

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Análise metabolômica não direcionada de polpa de morango cv. Camarosa
cultivado sob condições de déficit hídrico e excesso salino**

Ana Clara Nascimento Antunes

Pelotas, 2019

Ana Clara Nascimento Antunes

**Análise metabolômica não direcionada de polpa de morango cv. Camarosa
cultivado sob condições de déficit hídrico e excesso salino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel' da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves
Dr^a. Tanize dos Santos Acunha

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111a Antunes, Ana Clara Nascimento

Análise metabolômica não direcionada de polpa de morango cv. Camarosa cultivado sob condições de déficit hídrico e excesso salino / Ana Clara Nascimento Antunes ; Fábio Clasen Chaves, orientador ; Tanize dos Santos Acunha, coorientador. — Pelotas, 2019.

80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Fragaria x ananassa*. 2. Seca. 3. Salinidade. 4. Metaboloma. 5. Espectrometria de massas. I. Chaves, Fábio Clasen, orient. II. Acunha, Tanize dos Santos, coorient. III. Título.

CDD : 664

Ana Clara Nascimento Antunes

**Análise metabolômica não direcionada de polpa de morango cv. Camarosa
cultivado sob condições de déficit hídrico e excesso salino**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/03/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi. Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Superieure Agronomique de Toulouse.

Prof^a. Dr^a. Vanessa Galli. Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Jéssica Fernanda Hoffmann. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Marcia Vizzotto. Doutora em Horticulture Science pela Texas A&M University.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de execução desse trabalho de dissertação.

À CAPES pela bolsa concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Em especial ao meu orientador Fábio Clasen Chaves pelos ensinamentos e paciência durante esses anos de convívio.

As colegas de laboratório Camila, Marjana e Isis. Em especial a Rosane, Giovana, Bianca, Paula e Jéssica pela troca de experiências e convivência diária.

Ao estagiário João Pedro Blank, pelo auxílio durante as análises.

A pós-doutoranda Tanize Acunha, pelos ensinamentos e troca de experiências durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos de colégio, faculdade e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Richard, pela paciência, incentivo e companhia durante o período de faculdade e mestrado.

À minha família, especialmente aos meus pais Viviane e Luis Eduardo e meu irmão Pedro, pela parceria, compreensão, amor e incentivo. Sem eles nada disso seria possível. MUITO OBRIGADA!

Resumo

ANTUNES, Ana Clara Nascimento. **Análise metabolômica não direcionada de polpa de morango cv. Camarosa cultivado sob condições de déficit hídrico e excesso salino**. 2019. 80f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Para suportar condições ambientais desfavoráveis as plantas comumente ativam mecanismos de defesa induzindo o acúmulo e/ou redução de compostos do metabolismo geral e especializado que podem ser identificados através da análise metabolômica não direcionada. Com isso, objetivou-se avaliar morangos da cultivar Camarosa cultivados em condições de déficit hídrico 95% da evapotranspiração da cultura-ETc (DH1), déficit hídrico 85% ETc (DH2), excesso salino 80 mM NaCl (ES) e grupo controle/irrigação normal (C) correspondendo a 100% ETc através da análise metabolômica não direcionada por cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC) acopladas a espectrometria (MS) as alterações ocorridas nos metabolismos geral e especializado das frutas. Para a diferenciação dos efeitos dos tratamentos em relação ao grupo controle foi utilizada análise estatística univariada. A análise por LC-MS/MS no modo de ionização negativo revelou que morangos submetidos ao tratamento DH1 apresentaram um aumento de 31% de metilsiringina e as frutas submetidas ao tratamento DH2 apresentaram um aumento de 51% do ácido 3-deoxi-D-manno-octulosônico e diminuição de 38% do β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose e de 36% de ácido trans-cinâmico em relação ao grupo controle, enquanto que morangos do tratamento ES não diferiram de morangos do grupo controle. Por outro lado, a análise por LC-MS/MS no modo de ionização positivo demonstrou que morangos submetidos ao ES apresentaram um aumento de 39% de fosfocolina e 25% de L-triptofano, entretanto neste modo de ionização não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e os tratamentos DH1 e DH2. A análise por GC-MS demonstrou que morangos submetidos ao tratamento DH1 apresentaram redução de 34% do 29-metilisofucosterol, enquanto que morangos DH2 apresentaram um aumento em 73% de frutose, 44% de 2,4-dimetilbenzaldeído e 46% de 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione comparados aos do grupo controle. As frutas submetidas aos tratamentos DH2 e ES apresentaram uma diminuição de γ -sitosterol (46% e 49%) e 29-metilisofucosterol (52% e 53%), assim como um aumento de 22 e 71% de hidrocarbonetos (C20-C40) comparados ao grupo controle, respectivamente. Com isso, a estratégia de análise metabolômica não direcionada permitiu identificar alterações significativas de metabólitos do metabolismo geral e especializado que foram responsáveis pela diferenciação dos tratamentos DH1, DH2 e ES frente ao controle.

Palavras-chave: *Fragaria* x *ananassa*; seca; salinidade; metaboloma; cromatografia líquida; cromatografia gasosa; espectrometria de massas.

Abstract

ANTUNES, Ana Clara Nascimento. **Untargeted metabolomic analysis of flesh fruit of strawberry cv. Camarosa grown under water deficit and salt stress.** 2019. 80f. Dissertation (Master Degree in Food Science and Technology) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

To cope with unfavorable environmental conditions, plants commonly activate defense mechanisms inducing the accumulation and/or reduction of general and specialized metabolites that can be identified using untargeted metabolomic analysis. The objective of this study was to evaluate strawberries (cv. Camarosa) grown under two water deficit conditions 95% of crop evapotranspiration-ET_c (DH1) and 85% ET_c (DH2), salt stress 80 mM NaCl (ES) and control group corresponding to 100% ET_c (C) by untargeted metabolomic analysis by liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) changes to general and specialized metabolisms of fruits. Univariate statistical analysis was applied to compare these treatments to control group. LC-MS/MS analysis in negative ionization mode revealed that strawberries submitted to DH1 treatment showed a 31% increase in methylsyringin and fruits submitted to DH2 treatment showed a 51% increase in 3-deoxy-D-manno-octulosonate and 38% and 36% decrease in β -D-glucuronopyranosyl-(1->3)- α -D-galacturonopyranosyl-(1->2)-L-rhamnose and trans-cinnamic acid compared to control group, respectively, while for ES treatment no significant differences were observed compared to control group. On the other hand, LC-MS/MS analysis in positive ionization mode revealed that strawberries submitted to ES showed a 39% increase in phosphocholine and 25% in L-tryptophan, however in this ionization mode no significant differences were observed between control group and DH1 and DH2 treatments. GC-MS analysis revealed that strawberries submitted to DH1 treatment showed a 39% decrease in 29-methylisofucosterol, while DH2 strawberries showed a 73% increase in fructose, 44% in 2,4-dimethylbenzaldehyde and 46% in 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione compared to control group. Fruits submitted to DH2 and ES treatments showed a decrease in γ -sitosterol (46% and 49%) and 29-methylisofucosterol (52% and 53%), as well as a 22% and 71% increase in hydrocarbons (C₂₀-C₄₀) compared to control group, respectively. Thus, the strategy of untargeted metabolomic analysis allowed the identification of significant metabolic alterations in general and specialized metabolism that were responsible for the differentiation of treatments DH1, DH2 and ES against the control group.

Keywords: *Fragaria x ananassa*; water deficit; salinity; metabolome; liquid chromatography; gas chromatography; mass spectrometry.

Lista de Figuras

Figura 1	Estruturas botânicas que compõem a fruta do morangueiro.....	20
Figura 2	Fases de adaptação das plantas em situações de estresse (homeostase, alarme, resistência (aclimatação e manutenção), exaustão e regeneração).....	24
Figura 3	Cromatograma de íons extraídos (EICs) de metabólitos detectados em extratos de morango cv. Camarosa do grupo controle por LC-MS/MS no modo de ionização negativo (A) e positivo (B).....	38
Figura 4	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	39
Figura 5	Espectro de MS/MS do composto m/z 1.025,3406 presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH1 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.....	39
Figura 6	Espectro de MS/MS da metilsiringina presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH1 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.....	40
Figura 7	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização positivo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	40

Figura 8	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	41
Figura 9	Espectro de MS/MS do ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.....	42
Figura 10	Espectro de MS/MS do β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.....	42
Figura 11	Espectro de MS/MS do ácido trans-cinâmico presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.....	43
Figura 12	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização positivo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	43
Figura 13	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	44

Figura 14	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização positivo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	45
Figura 15	Espectro de MS/MS do L-triptofano presente em morangos cv. Camarosa no tratamento ES analisado por LC-MS/MS no modo de ionização positivo.....	45
Figura 16	Cromatograma do íons totais (TIC) da análise metabolômica não direcionada de morango cv. Camarosa por GC-MS na fração semi-polar A (A) e fração semi-polar B (B).....	49
Figura 17	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar A. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	50
Figura 18	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar B. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	51
Figura 19	Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do 29-metilisofucosterol presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH1 analisado por GC-MS na fração semi-polar B..	51
Figura 20	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar A. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	52

Figura 21	Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) da D-(-)-frutofuranose presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar A..	53
Figura 22	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar B. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	53
Figura 23	Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do 2,4-dimetilbenzaldeído presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B..	54
Figura 24	Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B.....	54
Figura 25	Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) de hidrocarbonetos presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B..	55
Figura 26	Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do γ -sitosterol presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B.....	55
Figura 27	Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar A. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....	56

Figura 28 Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar B. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.....

Lista de tabelas

Tabela 1	Metabólitos detectados por LC-MS/MS que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos.....	47
Tabela 2	Identificação tentativa dos metabólitos que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos na análise metabolômica não direcionada por LC-MS/MS.....	48
Tabela 3	Metabólitos detectados por GC-MS que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos.....	58
Tabela 4	Identificação tentativa dos metabólitos que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos na análise metabolômica não direcionada por GC-MS.....	59

Sumário

1 Introdução	16
2 Objetivo.....	19
3 Hipótese.....	19
4 Revisão Bibliográfica	20
4.1 Morango.....	20
4.2 Estresses abióticos	22
4.2.1 Déficit hídrico e excesso salino.....	24
4.3 Metabolômica	25
4.3.1 Obtenção da matéria-prima.....	27
4.3.2 Extração dos metabólitos	27
4.3.3 Plataformas analíticas	27
4.3.3.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectromeria de massas	27
4.3.3.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	29
4.3.4 Processamento e análise estatística de dados	30
4.3.5 Identificação dos metabólitos.....	32
5 Material e métodos	32
5.1 Material Vegetal.....	32
5.2 Análise metabolômica não direcionada por LC-MS/MS	33
5.2.1 Preparo dos extratos	33
5.2.2 Parâmetros e condições de análise	33
5.3 Análise metabolômica não direcionada por GC-MS	34
5.3.1 Preparo dos extratos	34
5.3.2 Parâmetros e condições de análise	35
5.4 Tratamento dos dados.....	36

5.4.1 LC-MS/MS	36
5.4.2 GC-MS	37
6 Resultados.....	37
6.1 Análise metabolômica não direcionada por LC-MS/MS	37
6.2 Análise metabolômica não direcionada por GC-MS	49
7 Discussão.....	60
7.1.1 Alterações ocorridas em morangos cv. Camarosa submetidos ao déficit hídrico 95% ETc (DH1) analisados por metabolômica não direcionada	60
7.1.2 Alterações ocorridas em morangos cv. Camarosa submetidos ao déficit hídrico 85% ETc (DH2) analisados por metabolômica não direcionada	61
7.1.3 Alterações ocorridas em morangos cv. Camarosa submetidos ao excesso salino 80 mM NaCl (ES) analisados por metabolômica não direcionada.....	63
8 Conclusão.....	66
Referências.....	67

1 Introdução

As plantas produzem uma diversidade de metabólitos com estruturas distintas e em concentrações variadas que são fundamentais para seu crescimento, desenvolvimento e interações com o meio ambiente (HONG et al., 2016). Em condições ambientais adversas as plantas ativam mecanismos de defesa para restabelecer a homeostase celular e minimizar potenciais danos ao seu metabolismo (ATKINSON; URWIN, 2012; BUCHANAN et al., 2015). Fatores bióticos e abióticos são as principais causas que levam a perdas de produção na agricultura (WANG; FREI, 2011). Sob condições extremas de seca e salinidade, as plantas modificam a expressão de genes, afetando aspectos fisiológicos reduzindo a produtividade (ARBONA et al., 2013; GALLI et al., 2018). No entanto, o emprego de estresses moderados tem sido proposto como uma estratégia de biofortificação a fim de acumular metabólitos para suportar a condição estressora sem reduzir a produtividade (GALLI et al., 2016; PERIN et al., 2019).

O morango é um pseudofruto habitualmente tratado por fruta que possui abrangência e relevância mundial. No Brasil sua produção média anual é de 150 mil toneladas e concentra-se nas regiões de clima subtropical e temperado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (FAGHERAZZI et al., 2017). Existem cerca de 600 cultivares de morango, que diferem quanto a cor, sabor, tamanho, textura e composição química entre outros aspectos. Dentre os compostos de maior abundância nesse pseudofruto se destacam a vitamina C e os compostos derivados dos fenilpropanóides, como ácidos fenólicos e flavonóides (PADULA et al., 2013).

O morango é considerado um pseudofruto modelo para estudos que avaliam efeitos de fatores como constituição genética, estágio de maturação (D'URSO et al., 2015; DAI et al., 2013; KÅRLUND et al., 2016; MOING et al., 2001; ZHANG et al., 2011), cultivo sob condições de déficit hídrico (GHADERI; SIOSEMARDEH, 2011; GINÉ-BORDONABA; TERRY, 2016; KLAMKOWSKI; TREDER, 2008; PERIN et al., 2019) e excesso salino (AL-SHORAFI et al., 2014; GALLI et al., 2016; KEUTGEN; PAWELZIK, 2007; PERIN et al., 2019; TURHAN; ERIS, 2009) nas alterações metabólicas que influenciam a qualidade das frutas.

A composição de metabólitos gerais e especializados das plantas se altera em função das condições ambientais (CHAVES et al., 2009; MIRÁS-AVALOS; INTRIGLILO, 2017). Entende-se por metabolismo geral as transformações comuns a todas as plantas, que contribuem para o desenvolvimento e manutenção do seu ciclo de vida e incluem o metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). O metabolismo especializado é de ocorrência limitada a indivíduos, espécies ou grupo de espécies. Esses metabólitos conferem à planta vantagem competitiva na sua interação com o meio ambiente. Compostos do metabolismo especializado incluem as classes dos terpenóides, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, alcalóides e compostos fenólicos (BUCHANAN et al., 2015; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Por meio da análise metabolômica é possível identificar e quantificar os compostos presentes em um organismo de forma a obter informações sobre as alterações e o acúmulo de metabólitos que foram induzidos por uma resposta fisiológica ou fenotípica (ARBONA et al., 2013). Estudos que buscaram identificar alterações metabólicas em plantas submetidas a condições ambientais adversas utilizaram estratégias de análise direcionada de compostos marcadores (CORRALES et al., 2017; ROCHA et al., 2010) ou análises não direcionadas (HU et al., 2014; KALING et al., 2015; URANO et al., 2009) a fim de explorar o maior número de metabólitos que possam ser alterados.

A estratégia de análise metabolômica não direcionada objetiva a avaliação simultânea da maioria dos compostos de baixo peso molecular (normalmente < 1500 Da) presentes na planta em determinado momento (CASTRO-PUYANA; HERRERO, 2013; HU; XU, 2013). Devido a grande complexidade de qualquer metaboloma, normalmente constituído de um grande número de compostos em concentrações variadas e com propriedades físico-químicas muito distintas, em metabolômica, geralmente, se associa o uso de técnicas analíticas cromatográficas com a espectrometria de massas (MS) que apresenta sensibilidade, especificidade e alta resolução na determinação qualitativa e quantitativa desses metabólitos (AUH; LEE, 2013; HU; XU, 2013).

