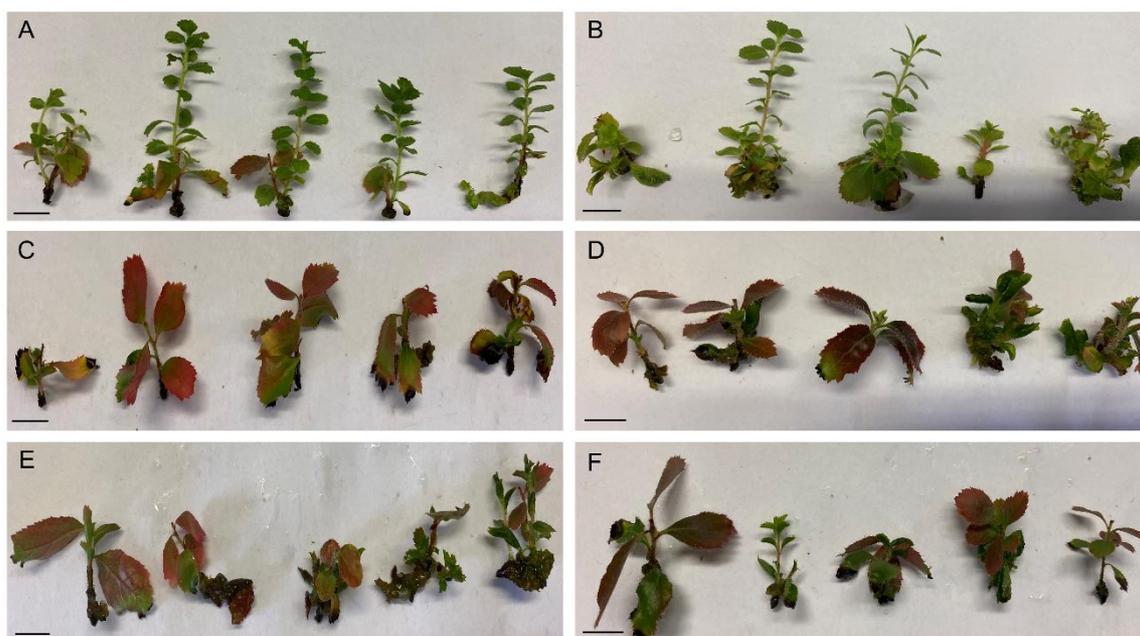


Figura 18 – Rebentos caulinares com 60 dias de cultura de dois genótipos (A4 e A5) e de três tratamentos (controlo, PEG 5% e PEG 7,5%): controlo A4 (A), controlo A5 (B), PEG 5% A4 (C), PEG 5% A5 (D), PEG 7,5% A4 (E) e PEG 7,5% (E).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos a nível da clorofila a, clorofila b, carotenoides, antocianinas, fenóis e ortofenóis, quer no genótipo A4 quer no genótipo A5 (Figura 19A-F).

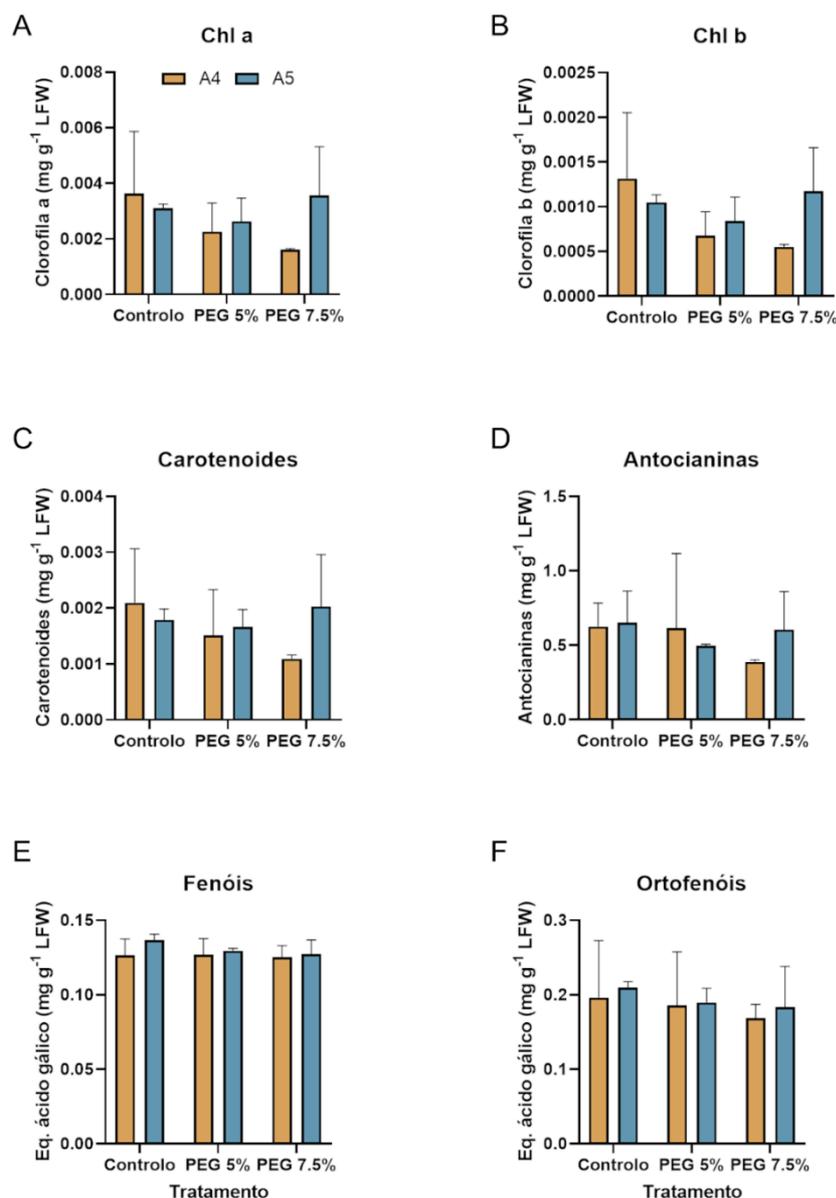


Figura 19 – Parâmetros bioquímicos medidos em dois genótipos (A4 e A5) e em três tratamentos (controlo, PEG 5% e PEG 7,5%): clorofila a (A), clorofila B (B), carotenoides (C), antocianinas (D), fenóis expressos como equivalentes de ácido gálico (mg g⁻¹ de massa de folha fresca) (F) e ortofenóis expressos como equivalentes de catequina (mg g⁻¹ de massa de folha fresca) (E). Médias ± desvio padrão, n = 3 para as clorofilas, carotenoides e antocianinas e n = 6 para os fenóis e ortofenóis. $P \leq 0.05$. Chl a - b clorofila a, Chl b - clorofila b.