Condições de excesso ou falta de água e excesso ou falta de sais alteram o metabolismo de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos fenólicos (GINÉ-BORDONABA; TERRY, 2016; KEUTGEN; PAWELZIK, 2008b, 2008a; WEBER et al., 2017). Apesar do que já se conhece sobre as respostas do morango

às condições de estresses abióticos, há uma diversidade de metabólitos que potencialmente podem estar envolvidos na regulação das respostas a condições estressoras que podem ser revelados por análise metabolômica não-direcionada (KALING et al., 2015).

2 Objetivo

Avaliar as alterações ocorridas no metabolismo geral e especializado de morango cv. Camarosa, submetidos a condições de déficit hídrico e excesso salino, através da análise metabolômica não direcionada.

3 Hipótese

A utilização da análise metabolômica não direcionada possibilita a identificação e diferenciação de compostos que são alterados por déficit hídrico e excesso salino em morangos da cv. Camarosa.

4 Revisão Bibliográfica

4.1 Morango

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchene) é um híbrido octaplóide que originou-se na Europa pelo cruzamento entre as espécies selvagens *F. chiloenses* e *F. virginiana*. Pertencente à família Rosaceae e subfamília Rosoideae, é uma angiosperma dicotiledônia. Considerado um pseudofruto não climatérico, cuja “fruta”, o aquênio, é resultante da fecundação dos óvulos que estimulam o crescimento do receptáculo floral (Figura 1) (VIGNOLO et al., 2016; HUSAINI; ZAKI, 2016).

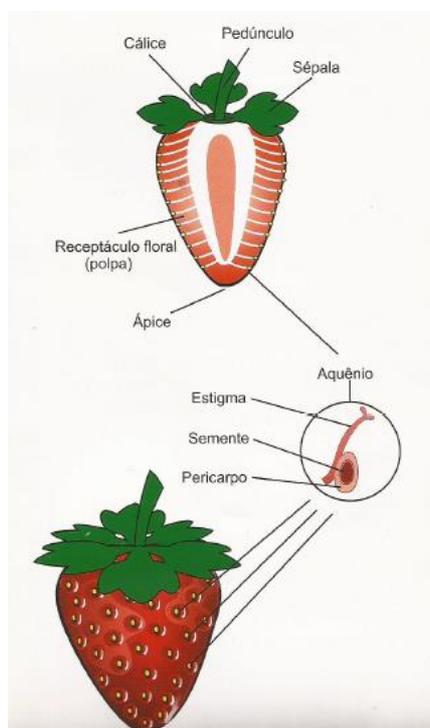


Figura 1 - Estruturas botânicas que compõem a fruta do morangueiro.

Fonte: ESALQ, 2018.

O morango é considerado uma importante fonte de renda para os produtores, sendo apreciado em todo mundo. Os Estados Unidos, líder de produção, seguido de México, Turquia e Espanha, em 2017 ultrapassou 1 milhão de toneladas, segundo dados oficiais (FAOSTAT, 2017). O Brasil não está entre os maiores produtores mundiais; no entanto, a produção tem aumentado devido aos programas de melhoramento e as novas técnicas de manejo. Os estados de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo são os principais produtores

(MADAIL et al., 2016).

O clima exerce papel fundamental no comportamento fisiológico do morangueiro. Temperaturas mais baixas são fundamentais para que o acúmulo de horas de frio induzam a floração, contribuindo para o desenvolvimento vegetativo, a produção e a qualidade da fruta. O crescimento e desenvolvimento do morangueiro também são afetados pelo fotoperíodo, que consiste na sensibilidade da planta à luminosidade. Cultivares de dias curtos iniciam a floração quando o período de luminosidade é menor do que 14 horas, enquanto que a floração em cultivares de dias neutros é independente do período de luminosidade, ocorrendo durante o período de produção (DARNELL, 2003; WREGGE et al., 2007).

As principais cultivares produzidas na região Sul do Brasil são Camarosa, Aromas e Albion (oriundas da Universidade da Califórnia, Davis), foram adaptadas facilmente ao clima brasileiro durante o outono/inverno e primavera/verão e juntas representam mais da metade das áreas cultivadas (OLIVEIRA; ANTUNES, 2016).

Lançada em 1994 (VOTH et al., 1994), a cultivar Camarosa é uma das mais importantes cultivares de dias curtos produzidas no Brasil e na região de Pelotas-RS é a mais cultivada em sistema de produção em campo aberto (ANTUNES; PERES, 2013). A cultivar Camarosa tem ciclo precoce com alta capacidade de produção, forma uma planta vigorosa com folhas grandes de coloração verde-escura, produz frutos grandes quando comparada a outras cultivares de dias curtos, e apresenta epiderme com coloração vermelho-brilhante e sabor sub-ácido. Os frutos tem aptidão tanto para o consumo *in natura* como para o processamento (OLIVEIRA; ANTUNES, 2016). Nos últimos anos tem-se observado uma transição nos sistemas de produção de morangos, que tradicionalmente são cultivados no solo, para os sistemas fora de solo que dependem do fornecimento de soluções nutritivas para sua produção (AKHATOU; RECAMALES, 2014; FAGHERAZZI et al., 2017; RECAMALES et al., 2007).

O morango tem sido utilizado como modelo para diversos estudos, inclusive para avaliar o efeito do cultivo sob condições de estresses abióticos. Severo et al. (2017) avaliaram o efeito da radiação UV-C na pré-colheita de morangos e observaram o aumento de antocianinas em relação aos morangos controle. Gulen; Eris (2003) avaliaram as mudanças fisiológicas da cultivar 'Camarosa' exposta a altas temperaturas, já Kesici et al. (2018) aplicaram altas temperaturas para compreender o desempenho agrônômico de 15 cultivares de morango. Blanke;

Cooke (2004) estudaram o efeito da seca e do encharcamento na atividade dos estômatos, transpiração e fotossíntese de estolões e folhas de morangueiro. Keutgen; Pawelzik (2008a) observaram que morangos submetidos a 40 e 80 mM L⁻¹ de NaCl (cloreto de sódio) apresentaram teores de compostos fenólicos e antocianinas totais duas vezes maior do que o controle, já Galli et al. (2016) observaram maior teor de antocianinas totais e compostos fenólicos totais nas plantas submetidas a 40 e 80 mM L⁻¹ de NaCl, respectivamente. Gine-Bordonaba; Terry (2010) ao estudarem o efeito do déficit hídrico na qualidade e sabor de cinco cultivares de morango, observaram que as cvs. Elsanta e Christine apresentaram maiores teores de açúcares totais quando submetidos a escassez de água. Weber e colaboradores (2017), avaliaram três níveis de déficit hídrico (-12, -33 e -70 kPa) em duas cultivares de morango e observaram que a cv. Eva submetida a déficit hídrico de -33 kPa e -12 kPa apresentou maior teor de açúcares e ácidos orgânicos enquanto a cv. Flamenco, apresentou maior teor destes compostos quando foi submetida ao déficit hídrico -70 kPa. Estresses moderados em morango, segundo Perin e colaboradores (2019) podem induzir o acúmulo de compostos do metabolismo especializado.

Parâmetros agronômicos (crescimento de raízes, folhas, produção), fotossintéticos (CO₂, clorofila, taxa de respiração), conteúdo de açúcares, ácidos orgânicos, antocianinas, compostos fenólicos, ácido ascórbico, minerais e as mudanças gênicas causadas nas rotas dos fenilpropanóides e ácido ascórbico já foram avaliados em morangos submetidos a condições de déficit hídrico e excesso salino (AL-SHORAF; MAHADEEN; AL-ABSI, 2014; GALLI et al., 2016, 2018; GHADERI; SIOSEMARDEH, 2011; GINÉ-BORDONABA; TERRY, 2016; KLAMKOWSKI; TREDER, 2008; PERIN et al., 2019; TURHAN; ERIS, 2005).

4.2 Estresses abióticos

Constantemente as plantas estão sob condições climáticas adversas, e quando expostas excessivamente a variações e condições extremas pode ocorrer desequilíbrio no metabolismo celular. Esses fatores exercem sobre as plantas efeito prejudicial ao crescimento e desenvolvimento, e diante disso, quando capazes de tolerar a condição a que foram submetidas, podem tornar-se resistentes e/ou tolerantes (GONG et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Fatores estressores bióticos, como o ataque de fungos, bactérias, vírus e insetos, e abióticos como a exposição a radiação solar, excesso ou déficit hídrico, temperaturas extremas, salinidade e deficiência de nutrientes, são as principais causas que limitam a produção agrícola (BUCHANAN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013). Quando o suprimento de água, energia e minerais estão adequados as plantas se encontram em equilíbrio ou homeostase celular. No entanto, quando entram em desequilíbrio, ocasionado por uma condição estressora, são ativadas respostas que acarretam na expressão de genes que regulam o metabolismo celular. Porém, fatores como genótipo, estágio de desenvolvimento e duração do estresse influenciam na capacidade de resposta e adaptação das plantas (BUCHANAN et al., 2015; LICHTENTHALER, 1998).

Quando expostas a agentes estressores, as plantas passam por quatro fases de adaptação (Figura 2). O primeiro estágio é o estado de alarme, no qual a planta percebe a condição estressora, altera o funcionamento celular e ativa os mecanismos de sinalização, podendo causar danos severos à célula, diminuindo sua vitalidade. Porém, se a planta resistir, ela entra em processo de aclimação, no qual a célula ativa mecanismos de reparação e proteção, levando ao ajuste da homeostase intracelular. Durante este processo, rotas de sinalização são ativadas e diversos metabólitos são produzidos a fim de reestabelecer uma nova condição de homeostase (LICHTENTHALER, 1998; SHULAEV et al., 2008).

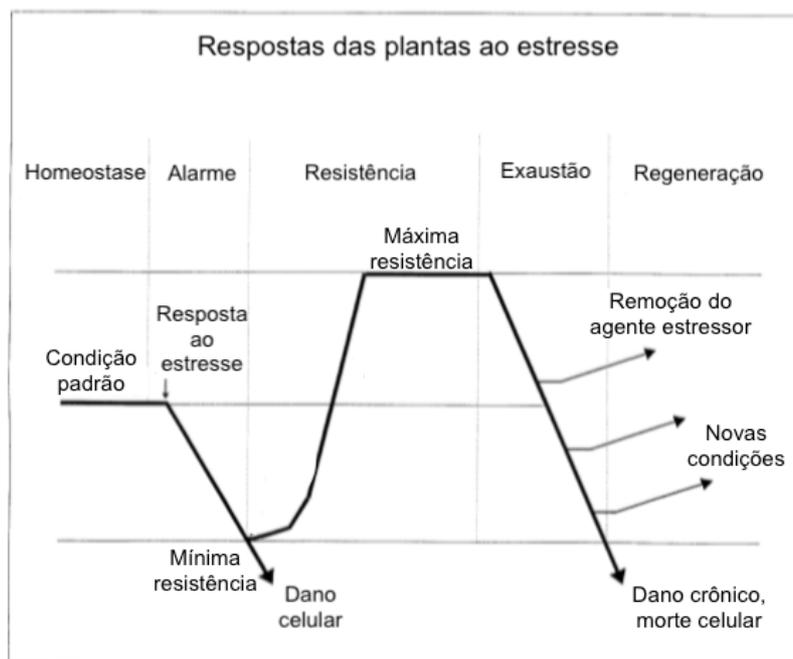


Figura 2 – Fases de adaptação das plantas em situações de estresse (homeostase, alarme, resistência (aclimação e manutenção), exaustão e regeneração).

Fonte: Figura adaptada de LICHTENTHALER, 1998.

Ainda assim, se na etapa de manutenção celular, a planta permanecer exposta por longos períodos ou se a condição estressora for muito intensa, ela entra em processo de exaustão, pois não é capaz de reestabelecer a homeostase celular e entra em senescência. No entanto, se o agente causador do estresse for removido e o dano causado não for severo, a planta estabelece novas condições fisiológicas (CABANE et al., 2012; LICHTENTHALER, 1998).

4.2.1 Déficit hídrico e excesso salino

As plantas estão frequentemente expostas a uma ou mais condições estressoras. Quando há escassez de água pode ocorrer a salinização do solo, implicando na ocorrência simultânea de dois fatores estressores. A deficiência de água e a presença de sal no solo são os principais fatores que determinam a produtividade agrícola. A água é o principal constituinte dos tecidos vegetais e dentre outras funções auxilia nos movimentos intracelulares das moléculas e participa da síntese de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos (MITTLER, 2006; RAVEN et al., 1996).

O déficit hídrico ocorre quando o suprimento de água para as plantas é menor do que a evapotranspiração (ETc) e nessas condições ocorrem o fechamento dos estômatos e a diminuição da fotossíntese. Já o excesso salino causa toxicidade induzindo a senescência. Além disso, a falta de água e o excesso de sal alteram o processo de divisão e expansão celular, diminuindo a altura, a área foliar e o crescimento da planta, afetam as vias metabólicas e contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (O_2^- , $\cdot OH$ e H_2O_2) que estimulam a atividade de enzimas (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase) e o acúmulo de compostos antioxidantes (α -tocoferol, carotenoides e flavonoides) (FAROOQ et al., 2009; GILL; TUTEJA, 2010; OLIVEIRA et al., 2013; RIPOLL et al., 2014).

Ainda assim, para evitar a senescência, as plantas desenvolveram alguns mecanismos de resistência. A prevenção à desidratação é um dos mecanismos usados sob condições de déficit hídrico e excesso salino, permitindo a hidratação da planta ou parte dela, através do crescimento das raízes para melhorar a absorção de água e acumular fotoassimilados (TURNER et al., 2001). Também são utilizados outros mecanismos para adaptação como o florescimento precoce, o acúmulo de ceras na epiderme, alteração da área foliar e a dormência (CHEN; JIANG, 2010; TUBEROSA, 2012).

O ajustamento osmótico é um importante mecanismo utilizado para a sobrevivência das plantas sob condições de estresses osmóticos. Para isso, elas reduzem o potencial osmótico, minimizam a perda de água, favorecem o turgor da célula e mantém a integridade das funções metabólicas. Além disso, algumas plantas são capazes de acumular solutos de baixo peso molecular, como os osmoprotetores (açúcares, glicina betaína, prolina e glutamina) e controlar o transporte de íons (K^+ , Ca^{+2} , Na^+) intracelular (CHAVES et al., 2009; CHEN; JIANG, 2010; TUBEROSA, 2012). No entanto, o ajuste osmótico varia de acordo com a cultivar e a intensidade do estresse gerado (GHADERI; SIOSEMARDEH, 2011; KLAMKOWSKI; TREDER, 2008).

4.3 Metabolômica

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos para se adaptarem às condições expostas, resultando em uma diversidade fenotípica e

morfológica. Com isso, a análise do metaboloma de plantas constitui uma importante ferramenta para o estudo simultâneo de diversos metabólitos com baixo peso molecular que podem ser produzidos em virtude de eventos de transformações genéticas, durante crescimento celular, e/ou sob certas condições de clima e solo (FIEHN, 2002; SAITO; MATSUDA, 2010).

Esta análise pode ser realizada de forma direcionada (*targeted*) ou não direcionada (*untargeted*). Para a análise direcionada é necessário conhecimento prévio do sistema biológico a ser estudado, uma vez que o objetivo é identificar e quantificar compostos de rotas metabólicas ou grupos de compostos específicos. A análise não direcionada permite obter uma visão geral dos metabólitos produzidos em condições distintas, sem a necessidade de caracterizar uma rota metabólica específica (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009; LIU; LOCASALE, 2017). A análise não direcionada pode ser aplicada para identificar compostos marcadores para discriminação de origem (HOFFMANN et al., 2017; KÅRLUND et al., 2016), estágio de maturação (MONTI et al., 2016; ZHANG et al., 2011), diferenças entre genótipos (ARANHA et al., 2017; WAHYUNI et al., 2013). Além disso, esta análise tem sido utilizada a fim de compreender os efeitos do déficit hídrico em *Arabidopsis thaliana* (CORRALES et al., 2017), *Withania somnifera* (SINGH et al., 2018), *Populus euphratica* (BROSCHÉ et al., 2005), e o excesso salino em *Thellungiella halophila* (GONG et al., 2005), *Vitis vinifera* (cv. Carbenet Sauvignon) (CRAMER et al., 2007), *Solanum lycopersicum* (JOHNSON et al., 2003), entre outros.

Um estudo metabolômico integra uma série de etapas, incluindo a etapa de obtenção da matéria-prima, extração dos metabólitos, escolha das plataformas analíticas, processamento e análise estatística dos dados, identificação dos metabólitos e interpretação biológica (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009). Para o desenvolvimento de um estudo metabolômico geralmente se combina o uso de analisadores de massas (MS) de alta resolução a técnicas de separação prévias, como a cromatografia líquida (LC – liquid chromatography), cromatografia gasosa (GC – gas chromatography) e/ou eletroforese capilar (CE – capillary electrophoresis) (SCALBERT et al., 2009; VILLAS-BÔAS et al., 2005). Os aspectos que devem ser considerados estão descritos abaixo.

4.3.1 Obtenção da matéria-prima

O método de obtenção da matéria-prima é fundamental para atingir resultados satisfatórios. As plantas quando são colhidas aceleram o processo de respiração; portanto, é necessário que no momento da colheita, o tempo entre a retirada da amostra da planta e o armazenamento seja reduzido. Baixas temperaturas (-20°C) inativam enzimas degradativas e cessam o processo de respiração evitando a degradação dos compostos presentes na matéria-prima. Após o congelamento rápido, as amostras podem ser submetidas ao processo de liofilização, que visa a remoção da água intracelular sob vácuo, mantendo a integridade da amostra e prolongando o tempo de armazenamento (FIEHN, 2002; HU; XU, 2013).

4.3.2 Extração dos metabólitos

Outro aspecto fundamental para análise metabolômica é o método de extração a ser aplicado. Para a análise não direcionada, podem ser usados solventes não seletivos a fim de aumentar a quantidade e a concentração dos metabólitos extraídos. A escolha do solvente para extração pode ser feita de acordo com o que se deseja obter do extrato metabólico, se o desejado é um predomínio de metabólitos polares (metanol, água, etc.) ou metabólitos apolares (clorofórmio, hexano, etc.) (HU; XU, 2013; MUSHTAQ et al., 2014). A utilização da mistura metanol:água:clorofórmio em diferentes proporções, também é comumente empregada para extração dos metabólitos em análise metabolômica não direcionada, uma vez que permite a extração de uma ampla variedade de compostos como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, alcalóides, compostos fenólicos, ácidos graxos, hidrocarbonetos e ésteres (DE VOS et al., 2007; MONTI et al., 2016; OMS-OLIU et al., 2011).

4.3.3 Plataformas analíticas

4.3.3.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) tem sido empregada para análise metabolômica permitindo a identificação de açúcares, aminoácidos, esteróis, hormônios, ácidos orgânicos, ácidos graxos e compostos

voláteis, demonstrando ser uma importante ferramenta para análise de compostos associados ao metabolismo geral de plantas. É uma técnica que apresenta eficiência de separação, boa resolução e especificidade de detecção do analito (FIEHN, 2017; OKAZAKI; SAITO, 2012).

A maioria dos estudos metabolômicos por GC-MS utilizam a ionização por impacto de elétrons (EI). O analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (70 eV) que provoca o processo de ionização acompanhado pela fragmentação catiônica dos analitos e formação de um íon molecular (M^+). Uma das características mais importantes da GC-MS usando EI é o acesso a diversas bases de dados espectrais disponíveis para a identificação dos metabólitos (FIEHN, 2017; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) pode ser utilizada para análise de compostos que são naturalmente voláteis à temperaturas abaixo de 300 °C sem a necessidade de manipulação da amostra após a etapa de extração. Contudo, compostos pouco voláteis que apresentam em sua estrutura grupos funcionais polares, não são termicamente estáveis em altas temperaturas e por isso, são submetidas a etapa de derivatização, como a metoxiaminação acompanhada da sililação (PUTRI et al., 2013; VILLAS-BÔAS et al., 2005).

A derivatização por metoxiaminação converte aldoses e cetoses em oximas para evitar a enolização dos açúcares e a formação de isômeros. O reagente de metoxiaminação (cloridrato de metoxiamina) é dissolvido em piridina antes da adição nas amostras e a solução é aquecida por 2 horas em uma temperatura de 75 °C (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009; HALKET et al., 2005; LISEC et al., 2006). A sililação [-Si(CH₃)₃] consiste na substituição de grupos -OH, -NH₂, -COOH, =NH e -SH por grupamento silil (trimetilsilil - TMS) diminuindo a polaridade da molécula. Para esta reação é necessário que o extrato seja completamente livre de água (DETTMER et al., 2007; KOEK et al., 2011; PUTRI et al., 2013).

Zhang (2011) e colaboradores utilizaram cromatografia gasosa para avaliar o perfil metabólico de morangos em diferentes estádios de maturação e detectaram compostos de diversas classes como alcanos, álcoois, ésteres, açúcares, ácidos orgânicos e ácidos graxos. Wang et al. (2015) avaliaram o efeito de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) no cultivo de rabanete (*Raphanus sativus* L.) através da análise

metabolômica por GC-MS e observaram alteração de compostos do metabolismo de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e esteroides.

4.3.3.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Outra ferramenta analítica bastante utilizada em análise metabolômica é a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), devido a sensibilidade, rapidez na aquisição dos dados e alta precisão de massa (< 5 ppm). A utilização de colunas de fase reversa permite a separação de compostos semi-polares como compostos fenólicos, flavonoides, esteroides glicosilados e alcaloides, sendo uma alternativa para a identificação de compostos do metabolismo especializado (MOCO et al., 2007; OKAZAKI; SAITO, 2012).

O poder de resolução, precisão de massa e sensibilidade são influenciados pelas condições cromatográficas (temperatura, pH, coluna, taxa de fluxo e gradiente), parâmetros de injeção, parâmetros do espectrômetro de massas (calibração, voltagem do capilar, orientação das lentes) e tipo de analisador. O modo de ionização das moléculas é outro parâmetro fundamental para obtenção de resultados satisfatórios. A ionização por *electrospray* (ESI) é um dos modos de ionização mais utilizados em LC-MS, que se baseia no uso de um campo elétrico intenso, sob pressão atmosférica, formando gotículas carregadas (ionizadas) que são evaporadas através de um fluxo de gás inerte, normalmente nitrogênio, promovendo a formação de íons moleculares (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; MOCO et al., 2007).

Os íons gerados por ESI podem ser protonados $[M+H]^+$, desprotonados $[M-H]^-$, cationizados $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ ou anionizados $[M+Cl]^-$. No modo de ionização positivo ocorre a protonação de substâncias que apresentam em sua estrutura grupamentos básicos como aminas, amidas e ésteres. Por outro lado, a desprotonação ocorre em substâncias que apresentem estrutura com grupamentos ácidos, como ácidos carboxílicos e compostos fenólicos (CROTTI et al., 2006).

Após o processo de ionização, os íons e os fragmentos formados são analisados de acordo com a razão massa/carga (m/z). Os analisadores do tipo quadrupolo operam a uma razão menor do que m/z 4.000 e possuem exatidão de massa de 0,1 a 0,2 unidades de massa atômica (u.m.a). São compostos por quatro barras metálicas paralelas, sendo duas barras com potencial elétrico positivo e

duas com potencial negativo. Quando uma corrente elétrica é aplicada, é possível o escaneamento dos espectros de massas selecionados em razão da m/z . Moléculas com massas moleculares mais elevadas são “filtradas” pelo polo positivo enquanto massas menores passam pelo polo negativo, no entanto, moléculas que não correspondem a faixa de massa selecionada são eliminados através de uma bomba a vácuo (LANÇAS, 2013; PITT, 2009).

Os analisadores de massas tipo tempo de voo (TOF) são atualmente os mais empregados em estudos metabolômicos com LC devido a sua sensibilidade, alta resolução e velocidade de aquisição de dados (HERRERO et al., 2012). No TOF os íons formados na fonte de ionização são extraídos e acelerados em alta velocidade por um campo elétrico em um tubo longo (*flight tube*) para posteriormente chegar ao detector. Como todos os íons recebem a mesma energia cinética, o tempo percorrido pelo íon dentro do tubo é proporcional à raiz quadrada da sua massa e a razão m/z será determinada medindo-se o tempo percorrido pelos íons até o detector (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; LANÇAS, 2013).

Os analisadores de massas em *tandem*, como por exemplo o quadrupolo e o tempo de voo (Q/TOF), permitem a obtenção de informações da massa exata e estrutura química do metabólito analisado facilitando a identificação tentativa pelas bases de dados. Por isso, a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo em tandem (UHPLC-Q/TOF MS) são bastante frequentes em estudos de metabolômica devido a sua robustez, poder de resolução, precisão de massa e sensibilidade de análise (DE VOS et al., 2007; HERRERO et al., 2012; HOFFMANN et al., 2017; JANDRIĆ et al., 2014).

4.3.4 Processamento e análise estatística de dados

O processamento dos dados em análise metabolômica consta de várias etapas. As principais etapas compreendem a remoção de ruídos, detecção dos picos, alinhamento e normalização dos sinais, obtendo ao final do processo uma matriz tridimensional que consiste na razão m/z , tempo de retenção e intensidade de cada composto específico (*features*). A remoção de ruídos é realizada para diminuir o sinal do analito na amostra biológica do sinal produzido por solventes ou pelo equipamento (*background*). Na detecção e no alinhamento é feita a

identificação dos picos correspondentes a uma razão m/z , tempo de retenção e intensidade específicos (CASTILLO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2017).

A normalização dos sinais (intensidade ou área) tem por objetivo diminuir as diferenças entre as amostras, enquanto que o escalonamento, permite a comparação dos metabólitos de diferentes amostras. Esta etapa consiste na remoção dos erros ocasionados no preparo da amostra (peso, volume de solvente) e/ou durante análise instrumental (temperatura, degradação da amostra) a fim de minimizar as variações dentro do mesmo grupo. O auto-escalonamento possibilita que todos os metabólitos tenham o mesmo desvio padrão relativo (RSD) (DE LIVERA et al., 2012; GORROCHATEGUI et al., 2016; WU; LI, 2015; XIA et al., 2009).

A interpretação dos dados após o processamento é realizada através da análise estatística para avaliar a significância das variações entre grupos. A análise univariada avalia uma variável por vez e não considera efeito de comparações múltiplas. Neste tipo de análise podem ser utilizados testes paramétricos e não paramétricos para a comparação de dois grupos. O teste paramétrico, é utilizado quando os dados possuem uma distribuição normal e o teste não paramétrico, quando não se conhece os parâmetros da distribuição dos dados. Ambos os testes podem ser usados de forma independente (*unpaired*) quando se deseja a comparação das médias de dois grupos, como por exemplo, a obtenção de respostas metabólicas de amostras controle e estressadas, ou de forma dependente (*paired*) quando o mesmo grupo de indivíduos é submetido ao mesmo tratamento e a comparação das médias é feita antes e depois do tratamento (GOWDA et al., 2014; SACCENTI et al., 2014).

Existem diferentes softwares de acesso livre disponíveis para o processamento de dados como XCMS (TAUTENHAHN et al., 2012), MAVEN (CLASQUIN et al., 2014), MZmine (PLUSKAL et al., 2010), MetaboAnalyst (XIA et al., 2009), entre outros. A análise univariada disponível no software MetaboAnalyst possibilita a utilização de três métodos diferentes, análise de Fold Change, Test-t e Volcano Plot. O fold change compara o nível de significância do valor absoluto calculado pela razão das médias de amostras controle e amostras tratadas. O test-t permite identificar a variabilidade de cada metabólito através do p-valor que determina a diferença estatística entre as variáveis. A análise pelo Volcano Plot utiliza ambos fold change e test-t em escala logarítma, no qual o eixo horizontal (x)

representa o fold change de dois grupos (Log_2) e o eixo vertical (y) representa o p-valor ($-\log_{10}$) da diferença entre as amostras pelo test-t (XIA et al., 2009).

4.3.5 Identificação dos metabólitos

A identificação dos metabólitos analisados por LC acoplados a detectores de massas de alta resolução é realizada através da massa exata experimental dos metabólitos, perfil de fragmentação e padrão isotópico. Equipamentos de alta resolução permitem obter a massa experimental do metabólito com até quatro casas decimais. Além disso, o próprio software que acompanha o equipamento permite que através da massa exata sejam disponibilizados uma ou mais fórmulas moleculares que podem ser identificados em bases de dados *online* como HMDB, ChemSpider, METLIN, FooDB, KEEG, MassBank, Phenol-Explorer. Em análise por GC-MS os espectros de massas experimentais são comparados com os espectros de massas disponíveis na biblioteca (NIST/EPA/NIH) vinculadas ao software de processamento de dados que acompanha o equipamento. Através do índice de similaridade observado no comparativo entre o espectro da amostra com o espectro da biblioteca pode ser realizada a identificação tentativa dos metabólitos. O termo identificação tentativa é comumente utilizado quando não há padrão externo disponível para confirmar a identificação do metabólito (DUNN et al., 2011; KIM et al., 2016; SUMNER et al., 2013).

5 Material e métodos

5.1 Material Vegetal

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no ano de 2014 no município de Pelotas, Rio Grande do Sul (latitude $31^\circ 41' 08''$ sul, longitude $52^\circ 25' 56''$ oeste, altitude 42m).

As mudas de morango cv. Camarosa foram transplantadas e cultivadas em potes de 9 L contendo uma mistura de solo (Ultisol 6,6 kg/pote) e vermiculite (2,2 kg/pote) (3:1). O fertilizante utilizado foi composto por uréia, superfosfato triplo e cloreto de potássio, sendo fontes de 267 kg/ha de N, 619 kg/ha de P_2O_5 e 333 kg/ha de K_2O , respectivamente. A irrigação ocorreu por gotejamento diário e o volume de água para a irrigação foi ajustado semanalmente. O desenho experimental foi inteiramente ao acaso com 4 tratamentos, 6 repetições por

tratamento e 10 plantas por repetição. Os tratamentos foram: grupo controle/irrigação normal (C) correspondendo a 100% da evapotranspiração da cultura (ET_c) e sem adição de NaCl; déficit hídrico com 95% ET_c (DH1); déficit hídrico com 85% ET_c (DH2) e excesso salino com 80 mM NaCl (ES) (GALLI et al., 2016; PERIN et al., 2019). A aplicação dos tratamentos ocorreu uma vez por semana no início do estágio de floração (105 dias após as mudas serem transplantadas - DAT) até o final do ciclo produtivo (190 DAT). As frutas foram colhidas no final do experimento, aproximadamente de 60 a 120 dias após a antese, quando estavam maduras (coloração da polpa completamente vermelha) e em seguida armazenadas em ultra-freezer a -80 °C.

A fase de experimentação na casa de vegetação, para aplicação dos tratamentos descritos, foi realizada por Perin et al. (2019). As frutas amostradas ao longo do experimento foram armazenadas por 36 meses a -80 °C e serviram como amostras para a realização deste trabalho de pesquisa.