A nível do conteúdo de flavonoides, verificou-se uma diminuição em ambos os genótipos (Figura 20A). No genótipo A4 existe diferença significativa entre o grupo de controlo e o grupo de PEG 7,5%, mas não existe diferenças entre o controlo e o PEG 5%, nem diferenças entre os dois tratamentos de PEG (Figura 20C). No genótipo A5 verificam-se diferenças significativas entre o controlo e o PEG 7,5% (Figura 20D). Entre o controlo e o PEG 5%, quando analisados com ANOVA de uma via, verifica-se uma diferença significativa, apesar de quando analisados através de uma ANOVA de duas vias a diferença não ser estatisticamente significativa, o valor de $p = 0,06$, mostrando uma tendência para os resultados da ANOVA de uma via. Não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os dois tratamentos de PEG. No conteúdo de prolina, verificam-se diferenças no genótipo A5 (Figura 20B), mas não no genótipo A4 (Figura 20E). No genótipo A5, existe um aumento significativo entre os grupos controlo e o PEG 7,5%, mas não se verificaram diferenças entre o controlo e o PEG 5%, nem entre os dois tratamentos de PEG (Figura 20F).

Uma análise de Componentes Principais (PCA) revela dois *clusters* distintos com as amostras dos grupos controlo e PEG 7,5% do genótipo A4 (Figura 21A), de acordo com o tratamento, com uma contribuição de 78 % e 10,5 % do componente principal 1 (PC1) e do componente principal 2 (PC2), respetivamente, para a variância. A análise de PCA para o genótipo A5 não revela *clusters* distintos (Figura 21B). No *heatmap*, o tratamento com PEG 7,5% do genótipo A5 (A5 PEG 7,5%) foi agrupado com os grupos controlo dos dois genótipos (A4 C e A5 C) e os restantes tratamentos de stresse foram agrupados no mesmo *cluster* (A4 PEG 5%, A5 PEG 5% e A4 PEG 7,5%), destacando-se os níveis basais elevados de fenóis e ortofenóis no controlo do genótipo A5 e de flavonoides no controlo do genótipo A4 (Figura 21C).

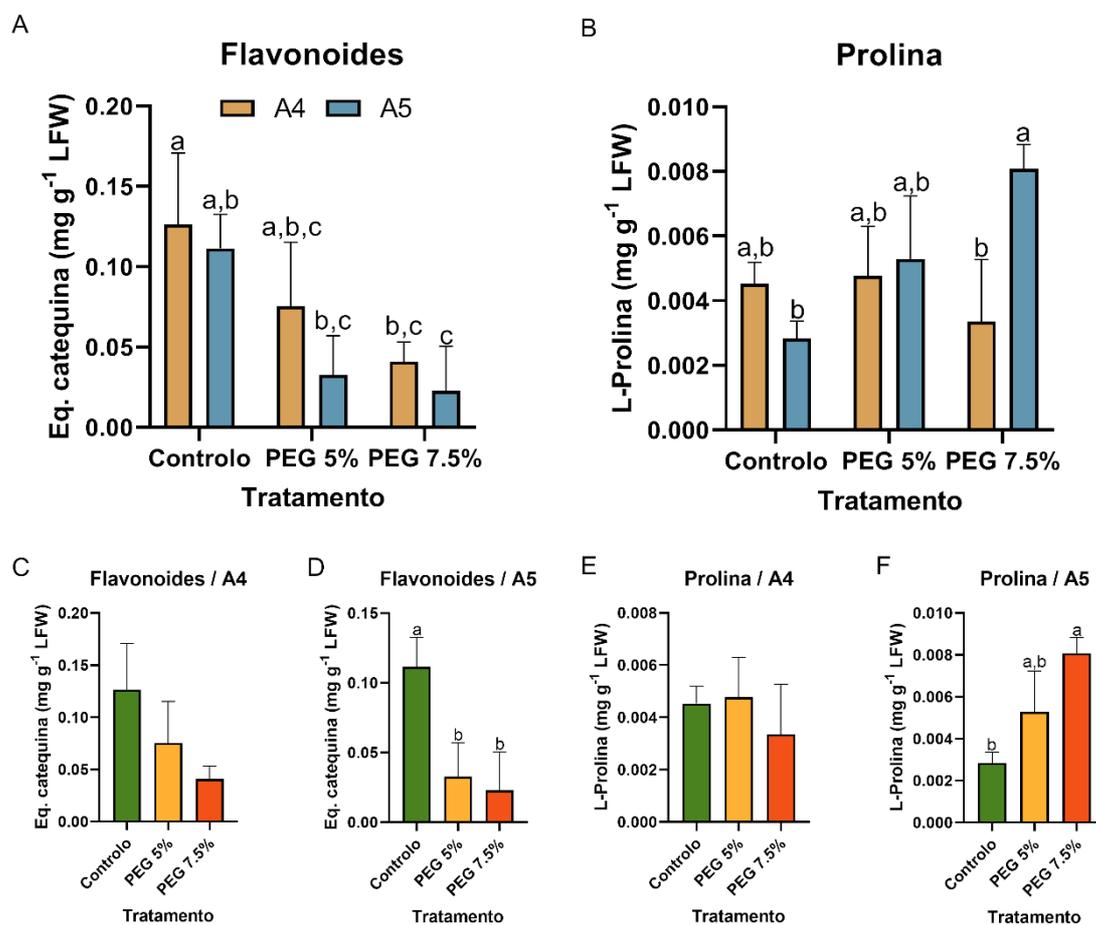


Figura 20 – Parâmetros bioquímicos medidos em dois genótipos (A4 e A5) e em três tratamentos (controlo, PEG 5% e PEG 7,5%): flavonoides (A), prolina (B). Análise dos flavonoides expressos como equivalentes de ácido gálico (mg g^{-1} de massa de folha fresca) no genótipo A4 (C) e no genótipo A5 (D). Análise da prolina no genótipo A4 (E) e no genótipo A5 (F). Médias \pm desvio padrão, $n = 6$ para os flavonoides e $n = 3$ para a prolina, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para $P \leq 0.05$.