5.2 Análise metabolômica não direcionada por LC-MS/MS

5.2.1 Preparo dos extratos

A análise metabolômica não direcionada foi realizada de acordo com método proposto por De Vos et al. (2007). As amostras de morango dos diferentes grupos (C, DH1, DH2 e ES) foram liofilizadas, maceradas em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido e 100 mg foram pesadas em microtubos de centrifuga de 2 mL, em três repetições biológicas. Em cada tubo contendo a amostra foi adicionado 1 mL de metanol grau HPLC 75% acidificado com 0,1% de ácido fórmico, posteriormente agitados em vortex por 10 segundos, sonicados por 15 minutos e centrifugados a 9.900 x *g* a 25 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o processo de extração foi repetido com o precipitado, obtendo ao final um volume aproximado de 2 mL. Para as análises, reserpina (padrão interno, concentração final de 7 µg mL⁻¹) foi adicionada ao extrato e os mesmos foram filtrados em membrana de nylon 0,2 µm para posterior injeção.

5.2.2 Parâmetros e condições de análise

Para as análises cromatográficas, foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas

de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo, LC-ESI-Q/TOF MS (Impact HD, Bruker Daltonics, Alemanha). A separação dos compostos foi realizada utilizando uma pré coluna Luna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 mm x 150 mm, 100 Å, 3 µm) (Phenomenex Torrance, CA, USA). As fases móveis utilizadas para eluição foram água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min⁻¹ com um volume de injeção de 10 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. O tempo de corrida foi de 30 minutos iniciando o gradiente de eluição com 10% de B 0,00 – 2,00 min, 75% de B 2,01 – 15 min, 90% de B 15,01 – 21,00 min, 10% de B 21,01 – 23,00 min, permanecendo por 7 minutos nessa condição para estabilização da coluna.

O espectrômetro de massas foi operado nos modos de ionização negativo e positivo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de 50 a 1200 *m/z*. Os parâmetros de aquisição para o modo negativo e positivo foram, respectivamente: voltagem do capilar 3,5 kV e 4,5 kV, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2,0 Bar, gás de secagem 8,0 L min⁻¹ e 9,0 L min⁻¹, temperatura da fonte de 180 °C e 200 °C, colisão de RF de 500,0 Vpp, tempo de transferência 120 µs e 60 µs e armazenamento pré pulso 8,0 µs e 5,0 µs.

O equipamento foi calibrado com formiato de sódio (10 mM) cobrindo a faixa de aquisição de 50 à 1200 *m/z*. Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão: *m/z* 100, 15 eV; *m/z* 500, 35 eV; *m/z* 1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão.

5.3 Análise metabolômica não direcionada por GC-MS

5.3.1 Preparo dos extratos

A análise metabolômica não direcionada por GC-MS foi realizada de acordo com método proposto por Lisec et al. (2006). Para o preparo das amostras, 30 mg de amostra liofilizada e macerada em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido foram pesadas em microtubos de centrífuga de 2 mL, 1400 µL de metanol grau HPLC (-20 °C) foram adicionados e os tubos foram agitados em vortex por 10 segundos. 60 µL de ribitol (0,2 mg mL⁻¹ em água ultra pura) e 10 µL de antrona (1,0 mg mL⁻¹ em clorofórmio grau HPLC) foram adicionados como padrões internos e novamente agitados em vortex por 10 segundos. Os extratos resultantes foram

agitados em termomisturador (Eppendorf, termomixer 5436) a 70 °C, 900 rpm por 10 min e após centrifugados a 20 °C, 7000 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado em tubos de centrífuga tipo falcon de 15 mL, 750 µL de clorofórmio grau HPLC (-20 °C) e 1500 µL de água ultra pura (4 °C) foram adicionados e agitados em vortex por 10 segundos. Após, foram centrifugados a 2200 x g a 15 °C por 15 min e 150 µL da fração superior (fração A – metanol e água) foram coletados em microtubos de 1,5 mL para posterior secagem com nitrogênio gasoso e aproximadamente 600 µL da fração inferior (fração B – clorofórmio) foi reservada para análise cromatográfica.

No resíduo evaporado da fração superior (fração A) foi realizada a etapa de derivatização. O reagente de metoxiamação (cloridrato de metoxiamina a 20 mg mL⁻¹ em piridina) foi preparado no momento da análise. Quarenta µL foram adicionados nas amostras e foram agitadas em termomisturador (Eppendorf, termomixer 5436) a 37 °C, 900 rpm por 2 h. Após, foram adicionados 70 µL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] e agitou-se em termomisturador por mais 30 min a 37 °C. Aproximadamente 100 µL de amostra derivatizada foram transferidos para vials de 1,5 mL contendo *inserts* de 200 µL e 1 µL foi injetado no GC-MS para análise cromatográfica. Para a determinação do índice de tempo de retenção (FIEHN, 2017), foram utilizados ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES C8-24) na concentração de 0,8 mg mL⁻¹.

5.3.2 Parâmetros e condições de análise

Para a análise das frações A e B foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra com autoinjeter AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. A temperatura do injetor foi de 230 °C com um volume de injeção de amostra de 1 µL, temperatura da coluna 80 °C e modo de injeção *split* (1:50) para a fração A e *splitless* para a fração B. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 2 mL min⁻¹ e uma velocidade linear como modo de controle do fluxo. A coluna utilizada foi Rxi-1MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) e o programa de temperatura utilizado para a fração A foi de 26,5 min com programação isotérmica por 2,0 min a 80 °C, rampa de temperatura com aumento 15 °C min⁻¹ até 170 °C permanecendo por 3,5 min e aumento de 15 °C min⁻¹ até 320 °C, permanecendo por 5 min nesta condição. Para a fração B, o programa de

temperatura utilizado foi de 21,0 min com uma programação isotérmica por 2,0 min a 80 °C, rampa de temperatura com aumento de 15 °C min⁻¹ até 320 °C permanecendo nesta condição por 3 min. O espectrômetro de massas foi operado com ionização de impacto eletrônico de 70 eV, temperatura de fonte de íons e interface de 250 °C, faixa de massa de 70 a 600 *m/z*, 0,2 espectros por segundo e 3 min como o tempo de corte de solvente.

5.4 Tratamento dos dados

5.4.1 LC-MS/MS

Os espectros de massas foram calibrados, com desvio padrão menor do que 0,4 ppm, no software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, Alemanha). A detecção dos picos foi realizada no software ProfileAnalysis 2.1 (Bruker Daltonics, Alemanha) utilizando o algoritmo de busca de características moleculares (Find Molecular Features, FMF) com os seguintes parâmetros: limite sinal/ruído: 3, coeficiente de correlação: 0,7, comprimento mínimo: 10, janela de suavização: 1. Esse algoritmo gera uma lista com as informações de *m/z*, tempo de retenção (TR) e intensidade dos íons detectados em cada amostra.

Para a obtenção da matriz de dados alinhados (*Bucket table*) contendo as informações de *m/z*, TR e a intensidade de cada íon detectado foi utilizado o parâmetro “*Advanced bucketing*” com limite de TR de 0,5 min e janela de precisão de massa de 5 ppm. Para a construção da matriz foram considerados os íons que estavam presentes em pelo menos 60% de cada tratamento (C, DH1, DH2 e ES), através do filtro “*Bucket filter*”.

A matriz gerada foi processada no software MetaboAnalyst 4.0 no formato .csv e a normalização dos dados para os modos negativo e positivo foi realizada pela média e soma da intensidade dos íons de cada tratamento, respectivamente e auto escalonamento. Para a análise univariada foram utilizados Teste-t ($p \leq 0,05$) e Fold Change [$\log_2(\text{FC})$] ($+0,5 \leq x \leq -0,5$). Os íons que apresentaram diferença pelo Teste-t e $\log_2(\text{FC})$ foram identificados através da comparação dos valores de *m/z* experimental com os valores de *m/z* teóricos e perfil de fragmentação obtidos em bases de dados online como FooBD (<http://foodb.ca/spectra/ms/search>), METLIN (<https://metlin.scripps.edu>), HMDB (<http://www.hmdb.ca/spectra/ms/search>) e

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) com um intervalo de precisão de 5 ppm.

As fórmulas moleculares sugeridas nas bases de dados foram comparadas com as fórmulas obtidas através do *SmartFormula*, ferramenta disponível no software DataAnalysis 4.2, que disponibiliza uma lista com a razão m/z , íon formula e padrão isotópico das possíveis fórmulas moleculares.

5.4.2 GC-MS

Os espectros de massas foram processados no software GCMS Postrun Analysis, com integração automática do Cromatograma de Íons Totais (TIC) obtendo uma matriz com tempo de retenção (TR) e a intensidade de cada composto detectado. A matriz gerada no formato .csv foi processada no software MetaboAnalyst 4.0 e a normalização dos dados para a fração A foi realizada pela média da intensidade dos íons dos tratamentos e auto escalonamento, e para a fração B pela soma da intensidade dos íons dos tratamentos e auto escalonamento. Para a análise univariada foram utilizados Teste-t ($p \leq 0,05$) e Fold Change [$\log_2(FC)$] ($+0,5 \leq x \leq -0,5$). Os íons que apresentaram diferença pelo Test-t e $\log_2(FC)$ foram identificados através da comparação do padrão de fragmentação experimentais com padrões de fragmentações teóricos contidos na biblioteca NIST 11.

6 Resultados

6.1 Análise metabolômica não direcionada por LC-MS/MS

Após a obtenção da matriz (m/z , RT; intensidade) no ProfileAnalysis, foi possível detectar 109 íons no modo de ionização negativo (Figura 3A) e 672 íons no modo de ionização positivo (Figura 3B).

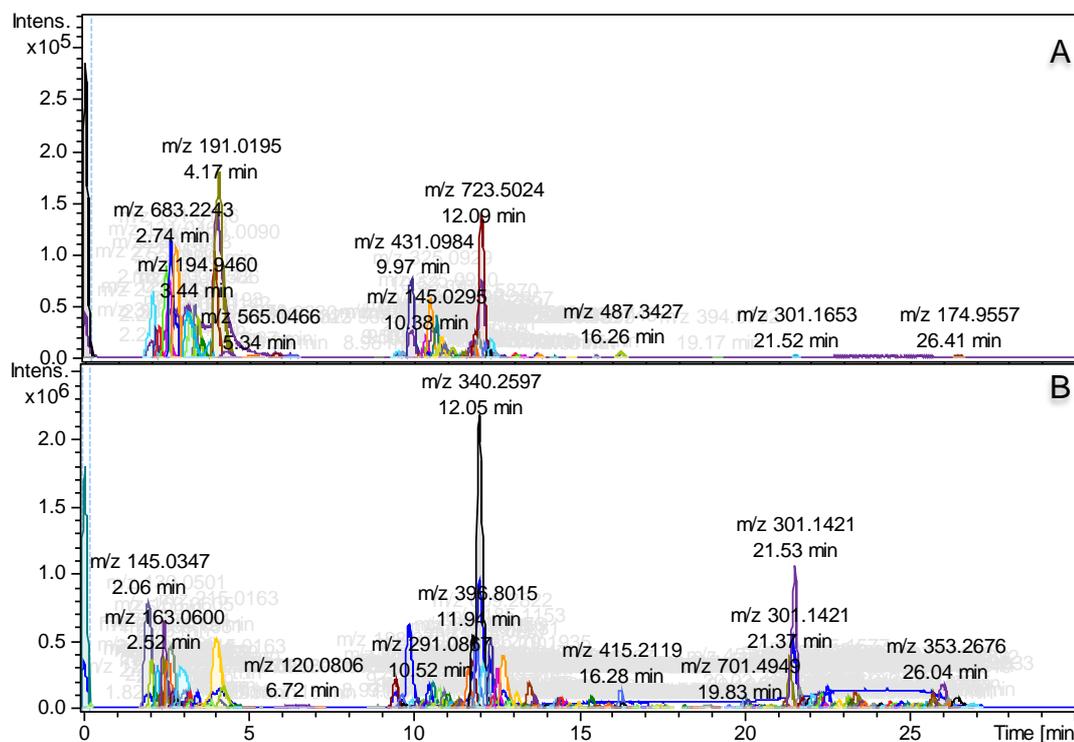


Figura 3 - Cromatograma de íons extraídos (EICs) de metabólitos detectados em extratos de morango cv. Camarosa do grupo controle por LC-MS/MS no modo de ionização negativo (A) e positivo (B).

A fim de verificar quais as principais mudanças fisiológicas no metaboloma dos morangos submetidos ao déficit hídrico 95% ETc (DH1), déficit hídrico 85% ETc (DH2) e excesso salino 80 mM NaCl (ES) frente ao grupo controle, as matrizes de dados foram submetidas à análise estatística univariada e os metabólitos que apresentaram diferença significativa entre os tratamentos *versus* o controle foram putativamente anotados.

Foi possível observar que morangos submetidos ao déficit hídrico 95% ETc (DH1), analisados no modo de ionização negativo, apresentaram aumento significativo no teor de dois compostos em relação ao grupo controle (Figura 4).

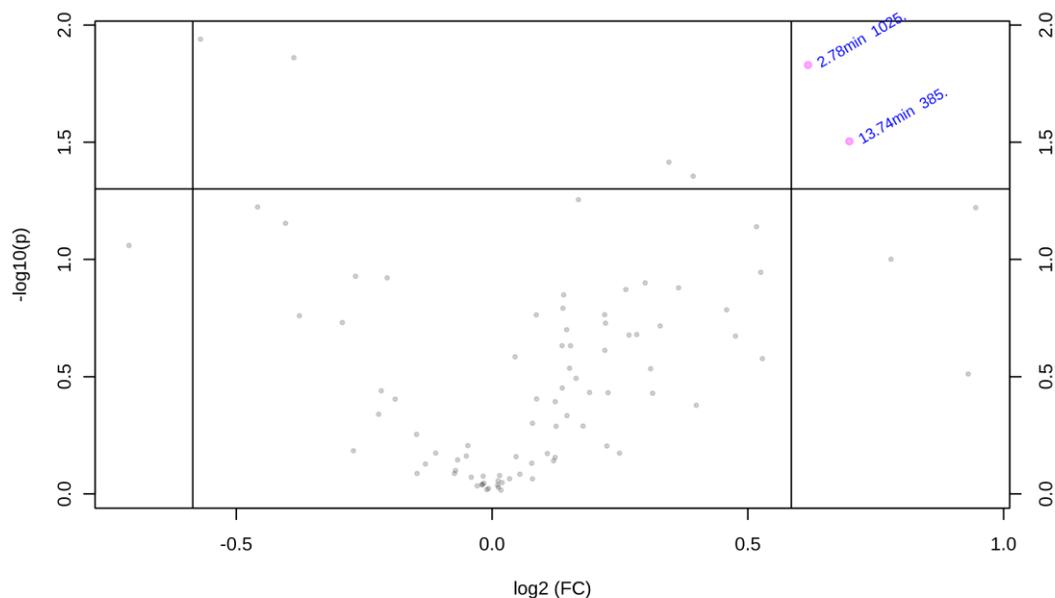


Figura 4 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

O composto $[3\text{M-H}]^-$ m/z 1.025,3406 (Figura 5) com tempo de retenção de 2,78 minutos foi identificado como três moléculas de dissacarídeo ligadas entre si e apresentou os fragmentos m/z 341,1089 e m/z 179,0559, os quais correspondem a um di- e um monossacarídeo, respectivamente. Este composto aumentou 27% nos morangos submetidos ao tratamento DH1 em relação ao grupo controle.