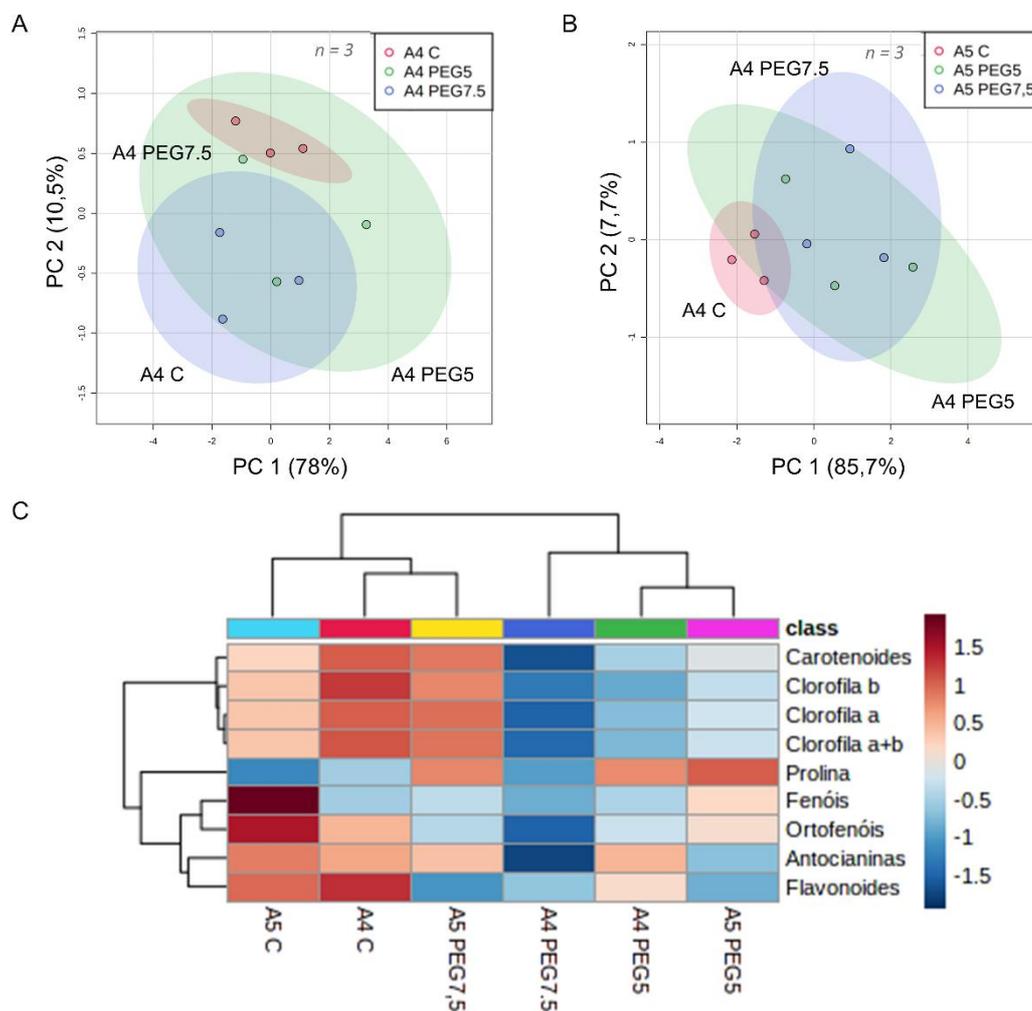


Figura 21 – Parâmetros bioquímicos medidos em dois genótipos (A4 e A5) e em três tratamentos (controle, PEG 5% e PEG 7,5%): análise de Componentes Principais com os parâmetros bioquímicos medidos no genótipo A4 (A), análise de Componentes Principais com os parâmetros bioquímicos medidos no genótipo A5 (B) e *heatmap* com parâmetros bioquímicos dos diferentes grupos (grupos indicados na parte inferior da figura) (C). Os dados foram normalizados por normalização mediana, transformação de raiz cúbica e escala de Pareto.

4. Discussão

4.1. Metabolómica direcionada

Num estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo, onde foram utilizadas as mesmas plantas utilizadas no presente estudo, enquanto estavam na estufa, foi demonstrada a relevância das mudanças metabolómicas para combater o stresse hídrico, através de uma análise de metabolómica não direcionada que revelou que a concentração de vários metabolitos, particularmente compostos fenólicos, foi alterada sob stresse hídrico (dados não publicados). A metabolómica das plantas tem sido muito utilizada para avaliar o impacto do stresse no metabolismo da planta e identificar determinados compostos de vias metabólicas específicas (Arbona et al. 2013). No presente estudo, foi analisado o efeito do stresse hídrico no perfil fenólico de diferentes génotipos das plantas na estufa e no campo, bem como analisada a influência do génotipo, do tratamento e da idade na metabolómica das plantas.

Numa primeira abordagem, ao comparar a metabolómica, particularmente o perfil fenólico, das plantas da estufa e do campo, tanto nas amostras de stresse (WS) como nas de recuperação (RC), verificaram-se diferenças entre a idade das plantas, dado que as plantas da estufa foram agrupadas num *cluster* e as do campo noutra e observou-se que a concentração de vários metabolitos variou nas plantas do campo em relação às plantas da estufa. Na comparação entre a estufa e o campo, tem de se ter em conta a localização em que as plantas se encontravam, uma vez que os estudos de stresse hídrico realizados *in vitro* e na estufa são realizados em condições controladas, mas num ambiente natural há sempre fatores que não são controláveis (Albergaria et al. 2020) e que afetam o metabolismo e a produtividade das plantas. Além disso, a idade das plantas também é um fator importante (Li et al. 2020), pois diferentes metabolitos são biossintetizados em diferentes estágios do crescimento da planta e a idade da cultura na época de colheita também influencia a concentração de metabolitos, sendo que existem estudos que relatam que folhas mais jovens apresentam maiores teores de metabolitos (Wan-Nadilah et al. 2019) e outros o oposto (Achakzai et al. 2009). No presente estudo as plantas tinham 2 anos quando as folhas foram colhidas na estufa e 5 anos na altura da colheita no campo. Num estudo com faias, foi observada uma diminuição de compostos fenólicos ao fim de dois anos no campo, o que foi explicado como uma adaptação das plantas ao local e às condições do ambiente (Steen et al. 2021). Em contraste, a análise do perfil fenólico demonstrou que o génotipo e o regime hídrico (controlo e stresse) não influenciaram o perfil fenólico no presente estudo. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, o desempenho da planta sob stresse hídrico e a sua capacidade de tolerância e recuperação mostraram ser dependentes do génotipo, contudo, foram apenas realizadas análises com base em dados fisiológicos (Martins et al. 2021a) e numa análise

metabolómica não direcionada (dados não publicados). Um estudo com 50 genótipos de *Triticum turgidum* relatou que os impactos do stresse hídrico na concentração dos compostos fenólicos foram dependentes do genótipo (Liu et al. 2018). Em contraste com os resultados do presente estudo, um estudo com plantas do clima mediterrânico, relatou que o tratamento de seca teve efeitos consideráveis no metaboloma (Rivas-Ubach et al. 2012). Apesar de não haver diferenças em função do genótipo, uma análise mais detalhada revelou que os genótipos A1 e A4 apresentaram os perfis mais contrastantes entre si, tanto nas plantas WS como RC, o que já tinha sido observado através da análise metabolómica não direcionada no estudo anterior (dados não publicados). Ao analisar de forma individual as amostras WS e RC nos diferentes locais, os resultados obtidos foram sempre consistentes com a análise geral, não se verificando diferenças entre genótipos e tratamentos (controlo e stresse) e sendo sempre constante a diferença de perfis metabólicos entre os genótipos A1 e A4.

Na análise do perfil fenólico das plantas WS na estufa foi possível observar que o genótipo A1 sob stresse apresenta um perfil metabólico distinto, ao possuir um conteúdo mais elevado de vários metabolitos em comparação com os outros grupos, incluindo o seu grupo de controlo, que também apresenta outros metabolitos com conteúdo elevado. Na construção do modelo de PLS-DA nas amostras WS da estufa, dos metabolitos com mais importância, destaca-se no genótipo A1, os metabolitos 46 e 57 que apresentam uma elevada concentração relativa nos grupos de stresse face aos grupos de controlo e em relação ao genótipo A4, e no genótipo A4 destaca-se o aumento da concentração do metabolito 55 em função do controlo e do genótipo A4, que com base na comparação de cromatogramas e tempos de retenção sabe-se que são compostos fenólicos. A síntese de compostos fenólicos é geralmente estimulada em resposta aos stresses biótico e abiótico (Sánchez-Rodríguez et al. 2011). Em contraste, no estudo anterior, foi o genótipo A4 que apresentou um perfil metabólico distinto em relação aos restantes grupos e os níveis basais (no grupo de controlo) dos fenóis identificados foram consideravelmente maiores em relação aos níveis basais no genótipo A1 (dados não publicados). Nas plantas RC na estufa, o grupo de stresse do genótipo A1 foi agrupado no mesmo *cluster* que os grupos de controlo. Nesta análise destacou-se no genótipo A1 a elevada concentração de dois compostos fenólicos no grupo de controlo e o aumento da sua concentração sob stresse, nomeadamente os metabolitos 57 e 62, assim como de outros metabolitos, enquanto que no genótipo A4 se destacou a diminuição de vários metabolitos sob stresse em relação ao controlo. Na análise de metabolómica não direcionada realizada anteriormente, o genótipo A4 foi consistente ao apresentar o melhor desempenho entre os

quatro genótipos em estudo, quer sob stresse hídrico quer posteriormente na recuperação, especialmente em relação ao genótipo A1 (dados não publicados). Esta diferença foi explicada através de uma possível correlação entre a proveniência do genótipo e o seu desempenho sob stresse, dado que, o genótipo com pior desempenho (A1) é originário de uma região com alta pluviosidade média, enquanto o genótipo de melhor desempenho (A4) provinha de uma área com baixa pluviosidade média. No entanto, essa correlação não foi encontrada para todos os genótipos em estudo, sugerindo que, embora a proveniência seja um dos aspetos que influenciam o desempenho das plantas sob défice hídrico, o genótipo será o fator determinante (dados não publicados). O mesmo se verificou num estudo com plantas híbridas de medronheiro, onde foram analisados trinta genótipos de duas origens e em ambas as populações havia plantas muito e pouco resistentes ao stresse hídrico (Martins et al. 2021a). Num estudo com faias, a concentração de compostos fenólicos nas folhas dependeu mais das condições ambientais do que da proveniência geográfica das plantas (Steen et al. 2021). Na construção dos modelos de PLS-DA para as plantas do campo, dos metabolitos considerados importantes, a maioria são compostos fenólicos, nomeadamente os metabolitos 57, 69, 43, 66, 77, 57, 67 nas amostras de stresse e 67, 65, 79, 76, 83, 56, 61 nas amostras de recuperação, enquanto que na estufa apenas uma parte dos metabolitos indicam ser compostos fenólicos com base na comparação de cromatogramas e espetros. No estudo anterior, em todos os genótipos, as plantas de recuperação recuperaram a performance fisiológica quando se retomou a irrigação após o stresse (dados não publicados), contudo, isto pode não acontecer em situações em que o stresse é mais prolongado e, no presente estudo, as plantas do campo estiveram sujeitas a diversos fatores de stresse, sendo difícil estabelecer correlações entre a atividade dos metabolitos e o stresse hídrico devido à presença de vários fatores que não são controlados e que também afetam o desenvolvimento das plantas (Lascano et al. 2001).

Embora não se tenham verificado diferenças significativas, ao comparar diretamente os dois genótipos que se revelaram mais contrastantes entre si, foi constante em todos os grupos e nos dois locais que a concentração de vários metabolitos sofreu alterações. O grupo de stresse do genótipo A1 mostrou sempre ser mais contrastante em relação ao grupo de controlo, ao contrário do genótipo A4, indicando mais uma vez mais que o genótipo A4 é mais tolerante. No presente estudo, dos metabolitos que foram regulados positivamente com o stresse, destacam-se o metabolito 55 nas amostras WS da estufa e os metabolitos 33 e 17 nas amostras RC da estufa, uma vez que a alteração da sua concentração foi significativa tanto na análise do Volcano Plot como para a construção do modelo de PLS-DA. Estes metabolitos poderão

eventualmente ser marcadores metabolômicos, mas será necessário, numa fase posterior, confirmar e proceder à sua identificação.