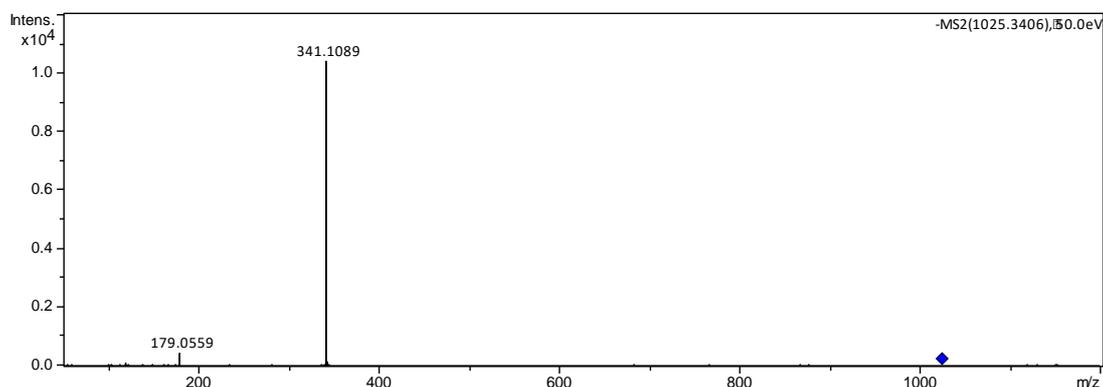


Figura 5 - Espectro de MS/MS do composto m/z 1.025,3406 presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH1 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.

O composto $[\text{M-H}]^-$ m/z 385,1512 (Figura 6) com tempo de retenção de 13,74 minutos, foi putativamente identificado como metilsiringina, através da

comparação da razão m/z experimental com a teórica e o perfil de fragmentação com a base de dados online FooDB. Neste perfil de fragmentação é evidenciada a presença do fragmento m/z 223,0976, o qual foi produzido pela perda de uma hexose [M-162,0536]. A metilsiringina aumentou 31% nos morangos do tratamento DH1 em relação ao grupo controle.

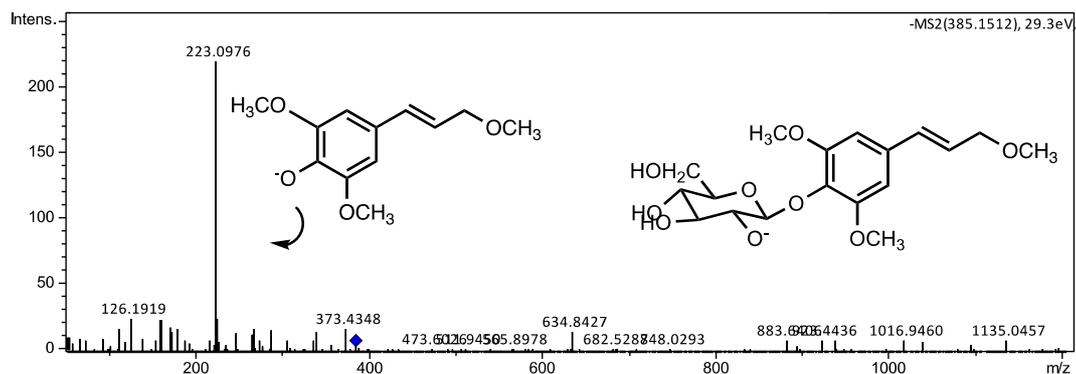


Figura 6 - Espectro de MS/MS da metilsiringina presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH1 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nos morangos submetidos ao déficit hídrico 95% ETc (DH1) em relação aos morangos do grupo controle, analisados no modo de ionização positivo (Figura 7).

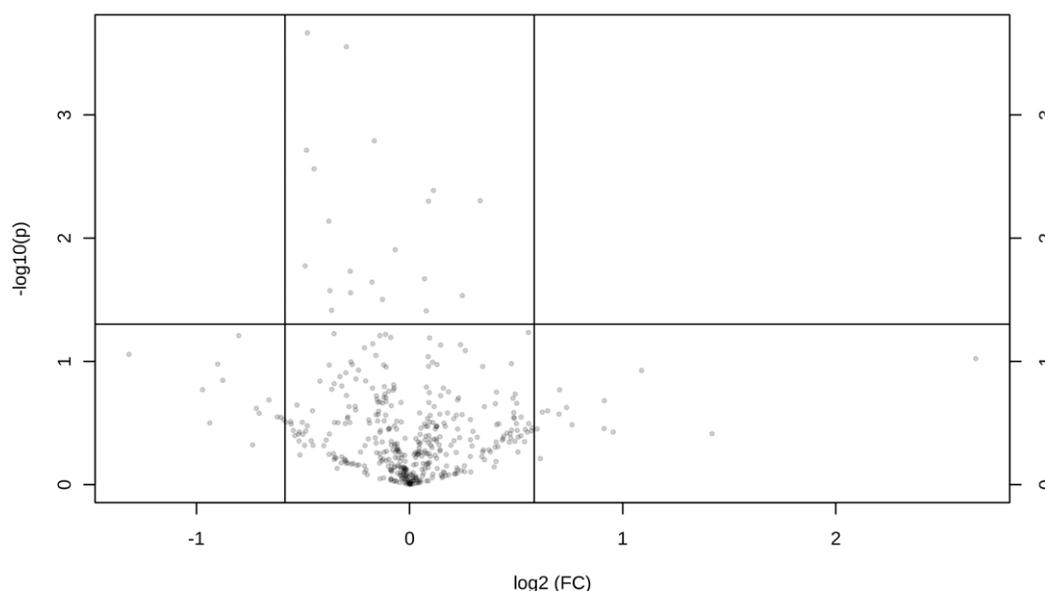


Figura 7 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(FC)$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student (p -valor $\leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização positivo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Para os morangos do tratamento com déficit hídrico 85% ETc (DH2), analisados no modo de ionização negativo, foi observado aumento no teor de um composto e redução no teor de dois compostos em relação ao grupo controle (Figura 8).

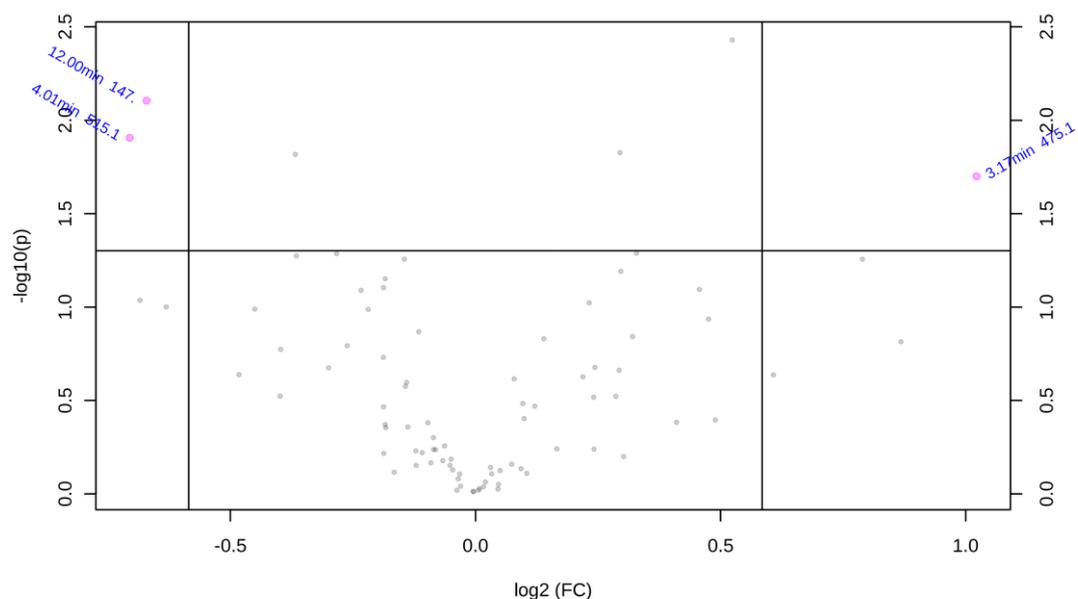


Figura 8 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

O composto $[2\text{M-H}]^-$ m/z 475,1296 (Figura 9) com tempo de retenção de 3,17 minutos, foi putativamente identificado como ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico e teve seu teor aumentado em 51% no tratamento DH2 em relação ao grupo controle. O fragmento m/z 133,0138 foi produzido pela perda de $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4]^-$. O ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico pertence à subclasse dos carboidratos e carboidratos conjugados.

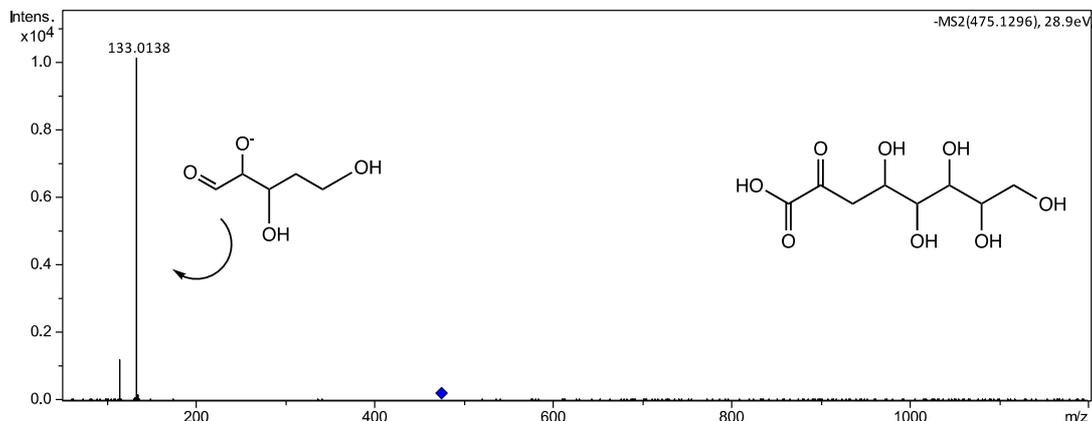


Figura 9 - Espectro de MS/MS do ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.

O composto $[M-H]^-$ m/z 515,1235 (Figura 10) com tempo de retenção de 4,01 minutos, foi putativamente identificado como β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose e teve seu teor reduzido em aproximadamente 38% nos morangos do tratamento DH2 em relação ao grupo controle. O β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose pertence à subclasse dos carboidratos e carboidratos conjugados.

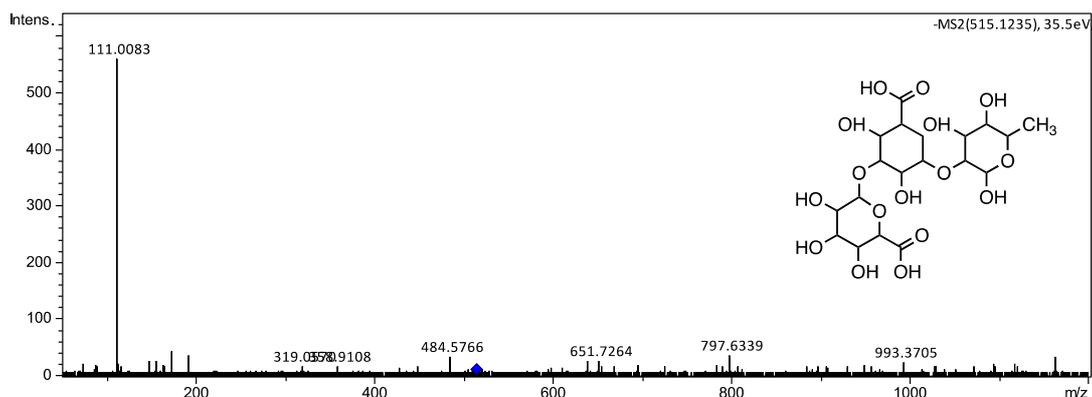


Figura 10 - Espectro de MS/MS do β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.

O composto $[M-H]^-$ m/z 147,0445 (Figura 11) com tempo de retenção de 12 minutos, foi putativamente identificado como ácido trans-cinâmico e teve seu teor reduzido em aproximadamente 36% nos morangos do tratamento DH2 em relação ao grupo controle. O ácido trans-cinâmico pertence à classe dos ácidos cinâmicos e derivados.

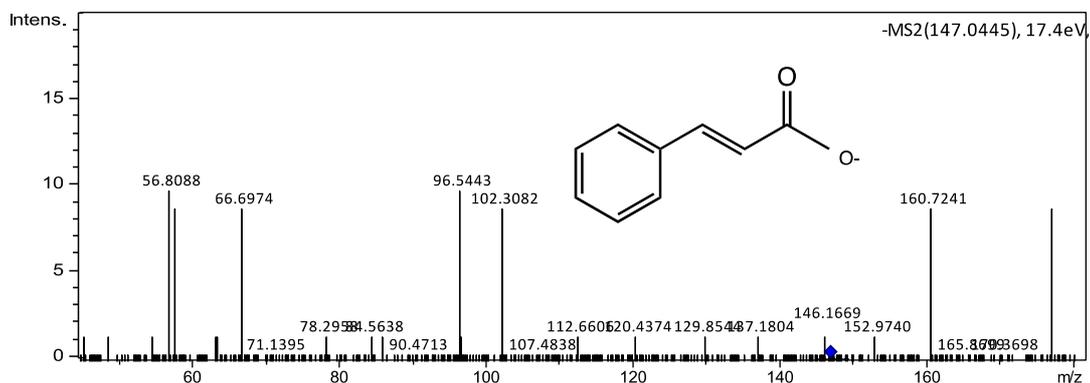


Figura 11 - Espectro de MS/MS do ácido trans-cinâmico presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nos morangos submetidos ao déficit hídrico 85% ETc (DH2) em relação aos morangos do grupo controle, analisados no modo de ionização positivo (Figura 12).

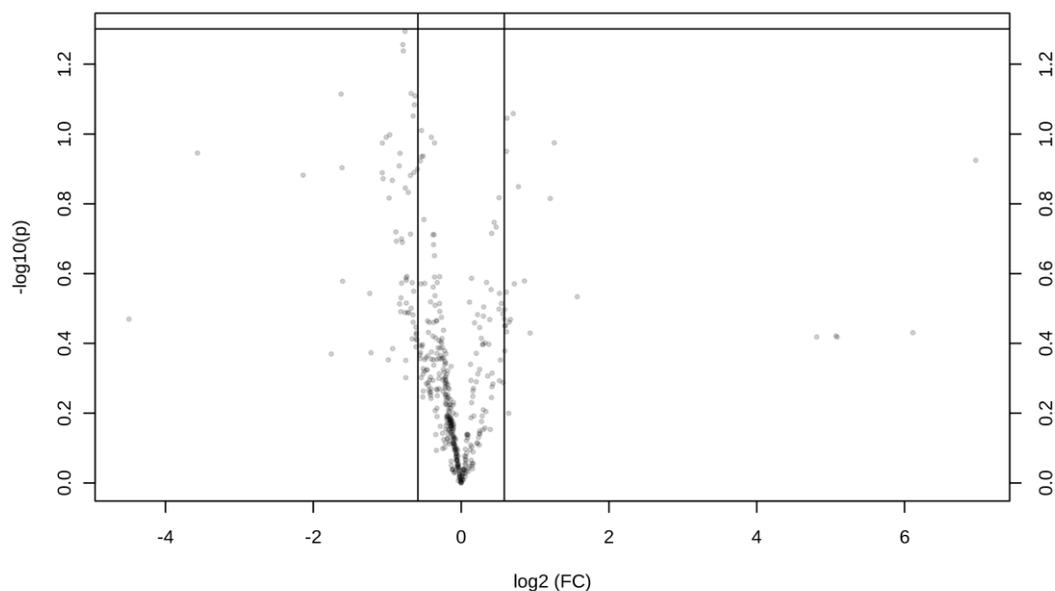


Figura 12 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização positivo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Na análise no modo de ionização negativo, não foram observadas diferenças significativas nos morangos do tratamento com excesso salino (ES) em relação ao grupo controle (Figura 13).