Neste ensaio, também foi quantificada a arbutina para determinar se o stresse hídrico tem algum efeito na sua concentração nas plantas. Nas plantas dos grupos WS e RC, ao comparar os tratamentos, quer na estufa quer no campo, não se verificaram diferenças significativas na concentração de arbutina entre grupos de controlo e stresse, em nenhum dos genótipos. Quando se comparou as amostras WS da estufa com as do campo, não se verificaram diferenças significativas, contudo, no geral, é possível observar uma tendência para a diminuição dos teores de arbutina. Quando se comparou as amostras RC da estufa com as amostras do campo, em todos os genótipos se observou uma diminuição significativa dos teores de arbutina, quer nos grupos de controlo quer nos grupos de stresse. Como mencionado anteriormente, quando se compara as plantas da estufa e do campo, é necessário considerar os fatores de stresse num ambiente natural que não são controláveis em relação às condições na estufa, bem como a idade das plantas nos dois locais. Existe pouca bibliografia sobre a influência da idade na concentração de arbutina, mas num estudo realizado com pereiras, a concentração de arbutina foi superior em tecidos mais jovens (Cui et al. 2005). Além disso, outro fator a considerar é efetivamente a altura do ano em que a colheita das folhas foi realizada, dado que a colheita na estufa foi feita em junho e no campo em janeiro. Um estudo realizado pelo nosso grupo com plantas do campo onde foram colhidas folhas ao longo do ano, demonstraram que a concentração de arbutina varia ao longo do ano, tendo sido superior em junho em relação a dezembro e fevereiro (Martins et al. 2021c), o que pode explicar a diminuição do conteúdo de arbutina das plantas no campo. Um estudo com plantas do clima mediterrânico relatou que na primavera e no outono, as folhas das plantas sujeitas a stress em relação às plantas de controlo, apresentaram maiores concentrações de compostos antioxidantes, como alguns compostos fenólicos (Rivas-Ubach et al. 2012).

Estes resultados parecem indicar que a extração de arbutina de forma a obter o melhor rendimento, deve ser feita a partir de plantas de medronheiro mais jovens e a crescer em estufa e a colheita das folhas deve ser feita entre junho e outubro.

4.2. Priming

O stresse induzido pelo PEG induz uma resposta de prevenção por parte das plantas ao alterar a sua morfologia, através de uma redução no crescimento, em particular da parte aérea

da planta (Xiao et al. 2008; Guo et al. 2020), o que já foi reportado no medronheiro (Vasques et al. 2013) e em outras espécies, como *Populus cathayana* (Xiao et al. 2008) e verificou-se no presente estudo para os dois genótipos. Os rebentos dos grupos de controlo dos dois genótipos apresentavam maior comprimento e folhas mais verdes, em relação aos rebentos dos grupos de stresse, que apresentavam menores dimensões, folhas e com um tom mais avermelhado.

Quando as plantas são sujeitas a stresse hídrico, os teores de clorofilas a e b tendem a diminuir (Talebi et al. 2013; Batoool et al. 2022), uma vez que, é induzida a síntese e acumulação de ROS que causam danos oxidativos nos cloroplastos das células vegetais e que degradam a clorofila (Xiao et al. 2008; Meher et al. 2018; Basal et al. 2020). Contudo, as análises bioquímicas do presente estudo não confirmaram esta ideia, dado que não ocorreram diferenças significativas a nível das concentrações de clorofila a e b entre tratamentos em ambos os genótipos, porém, é possível observar uma tendência para a diminuição das clorofilas no genótipo A4 em relação ao genótipo A5. Os carotenóides desempenham funções essenciais na fotossíntese e fotoproteção (Xiao et al., 2008) e a diminuição do seu conteúdo sob stresse hídrico sugere que o stresse oxidativo afeta também o conteúdo de carotenóides (Xiao et al. 2008; Batoool et al. 2022). No presente estudo, não se verificaram diferenças significativas no conteúdo de carotenóides, mas foi possível observar uma tendência para a diminuição no genótipo A4 em relação ao genótipo A5. Num estudo anterior, quando foi induzido stresse moderado, não se verificaram alterações nos teores de clorofila e de carotenóides, apenas quando induzido um stresse mais severo, o que pode indicar que as concentrações de PEG utilizadas no presente estudo não foram suficientes (Munné-Bosch & Peñuelas 2004). Os níveis basais (grupo de controlo) de clorofilas a e b e de carotenóides são maiores no genótipo A4 em relação ao genótipo A5, porém, sob stresse, o genótipo A4 sofreu diminuição dos teores de clorofilas e carotenóides, enquanto que o genótipo A5 no grupo de stresse mais intenso conseguiu manter os teores, podendo indicar que o genótipo A5 é mais tolerante ao stresse. Em relação às antocianinas, no presente estudo, não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos, porém, foi possível observar que os níveis basais (grupo controlo) de antocianinas eram superiores no genótipo A5 em relação ao genótipo A4, o que pode indicar uma predisposição do genótipo A5 para lidar com o stresse. As antocianinas desempenham um papel na resposta das plantas ao stresse hídrico ao atuar como antioxidantes e mediadoras em cascatas de sinalização induzidas por ROS (Naing & Kim 2021), sendo esperado um aumento no seu conteúdo, uma vez que a sua biossíntese é ativada em resposta a diversos stresses para proteger a planta contra os danos oxidativos (Cirillo et al. 2021; Yan et al. 2022).

No presente estudo, não se verificaram diferenças no conteúdo de fenóis e ortofenóis entre tratamentos, contudo, foi possível observar que os níveis basais destes metabolitos eram superiores no genótipo A5 em relação ao genótipo A4, o que pode indicar uma predisposição do genótipo A5 para lidar com o stresse. Os compostos fenólicos desempenham vários papéis importantes na resistência das plantas, agindo como antioxidantes e ao eliminar radicais livres. Estudos sugerem que sob condições de stresse, a biossíntese de compostos fenólicos aumenta como uma via potenciadora da capacidade antioxidante das células vegetais (Mechri et al. 2020; Farooq et al. 2021). Os flavonoides estão igualmente envolvidos na defesa do stresse das plantas, atuando como antioxidantes que ajudam a neutralizar o stresse oxidativo (Dias et al. 2021), sendo esperado um aumento na sua concentração quando a planta está sob stresse (Jan et al. 2022). No entanto, no presente estudo, verificou-se uma diminuição entre tratamentos nos dois genótipos estudados. No genótipo A4 a diferença verificou-se entre o grupo de controlo e o grupo de stresse com maior concentração de PEG, mas não com o grupo de stresse de menor concentração, enquanto que no genótipo A5 se verificou diferenças entre o controlo e os dois grupos de stresse. Estes resultados podem indicar que o genótipo A4 apresenta uma resposta diferente ao stresse em relação ao genótipo A5, dado que o genótipo A4 apresenta mais flavonoides e o genótipo A5 apresenta teores mais elevados de fenóis. A diminuição do teor de flavonoides face ao stresse hídrico já foi relatada em *Triticum aestivum* (Naz & Perveen 2021), e, inclusive, a diminuição dos teores de catequina em *Camellia sinensis* (Wang et al. 2016) e *Olea europaea* (Mechri et al. 2020). Num estudo com oliveiras, além da redução do teor de flavonoides, também foi observado uma diminuição dos danos oxidativos, o que pode indicar que a diminuição do conteúdo de flavonoides não seja resultado da sua degradação ou da inibição da sua biossíntese devido aos danos oxidativos (Dias et al. 2021).

No presente estudo, não se verificaram diferenças no conteúdo de prolina entre tratamentos nas plantas do genótipo A4. Em contraste, verificou-se um aumento dos níveis de prolina nas plantas do grupo de stresse induzido com a maior concentração de PEG no genótipo A5, o que pode significar que o genótipo é menos tolerante ao stresse em relação ao genótipo A4. A prolina é um metabolito que está ligado à capacidade de tolerância da planta, ao assegurar o turgor celular através de um ajuste osmótico e atuar como antioxidante na eliminação de ROS (Batoool et al. 2022) e o aumento da sua concentração é uma resposta das plantas face ao stresse hídrico bem conhecida (Cirillo et al. 2021). O grupo de tratamento com PEG 7,5% do genótipo A5 foi agrupado com os grupos controlo dos dois genótipos e os restantes tratamentos de stresse foram agrupados no mesmo *cluster*, o que pode indicar que o genótipo A5 é efetivamente mais

tolerante ao stresse hídrico face ao genótipo A4, dado que foi agrupado com o seu grupo de controlo e também com o controlo do genótipo A4.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Um dos principais problemas para analisar no futuro será reduzir o impacto do stress hídrico no desenvolvimento das culturas para garantir a sua produtividade, selecionando genótipos mais tolerantes vai permitir minimizar as perdas de produtividade nas culturas em larga escala. Futuramente, está prevista a identificação, através de HPLC-PDA-ESI/MSⁿ, dos compostos fenólicos que demonstraram ter relevância entre tratamentos nos genótipos A1 e A4, dado que podem ser potenciais marcadores de seleção para selecionar genótipos tolerantes a stress hídrico. Além disso, a sua identificação vai permitir identificar as vias metabólicas envolvidas, o que nos vai dar informação concreta sobre os mecanismos de resposta do medronheiro. As análises metabolómicas neste estudo demonstraram que embora a concentração de compostos fenólicos aumente nas plantas do campo, talvez como resposta a diversos estímulos, a concentração de arbutina é superior nas plantas da estufa, sendo de maior interesse para extrair arbutina com melhores rendimentos a partir de plantas mais jovens e a crescer em estufa, num ambiente controlado.

No presente estudo, o ensaio de *priming* serviu para estabelecer as bases para estudos de stress hídrico com recurso ao PEG, com o objetivo de associar o *priming* à micropropagação de medronheiro com vista ao seu melhoramento vegetal. Com a realização deste ensaio concluiu-se que embora se tenham verificado alterações morfológicas evidentes, não se verificaram alterações nos parâmetros bioquímicos quantificados. Contudo, esta observação não significa, necessariamente, que o *priming* não foi eficaz, pois é preciso ter em consideração que as análises bioquímicas realizadas são muito gerais e as técnicas utilizadas apresentam muitas limitações técnicas. Além disso, resultados semelhantes têm sido obtidos pelo nosso grupo mesmo em plantas com altos níveis de stress. Outros fatores que podem ter influenciado os resultados obtidos são o erro humano e o número reduzido de amostras utilizado no ensaio, tendo em conta que mesmo plantas micropropagadas *in vitro* apresentam comportamentos distintos. Futuramente, será necessário ajustar e otimizar as condições de ensaio, bem como avaliar a capacidade de enraizamento, aclimatização e desenvolvimento das plantas, uma vez que pode ser influenciada, de forma positiva ou negativa, pelo *priming*. Numa fase posterior, é importante voltar a induzir o stress nas plantas e proceder a estudos fisiológicos para medir parâmetros de produtividade, de forma a determinar a ocorrência de *priming* no medronheiro.

6. Referências bibliográficas

- Achakzai AKK, Achakzai P, Masood A, Kayani SA, Tareen RB (2009) Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. Pak J Bot 41:2129–2135.
- Akinci Ş, Lösel DM (2012) Plant water-stress response mechanisms. In: Rahman IMM, Hasegawa H (eds) Water stress. IntechOpen, Rijeka, Croatia, pp 15–42.
- Albergaria ET, Oliveira AFM, Albuquerque UP (2020) The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. South African Journal of Botany 131:12–17. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.002>.
- Anastácio JR (2014) Contributo para o estudo do medronheiro (*Arbutus unedo* L.): caracterização morfológica de clones e fisiologia pós-colheita do fruto. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Anderson WC (1980) Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. Symposium on Breeding and Machine Harvesting of *Rubus* 112 13–20. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1980.112.1>.
- Araújo, P.V., Carapeto, A., Porto, M., Clamote, F., Pereira, A.J., Holyoak, D.T., Almeida, J.D., Lourenço, J., et al. (2022). *Arbutus unedo* L. - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.floraon.pt/#wArbutus+unedo>. Consulta realizada em 22/07/2022.
- Arbona V, Manzi M, de Ollas C, Gómez-Cadenas A (2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. Int J Mol Sci 14:4885–4911. <https://doi.org/10.3390/IJMS14034885>.
- Attard E (2013) A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. Central European Journal of Biology 8:48–53. <https://doi.org/10.2478/S11535-012-0107-3>.
- Avramova Z (2019) Defence-related priming and responses to recurring drought: two manifestations of plant transcriptional memory mediated by the ABA and JA signalling pathways. Plant, Cell & Environment 42:983–997. <https://doi.org/10.1111/PCE.13458>.
- Barros L, Carvalho AM, Morais JS, Ferreira ICFR (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. Food Chemistry 120:247–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.016>.
- Basal O, Szabó A, Veres S (2020) Physiology of soybean as affected by PEG-induced drought stress. Current Plant Biology 22:100135. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2020.100135>.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39:205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
- Batool M, El-Badri AM, Wang Z, Mohamed IAA, Yang H, Ai X, Salah A, Hassan MU, Sami R, Kuai J, Wang B, Zhou G (2022) Rapeseed morpho-physio-biochemical responses to drought stress induced by PEG-6000. Agronomy 12:579. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12030579>.
- Borges E (2014) Fungos endofíticos de *Arbutus unedo* L.: diversidade, propriedades antimicrobianas e composição volátil. Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.