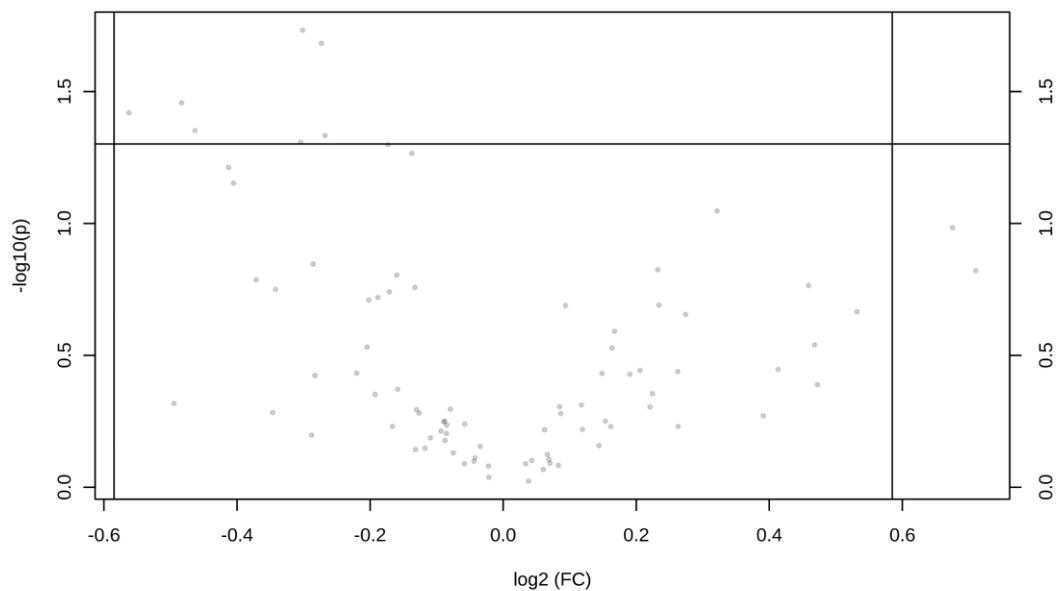


Figura 13 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização negativo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Por outro lado, os morangos que foram submetidos ao excesso salino (ES), analisados no modo de ionização positivo, apresentaram um aumento significativo no teor de dois compostos em relação ao grupo controle (Figura 14).

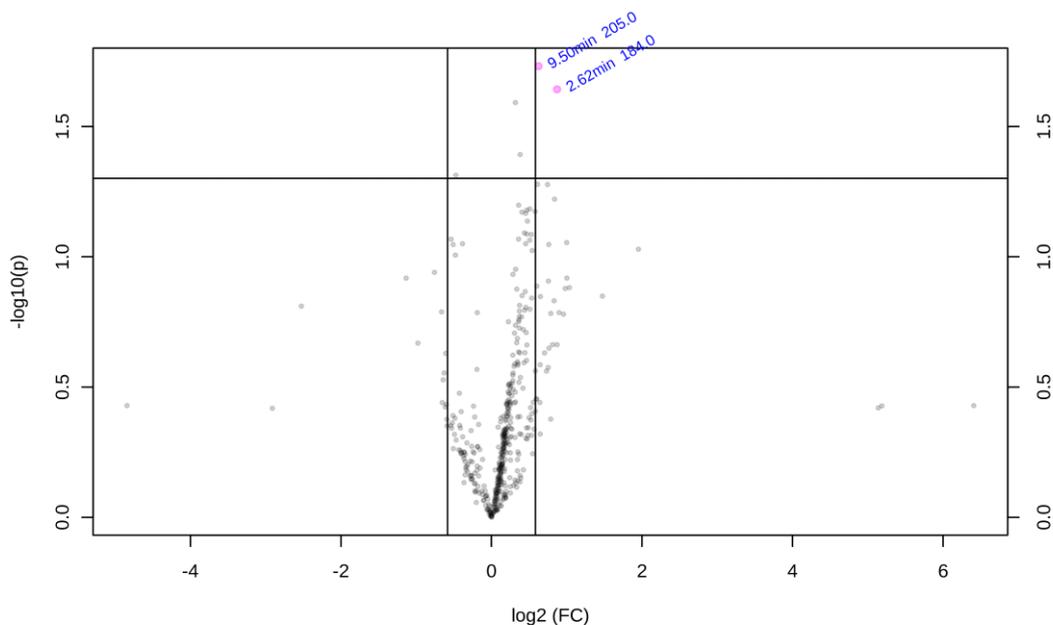


Figura 14 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por LC-MS/MS no modo de ionização positivo. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

O composto $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 184,0736 com tempo de retenção de 2,62 minutos foi putativamente identificado como fosfocolina e aumentou aproximadamente 39% nos morangos do tratamento ES em relação ao grupo controle. O composto $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 205,0966 (Figura 15) com tempo de retenção de 9,50 minutos, foi identificado como L-triptofano por comparação do tempo de retenção e perfil de fragmentação com padrão externo comercial nas mesmas condições de análise. O teor de triptofano aumentou em 25% nos morangos do tratamento ES em relação ao grupo controle.

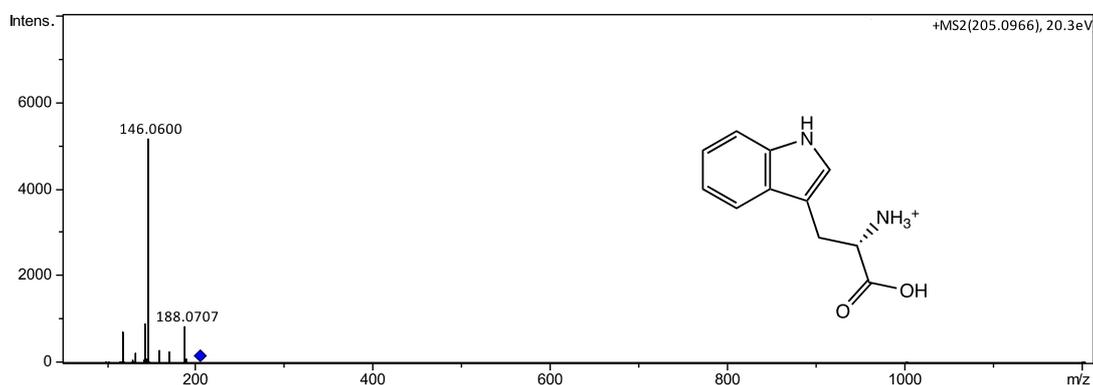


Figura 15 - Espectro de MS/MS do L-triptofano presente em morangos cv. Camarosa no tratamento ES analisado por LC-MS/MS no modo de ionização positivo.

Nas tabelas 1 e 2 estão apresentadas as informações da análise univariada ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) e a identificação tentativa dos metabólitos que diferiram entre os tratamentos em relação ao grupo controle.

Tabela 1 - Metabólitos detectados por LC-MS/MS que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos

Identificação tentativa	C vs DH1		C vs DH2		C vs ES	
	Log ₂ (FC)	p-valor	Log ₂ (FC)	p-valor	Log ₂ (FC)	p-valor
Fosfocolina	-	-	-	-	0,87	2E ⁻²
Dissacarídeo	0,62	1E ⁻²	-	-	-	-
Ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico	-	-	1,02	2E ⁻²	-	-
β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose	-	-	-0,70	1E ⁻²	-	-
L-triptofano	-	-	-	-	0,62	2E ⁻²
Ácido trans-cinâmico	-	-	-0,67	8E ⁻³	-	-
Metilsiringina	0,70	3E ⁻²	-	-	-	-

C: controle; DH1: 95% ETc déficit hídrico; DH2 85% ETc déficit hídrico; ES: excesso salino; Valores positivos de log₂(FC) indicam que os metabólitos aumentaram nos tratamentos DH1, DH2 e ES em relação ao controle e vice-versa. *p*-valor de acordo com teste-t de *Student*.

Tabela 2 - Identificação tentativa dos metabólitos que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos na análise metabolômica não direcionada por LC-MS/MS

Identificação tentativa	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> íon fragmentos	Formula molecular	Energia de colisão (eV)	Erro (ppm)	mSigma	Base de dados
Fosfocolina	2,62	184,0736 [M+H] ⁺	-	C ₅ H ₁₅ NO ₄ P	-	-1,7	45,3	FDB031111
Dissacarídeo	2,78	1025,3406 [3M-H] ⁻	341,1089, 179,0559	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	50	0,6	37	-
Ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico	3,17	475,1296 [2M-H] ⁻	133,0138, 115,0036	C ₈ H ₁₄ O ₈	28,9	-0,4	20,1	FDB030420
β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose	4,01	515,1235 [M-H] ⁻	111,0083, 173,0075, 191,0225	C ₁₈ H ₂₈ O ₁₇	35,5	0,1	4,4	FDB019367
L-triptofano*	9,50	205,0966 [M+H] ⁺	146,0600, 188,0707	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	20,3	-1,3	10,8	FDB002250
Ácido trans-cinâmico	12,00	147,0445 [M-H] ⁻	96,5443, 56,8088	C ₉ H ₈ O ₂	17,4	4	2,9	FDB008784
Metilsiringina	13,74	385,1512 [M-H] ⁻	223,0976, 126,1919	C ₁₈ H ₂₆ O ₉	29,3	-0,6	13,5	FDB019191

TR = tempo de retenção; mSigma = representa a similaridade entre a massa do padrão isotópico teórico e a massa experimental; *confirmado com padrão externo

6.2 Análise metabolômica não direcionada por GC-MS

A partir das duas frações semi-polares A e B (Figura 16) analisadas, foram detectados 56 e 62 picos, respectivamente. Para a melhor compreensão das mudanças fisiológicas causadas pelos fatores estressores frente ao grupo controle, realizou-se a análise univariada para cada tratamento.

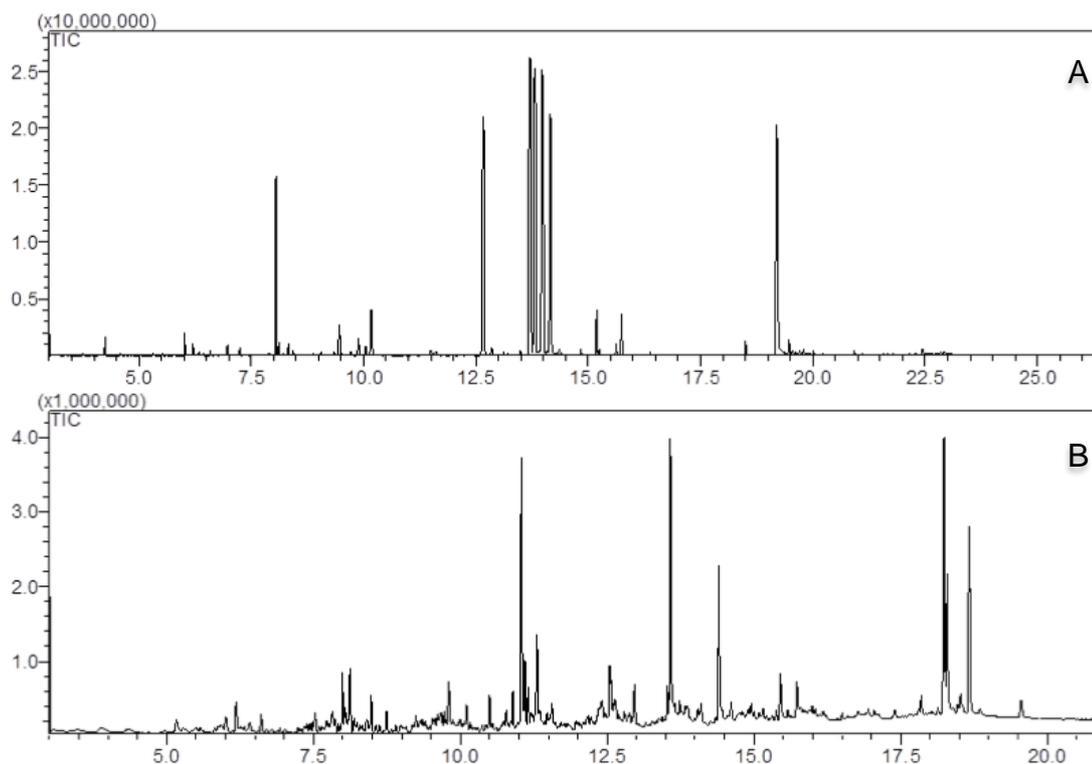


Figura 16 - Cromatograma do íons totais (TIC) da análise metabolômica não direcionada de morango cv. Camarosa por GC-MS na fração semi-polar A (A) e fração semi-polar B (B).

Morangos submetidos ao déficit hídrico 95% ETc (DH1), analisados na fração semi-polar A, não diferiram do grupo controle (Figura 17).

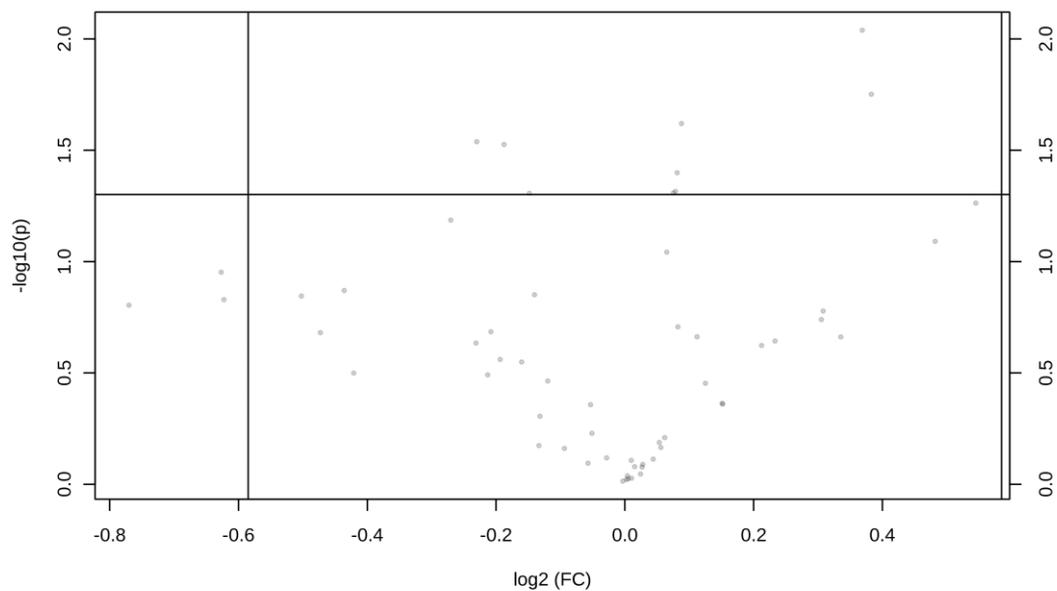


Figura 17 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar A. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Por outro lado, a análise da fração semi-polar B indicou uma redução significativa no teor de um composto nos morangos cultivados em condições de déficit hídrico 95% ETc (DH1) em relação aos morangos do grupo controle (Figura 18).

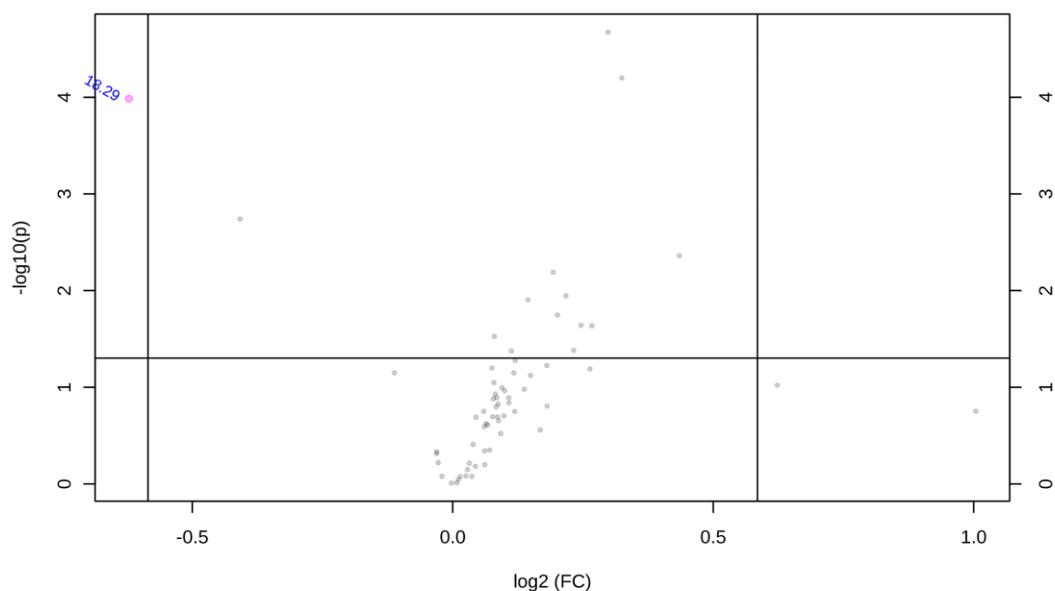


Figura 18 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH1 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar B. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Através da comparação do perfil de fragmentação da biblioteca NIST 11 e a base de dados online PubChem, o composto M^+ . m/z 426 com tempo de retenção de 18,29 minutos foi putativamente identificado como 29-metilisofucoesterol (Figura 19), pertence a classe dos fitoesteróis apresentando 89% de índice de similaridade e 2936 de índice de tempo de retenção. O teor de 29-metilisofucoesterol diminuiu em 34% nos morangos submetidos ao tratamento DH1 em relação ao grupo controle.

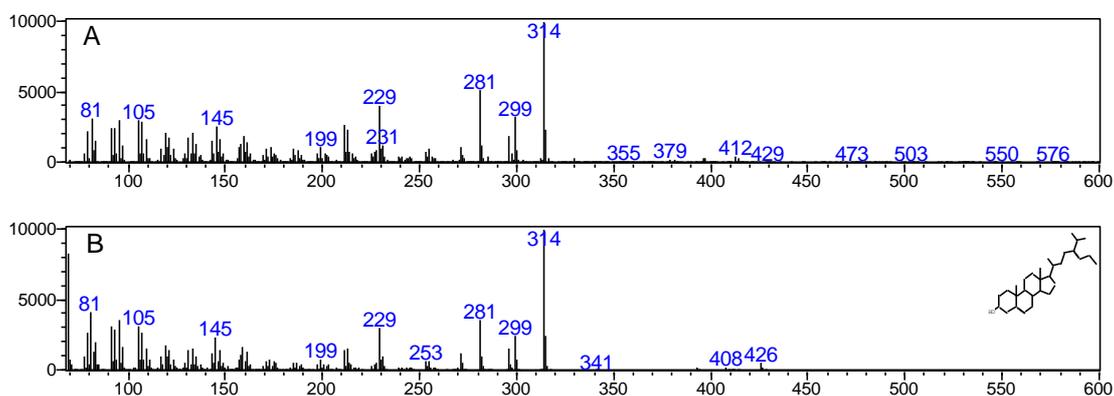


Figura 19 - Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do 29-metilisofucoesterol presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH1 analisado por GC-MS na fração semi-polar B.

Para os morangos do tratamento com déficit hídrico 85% ETc (DH2), analisados na fração semi-polar A, foi observado o aumento significativo no teor de um composto em relação aos morangos do grupo controle (Figura 20).

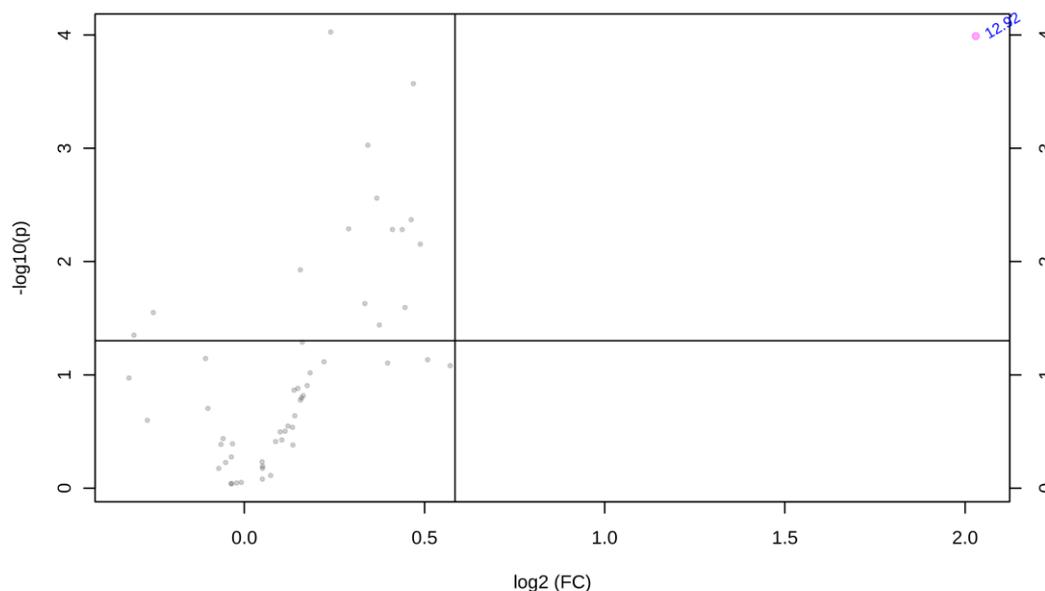


Figura 20 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar A. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

O composto M^+ m/z 540 com tempo de retenção de 12,92 minutos, foi putativamente identificado como D-frutose a partir da estrutura derivatizada D-(-)-frutofuranose, pentakis(trimetilsilil) éter (isômero 1) (Figura 21) com 95% de índice de similaridade e 2029 de índice de tempo de retenção. O teor de frutose aumentou em aproximadamente 73% nos morangos submetidos ao tratamento DH2 em relação ao grupo controle.

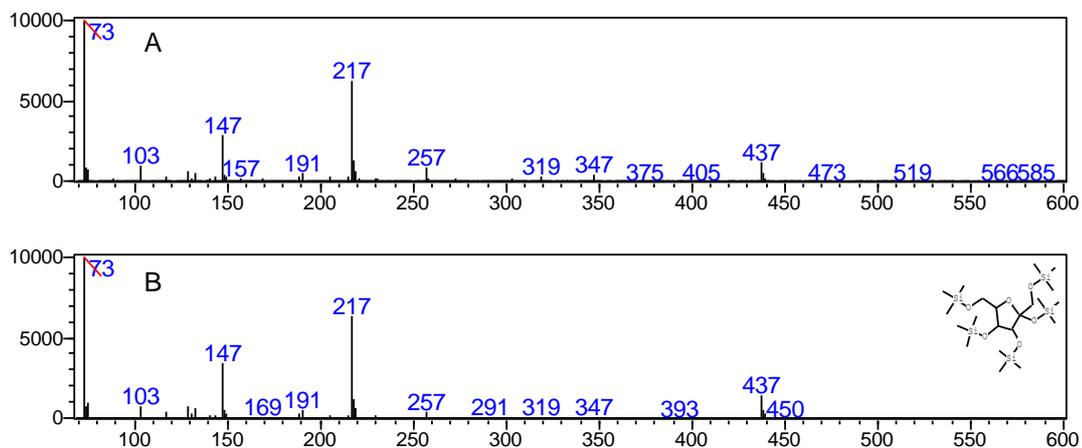


Figura 21 - Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) da D-(-)-frutofuranose presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar A.

Por outro lado, a análise da fração semi-polar B de morangos submetidos ao déficit hídrico 85% ETc (DH2), revelou o aumento significativo no teor de cinco compostos e a redução no teor de dois outros compostos em relação ao grupo controle (Figura 22).

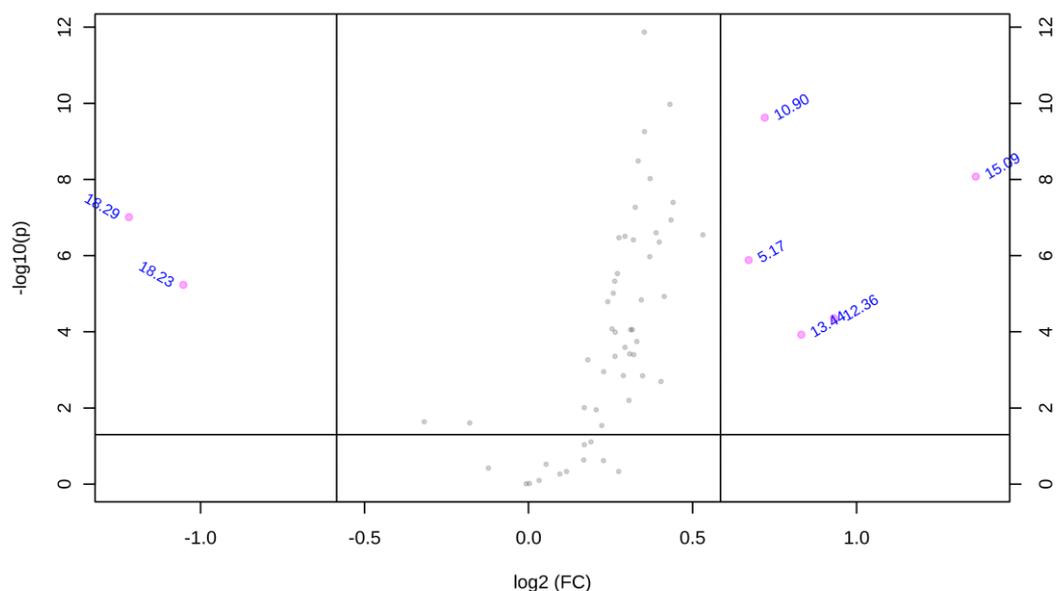


Figura 22 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento DH2 e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar B. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Os compostos que apresentaram regulação positiva nos morangos tratados com déficit hídrico 85% ETc (DH2) foram putativamente identificados como 2,4-dimetilbenzaldeído, 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione e hidrocarbonetos de cadeia longa (C20-C40). O composto 2,4-dimetilbenzaldeído (Figura 23) com M^+ m/z 134 e tempo de retenção de 5,17 minutos, apresentou 95% de índice de similaridade, 884 de índice de tempo de retenção e seu teor aumentou cerca de 44% nos morangos do tratamento DH2 em relação ao grupo controle.

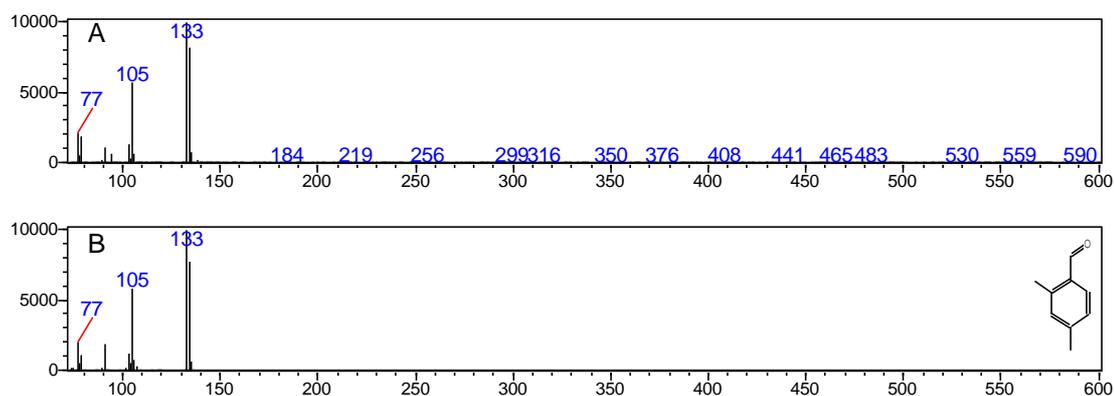


Figura 23 - Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do 2,4-dimetilbenzaldeído presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B.

O composto identificado como 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione (Figura 24) com M^+ m/z 276 e tempo de retenção de 10,90 minutos, apresentou 92% de índice de similaridade, 1567 de índice de tempo de retenção e seu teor aumentou cerca de 46% nos morangos do tratamento DH2 em relação ao grupo controle.

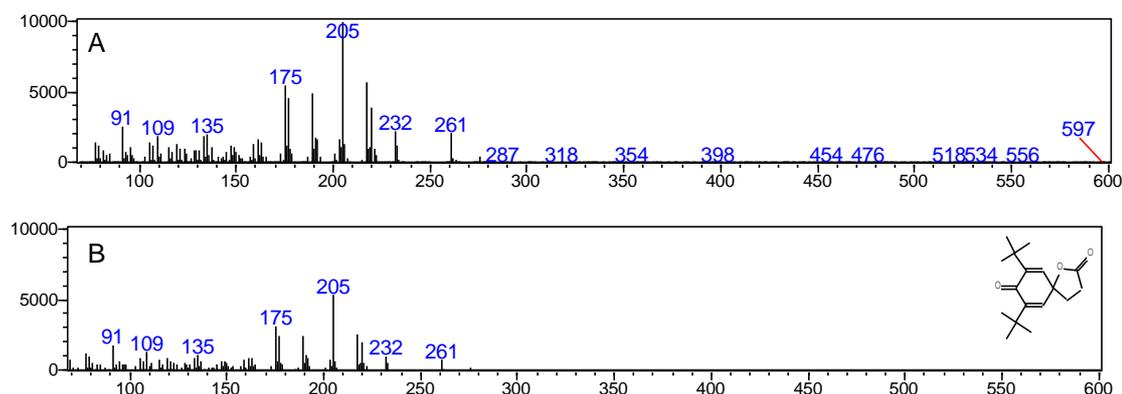


Figura 24 - Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B.

Os outros três compostos regulados positivamente no tratamento DH2 foram identificados como hidrocarbonetos de cadeia longa (C20-C40) (Figura 25). Os hidrocarbonetos apresentaram tempo de retenção de 12,36, 13,44 e 15,09 minutos e aumentaram cerca de 54%, 50% e 66%, respectivamente, nos morangos DH2 em relação ao grupo controle.

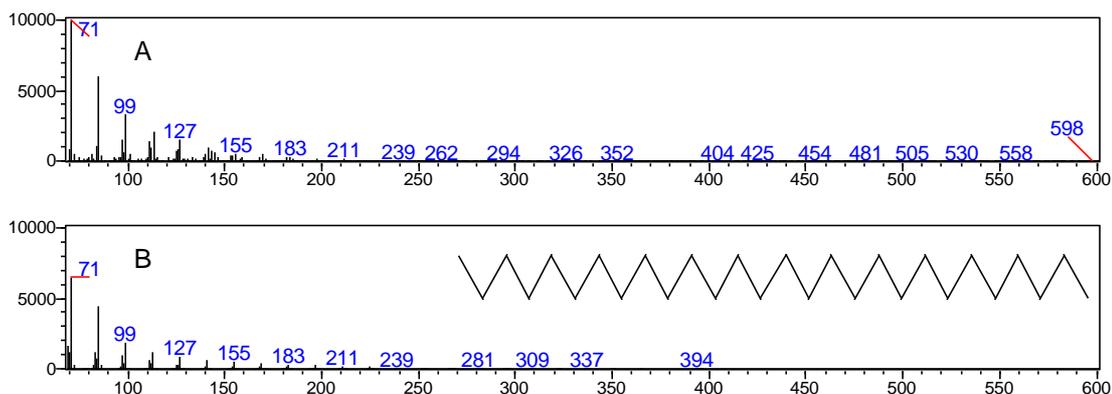


Figura 25 - Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) de hidrocarbonetos presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B..