- Canhoto JM (2010) Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press.
- Celikel G, Demirsoy L, Demirsoy H (2008) The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae* 118:115–119. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.028>.
- Cirillo V, D'amelia V, Esposito M, Amitrano C, Carillo P, Carputo D, Maggio A, Moya A (2021) Anthocyanins are key regulators of drought stress tolerance in tobacco. *Biology* 10:139. <https://doi.org/10.3390/biology10020139>.
- Close DC, Beadle CL, Battaglia M (2004) Foliar anthocyanin accumulation may be a useful indicator of hardiness in eucalypt seedlings. *Forest Ecology and Management* 198:169–181. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2004.03.039>.
- Correia AV, Oliveira AC (2002) Principais espécies florestais com interesse para Portugal: zonas de influência mediterrânica. Direção-Geral das Florestas. Estudos e Informação, Lisboa.
- Cui T, Nakamura K, Ma L, Li JZ, Kayahara H (2005) Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in Oriental pear. *J Agric Food Chem* 53:3882–3887. <https://doi.org/10.1021/JF047878K>.
- Dias MC, Pinto D, Figueiredo C, Santos C, Silva A (2021) Phenolic and lipophilic metabolite adjustments in *Olea europaea* (olive) trees during drought stress and recovery. *Phytochemistry* 185:112695. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2021.112695>.
- Dias VLA (2014) Estruturas secretoras em Medronheiro (*Arbutus unedo* L.): caracterização morfológica, estrutural e histoquímica e avaliação da atividade proteásica da secreção. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Dinis DFP (2015) Medronheiro e fungos micorrízicos: parceria para o futuro. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Farooq M, Ahmad R, Shahzad M, Sajjad Y, Hassan A, Shah MM, Naz S, Khan SA (2021) Differential variations in total flavonoid content and antioxidant enzymes activities in pea under different salt and drought stresses. *Scientia Horticulturae* 287:110258. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110258>.
- George S, Jatoi A, Siddiqui SU (2013) Genotypic differences against PEG simulated drought stress in tomato. *Pak J Bot* 45:1551–1556.
- Godinho-Ferreira P, Azevedo A, Rego F (2005) Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana* 13:1–34.
- Gomes F, Simões M, Lopes ML, Canhoto JM (2010) Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnology* 27:882–892. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2010.02.009>.
- Gomes MFFN (2011) Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry Tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Guo X, Xin Z, Yang T, Ma X, Zhang Y, Wang Z, Ren Y, Lin T (2020) Metabolomics response for drought stress tolerance in chinese wheat genotypes (*Triticum aestivum*). *Plants* 9:520. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9040520>.

- Hileman LC, Vasey MC, Parker VT (2001) Phylogeny and biogeography of the Arbutioideae (Ericaceae): Implications for the Madrean-Tethyan hypothesis. *Systematic Botany* 26:131–143. <https://doi.org/10.1043/0363-6445-26.1.131>.
- Jan R, Khan MA, Asaf S, Lubna, Waqas M, Park JR, Asif S, Kim N, Lee IJ, Kim KM (2022) Drought and UV radiation stress tolerance in rice is improved by overaccumulation of non-enzymatic antioxidant flavonoids. *Antioxidants* 11:917. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11050917>.
- Jurica K, Karačonji IB, Šegan S, Opsenica DM, Kremer D (2015) Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 66:197–202. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2696>.
- Konstantinidis P, Tsiourlis G, Xofis P (2006) Effect of fire season, aspect and pre-fire plant size on the growth of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) resprouts. *Forest Ecology and Management* 225:359–367. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.01.011>.
- Lagarto, V., Gomes, F., Franco, J., Oliveira, F. (2013) Estudo de mercado sobre as potencialidades do medronho na região centro. *Agrotec – revista técnica científica agrícola* 6: 78-81.
- Lascano HR., Antonicelli GE, Luna CM, Melchiorre MN, Gómez LD, Racca RW, Trippi VS, Casano LM (2001) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Functional Plant Biology* 28:1095–1102. <https://doi.org/10.1071/PP01061>.
- Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H (2020) The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 148:80–89. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006>.
- Lima MDSF (2017) Desenvolvimento de uma formulação cosmética contendo ativos naturais para o tratamento de melasma. Dissertação de bacharelato, Centro Universitário de Maringá, Maringá.
- Lisar SYS, Motafakkerzad R, Hossain MM, Rahman IMM (2012) Water stress in plants: causes, effects and responses. *Water Stress* 25:1–15. <https://doi.org/10.5772/39363>.
- Liu H, Bruce DR, Sissons M, et al (2018) Genotype-dependent changes in the phenolic content of durum under water-deficit stress. *Cereal Chemistry* 95:59–78. <https://doi.org/10.1002/CCHE.10007>.
- López-Dóriga IL (2018) The archaeobotany and ethnobotany of portuguese or white crowberry (*Corema album*). *Ethnobiology Letters* 9:19–32. <https://doi.org/10.14237/EBL.9.2.2018.1069>.
- Maestro Durán R, Borja Padilla R, Martín Martín A, Fiestas Ros de Ursinos JÁ, Alba Mendoza J (1991) Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Grasas y Aceites* 42:271–276. <https://doi.org/10.3989/gya.1991.v42.i4.1232>.
- Martins J (2012) Estudos de cultura in vitro em medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Martins J, Correia S, Correia B, Pinto G, Canhoto J (2019) Shoot proliferation and organogenesis on *Arbutus unedo*: physiological analysis under water stress. *Biol Plant* 63:278–286. <https://doi.org/10.32615/bp.2019.032>.

- Martins J, Monteiro P, Pinto G, Canhoto J (2021a) Hybridization assays in strawberry tree toward the identification of plants displaying increased drought tolerance. *Forests* 12:148. <https://doi.org/10.3390/f12020148>.
- Martins J, Pinto G, Canhoto J (2021b) Biotechnology of the multipurpose tree species *Arbutus unedo*: a review. *Journal of Forestry Research* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01369-x>.
- Martins J, Batista T, Pinto G, Canhoto J (2021c) Seasonal variation of phenolic compounds in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves and inhibitory potential on *Phytophthora cinnamomi*. *Trees* 35:1571–1586. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02137-4>.
- Mechri B, Tekaya M, Hammami M, Chehab H (2020) Effects of drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown olive trees (*Olea europaea*). *Biochemical Systematics and Ecology* 92:104112. <https://doi.org/10.1016/J.BSE.2020.104112>.
- Meher, Shivakrishna P, Ashok Reddy K, Manohar Rao D (2018) Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25:285–289. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2017.04.008>.
- Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M (2011) Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and chemical toxicology* 49:2285–2291. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.06.028>.
- Mereti M, Grigoriadou K, Nanos GD (2002) Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia Horticulturae* 93:143–148. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00330-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00330-2).
- Mibei EK, Ambuko J, Giovannoni JJ, Onyango AN, Owino WO (2017) Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. *Food Sci Nutr* 5:113–122. <https://doi.org/10.1002/FSN3.370>.
- Molina M, Pardo-De-Santayana M, Aceituno L, et al (2011) Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two spanish forests. *Forestry* 84:419–429. <https://doi.org/10.1093/FORESTRY/CPR031>.
- Munné-Bosch S, Peñuelas J (2004) Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in mediterranean field conditions. *Plant Science* 166:1105–1110. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2003.12.034>.
- Naing AH, Kim CK (2021) Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* 172:1711–1723. <https://doi.org/10.1111/PPL.13373>.
- Naz S, Perveen S (2021) Response of wheat (*Triticum aestivum* L. var. Galaxy-2013) to pre-sowing seed treatment with thiourea under drought stress. *Pakistan Journal of Botany* 53:1209–1217. [https://doi.org/10.30848/PJB2021-4\(20\)](https://doi.org/10.30848/PJB2021-4(20)).
- Noronha JPDCD (2001) Metabolitos secundários do fruto de *Arbutus unedo* L. (medronho). Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa.
- Novais MH, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C (2004) Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 93:183–195. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.015>.

- Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA (2011) *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research* 50:73–85.
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran LSP (2014) Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* 5:86. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00086/BIBTEX>.
- Pang Z, Zhou G, Ewald J, et al (2022) Using MetaboAnalyst 5.0 Part IV: analyzing metabolomics data with complex metadata. <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1921/v1>.
- Pedro JG (1994) Portugal Atlas do Ambiente. Notícia Explicativa II.6. Carta da distribuição de figueira e medronheiro. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, Lisboa, pp 1-39.
- Pereira RAG (2014) Efeito do pH e da fonte de azoto na cultura in vitro de medronheiro (*Arbutus unedo* L.). Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Rasmont P, Regali A, Ings TC, Lognay G, Baudart E, Marlier M, Delcarte E, Viville P, Marot C, Falmagne P, Verhaeghe JC, Chittka L (2005) Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 98:656–663. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.656>.
- Ribeiro CML (2016) Definição da identidade da marca para o medronho. Dissertação de Mestrado, Universidade de Évora, Évora.
- Rivas-Ubach A, Sardans J, Pérez-Trujillo M, et al (2012) Strong relationship between elemental stoichiometry and metabolome in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:4181–4186. https://doi.org/10.1073/PNAS.1116092109/SUPPL_FILE/ST06.DOCX.
- Salehi-Lisar SY, Bakhshayeshan-Agdam H (2016) Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry* 1:1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4_1/COVER.
- Sánchez-Rodríguez E, Moreno DA, Ferreres F, del Mar Rubio-Wilhelmi M, Ruiz JM (2011) Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry* 72:723–729. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.011>.
- Santos RF, Carlesso R (1998) Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 2:287–294. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/AGRIAMBI.V2N3P287-294>.
- Sims DA, Gamon JA (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81:337–354. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00010-X).
- Sousa LDD (2015) Ensaios de biotransformação e cultura in vitro aplicados à valorização do medronheiro (*Arbutus unedo* L.). Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Steen JS, Asplund J, Lie MH, Nybakken L (2021) Environment rather than provenance explains levels of foliar phenolics in European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings. *Trees* 35:1555–1569. <https://doi.org/10.1007/S00468-021-02136-5/FIGURES/5>.
- Sulusoglu M, Cavusoglu A, Erkal S (2011) *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) selection in Turkey Samanlı Mountain locations. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:3545–3551. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000263>.

- Talebi R, Ensafi M, Baghebani N, Karami E, Mohammadi K (2013) Physiological responses of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to drought stress. *Environmental and Experimental Biology* 11:9–15.
- Torres JA, Valle F, Pinto C, García-Fuentes A, Salazar C, Cano E (2002) *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology* 160:207–223. <https://doi.org/10.1023/A:1015864821706>.
- Turgut-Kara N, Arikan B, Celik H (2020) Epigenetic memory and priming in plants. *Genetica* 148:47–54. <https://doi.org/10.1007/S10709-020-00093-4>.
- Vasques A, Chirino E, Vilagrosa A, Vallejo VR, Keizer JJ (2013) The role of seed provenance in the early development of *Arbutus unedo* seedlings under contrasting watering conditions. *Environmental and Experimental Botany* 96:11–19. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2013.08.004>.
- Wang W, Xin H, Wang M, Ma Q, Wang L, Kaleri NA, Wang Y, Li X (2016) Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality. *Frontiers in Plant Science* 7:385. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00385>.
- Wan-Nadilah WA, Akhtar MT, Shaari K, Khatib A, Hamid AA, Hamid M (2019) Variation in the metabolites and α -glucosidase inhibitory activity of *Cosmos caudatus* at different growth stages. *BMC Complement Altern Med* 19:1–15. <https://doi.org/10.1186/S12906-019-2655-9/FIGURES/6>.
- Xiao X, Xu X, Yang F (2008) Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica* 42:705–719. <https://doi.org/10.14214/SF.224>.
- Yan W, Li J, Lin X, Wang L, Yang X, Xia X, Zhang Y, Yang S, Li H, Deng X, Ke Q (2022) Changes in plant anthocyanin levels in response to abiotic stresses: a meta-analysis. *Plant Biotechnology Reports* 1:1–12. <https://doi.org/10.1007/S11816-022-00777-7>.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64:555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).