Os compostos que apresentaram regulação negativa nos morangos tratados com déficit hídrico 85% ETc (DH2) foram putativamente identificados como γ -sitosterol e 29-metilisofucoesterol. O composto γ -sitosterol (Figura 26) com M^+ m/z 414 e tempo de retenção de 18,23 minutos, apresentou 90% de índice de similaridade, 2925 de índice de tempo de retenção e diminuiu cerca de 46% nos morangos DH2 em relação ao grupo controle. O composto 29-metilisofucoesterol diminuiu cerca de 52% nos morangos DH2 em relação ao grupo controle.

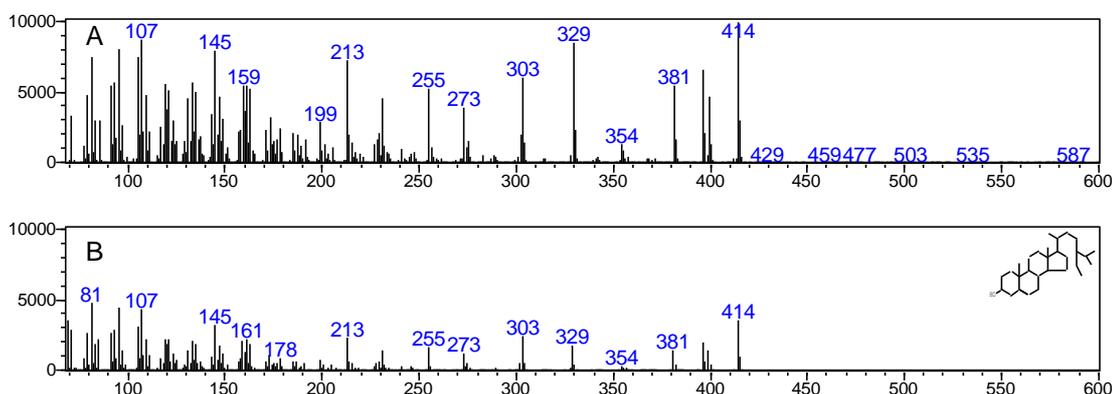


Figura 26 - Espectro de massas experimental (A) e teórico (B) do γ -sitosterol presente em morangos cv. Camarosa no tratamento DH2 analisado por GC-MS na fração semi-polar B.

Para os morangos do tratamento com excesso salino (ES), analisados na fração semi-polar A, não foram observadas diferenças significativas em relação aos morangos do grupo controle (Figura 27).

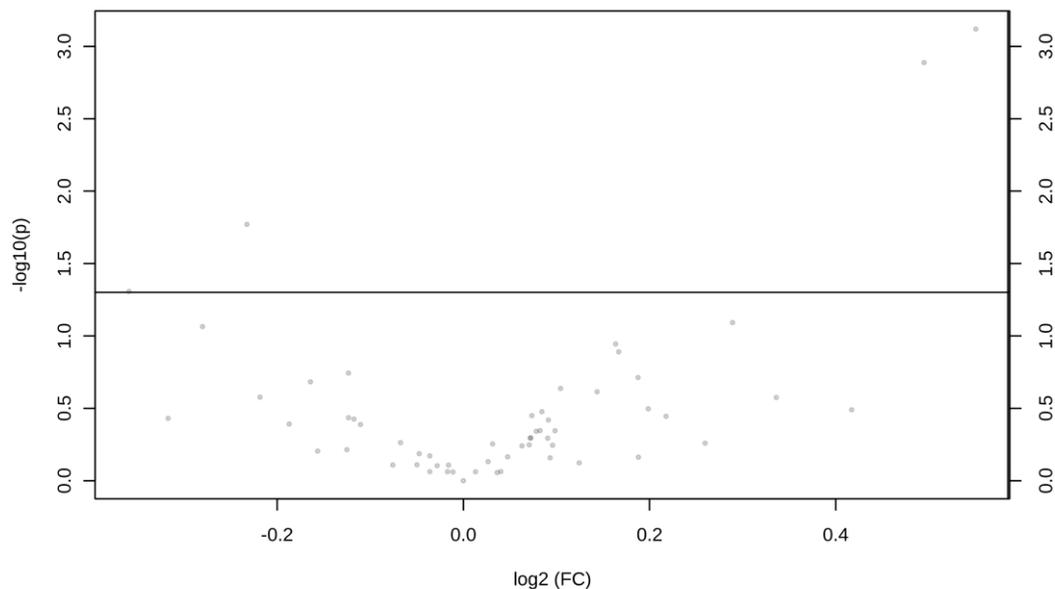


Figura 27 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar A. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Por outro lado, comparando os morangos submetidos ao excesso salino (ES) com morangos do grupo controle, analisados na fração semi-polar B, foi observado o aumento no teor de quatro compostos e o decréscimo significativo no teor de dois compostos (Figura 28).

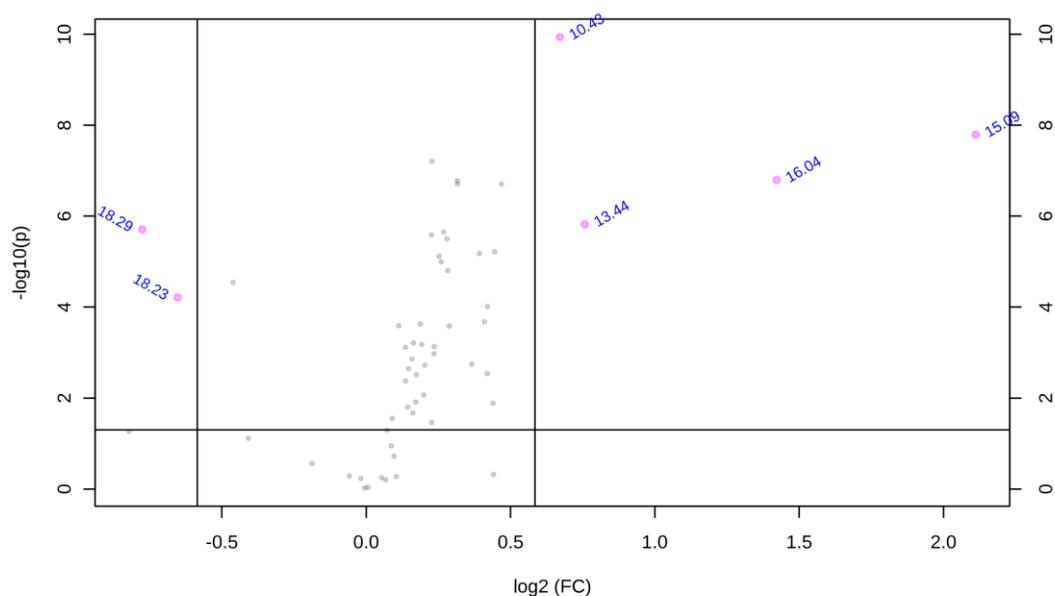


Figura 28 - Volcano Plot, usando Fold Change (valores positivos de $\log_2(\text{FC})$ indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste-t de Student ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para comparação entre o tratamento ES e grupo controle, analisados por GC-MS na fração semi-polar B. Os pontos vermelhos representam os metabólitos estatisticamente significativos.

Os compostos regulados positivamente foram os hidrocarbonetos de cadeia longa (C20-C40). Apresentaram tempo de retenção de 10,43, 13,44, 15,09 e 16,04 minutos e aumentaram cerca de 22%, 26%, 71% e 54%, respectivamente, nos morangos tratados com ES em relação ao grupo controle. Já os teores dos compostos γ -sitosterol e 29-metilisofucosterol foram reduzidos em 49% e 53%, respectivamente, nos morangos tratados com ES em relação ao grupo controle.

Nas tabelas 3 e 4 estão apresentadas as informações da análise univariada ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) e a identificação tentativa dos metabólitos que diferiram entre os tratamentos em relação ao grupo controle.

Tabela 3 - Metabólitos detectados por GC-MS que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos

Identificação tentativa	C vs DH1		C vs DH2		C vs ES	
	Log ₂ (FC)	p-valor	Log ₂ (FC)	p-valor	Log ₂ (FC)	p-valor
2,4-dimethylbenzaldehyde	-	-	0,67	1E ⁻⁶	-	-
hidrocarboneto	-	-	-	-	0,67	1E ⁻¹⁰
7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	-	-	0,72	2E ⁻¹⁰	-	-
hidrocarboneto	-	-	0,93	4E ⁻⁵	-	-
frutose, TMS	-	-	2,03	1E ⁻⁴	-	-
hidrocarboneto	-	-	0,83	1E ⁻⁴	0,75	1E ⁻⁶
hidrocarboneto	-	-	1,36	8E ⁻⁹	2,11	2E ⁻⁸
hidrocarboneto	-	-	-	-	1,42	2E ⁻⁷
γ -sitosterol	-	-	-1,05	6E ⁻⁶	-0,78	2E ⁻⁶
29-methylisofucosterol	-0,62	1E ⁻⁴	-1,22	9E ⁻⁸	-0,65	6E ⁻⁵

C: controle; DH1: 95% ETc déficit hídrico; DH2 85% ETc déficit hídrico; ES: excesso salino; Valores positivos de log₂(FC) indicam que os metabólitos aumentaram nos tratamentos DH1, DH2 e ES em relação ao controle e vice-versa. *p*-valor de acordo com teste-t de *Student*.

Tabela 4 - Identificação tentativa dos metabólitos que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$ e fold-change (FC) ≥ 1.5) entre os tratamentos na análise metabolômica não direcionada por GC-MS

Identificação tentativa*	TR (min)	m/z experimental	Formula molecular	Íons de referência	Índice de tempo de retenção**	Base de dados
2,4-dimethylbenzaldehyde	5,17	134	C ₉ H ₁₀ O	133 (100); 105 (60); 77 (23); 79 (20) M+ 134 (81)	884	61814
hidrocarboneto	10,43	-	-	71 (100); 85 (72); 99 (26); 83 (18)	1499	-
7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca- 6,9-diene-2,8-dione	10,90	276	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	205 (100); 217 (57); 175 (53); 189 (48) M+ 276 (4.72)	1567	545303
hidrocarboneto	12,36	-	-	71 (100); 85 (91); 82 (72); 99 (50)	1793	-
frutose, TMS	12,92	540	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	73 (100); 217 (63); 147 (29); 218 (13) M+ 540 (4)	2029	6427431
hidrocarboneto	13,44	-	-	85 (100); 71 (84); 99 (53); 113 (37)	1982	-
hidrocarboneto	15,09	-	-	71(100); 85 (78); 99 (49); 113 (31)	2287	-
hidrocarboneto	16,04	-	-	85 (100); 71 (84); 99 (53); 113 (37)	2480	-
γ -sitosterol	18,23	414	C ₂₉ H ₅₀ O	107(88); 329 (84); 95 (81); 145 (79) M+ 414 (100)	2925	457801
29-methylisofucoesterol	18,29	426	C ₃₀ H ₅₀ O	314 (100); 281 (50); 229 (39); 299 (32) M+ 426 (<1)	2936	6443745

*Biblioteca de espectro de massas NIST 2011, M+ Íon molecular, índice de similaridade acima de 85%; **FAMES C8-C24 (ésteres metílicos de ácidos graxos)

7 Discussão

As mudanças bioquímicas, moleculares e fisiológicas que ocorrem durante o processo de aclimação são determinadas pela condição imposta. Portanto, para cada situação estressora são ativadas rotas metabólicas e respostas específicas (MITTLER, 2006).

A análise direcionada realizada por PERIN et al. (2019), revelou alteração de ácido abscísico (ABA) e derivados, compostos fenólicos e genes associados a estas rotas biossintéticas nos morangos tratados com DH1, DH2 e ES. Utilizando análise metabolômica não direcionada, observou-se alteração dos compostos metilsiringina, ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico, β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose, ácido trans-cinâmico, D-(-)-frutofuranose, 2,4-dimetilbenzaldeído, 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione, hidrocarbonetos, fosfocolina, triptofano, 29-metilisofucosterol e γ -sitosterol nos tratamentos DH1, DH2 e ES. É possível que compostos de alta massa molecular, como polímeros de açúcares, peptídeos, proteínas ou mesmo espécies iônicas como metais sejam alterados em maior proporção. No entanto, alterações pontuais foram observadas e serão discutidas a seguir.

7.1.1 Alterações ocorridas em morangos cv. Camarosa submetidos ao déficit hídrico 95% ETc (DH1) analisados por metabolômica não direcionada

O composto metilsiringina cujo teor aumentou em morangos DH1 é um fenilpropanoide glicosilado. A metilsiringina já foi encontrada em casca de caule de *Styrax japonica* (Kim et al., 2007), erva-doce (*Foeniculum vulgare* Miller) (Kitajima et al., 1998) e frutas de amora-preta (*Morus alba*) (Park et al., 2017), sendo descrito como um composto potencialmente antioxidante. Em plantas, os compostos fenólicos, em sua maioria, apresentam-se na forma glicosilada para diminuir a toxicidade intracelular. Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes inibindo a produção de ROS e como sinalizadores de estresses bióticos e abióticos (BUCHANAN et al., 2015; GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011). O acúmulo de fenilpropanoides em morangos sob condições de estresse já foi evidenciado anteriormente (PERIN et al., 2019) e seu papel como marcador de resposta ao estresse pode estar associado na ativação de defesa da planta.

7.1.2 Alterações ocorridas em morangos cv. Camarosa submetidos ao déficit hídrico 85% ETc (DH2) analisados por metabolômica não direcionada

O composto ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico (Kdo), cujo teor foi maior no tratamento DH2 em relação do grupo controle, compreende à subclasse dos carboidratos e carboidratos conjugados. Sob exposição a estresses bióticos e abióticos, a composição da parede celular é alterada para manter as condições ótimas de funcionamento da célula, tecidos e órgãos. A pectina, constituinte da parede celular, é formada por três estruturas de polissacarídeos, homogalacturonana, ramnogalacturonana I (RI) e ramnogalacturonana II (RG II). A RG II, é considerada uma região conservada nos vegetais por conter em sua estrutura resíduos de açúcares raros ligados a borato diéster, dentre eles, ácido L-acérico, D-apiose, 2-O-metil L-fucose, ácido 3-deoxi-D-lyxo-heptulosônico (Dha) e Kdo. O Kdo já foi encontrado em *Arabidopsis thaliana* (DELMAS et al., 2008), polpa de beterraba (*Beta vulgaris*) (ISHII; MATSUNAGA, 1996), maçã (*Malus domestica*), cenoura (*Daucus carota*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (DOCO et al., 1997).

A exposição ao déficit hídrico promove o aumento na quantidade de cadeias laterais da pectina RG I e RG II determinando o grau de hidratação da parede celular (GALL et al., 2015; LEUCCI et al., 2008). Yang et al. (2015) ao estudarem o efeito de déficit hídrico e de excesso salino em folhas de amoreira (*Morus alba* L.) observaram que o gene *KdsA* (*2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase*) que codifica para a enzima Kdo-8-fosfato sintase apresentou expressão reduzida em relação ao controle, afetando a rota de biossíntese do Kdo, fundamental para o desenvolvimento das plantas (O'NEILL et al., 2004), sugerindo que a parede celular é afetada sob condições de estresses como forma de suportar a pressão osmótica.

Um acúmulo de D-frutose foi observado no tratamento com déficit hídrico 85% ETc. O mesmo comportamento foi observado em morangos que foram irrigados com 50, 100 e 200 mL de água por dia e apresentaram um aumento da frutose nos frutos irrigados com 50 mL (TERRY et al., 2007). Por outro lado, Adak et al. (2018) não observaram diferenças na concentração de frutose em quatro cultivares de morango submetidos ao déficit hídrico. Shen et al. (2017) ao avaliarem o efeito do ácido abscísico (ABA) exógeno e do déficit hídrico em cereja observaram que os frutos que foram submetidos a estes tratamentos apresentaram acúmulo de antocianinas e dos açúcares solúveis glicose, frutose e sorbitol quando

comparados ao controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Perin et al. (2019) sugerindo que a ativação da rota do ABA sob condições estressoras e a indução do acúmulo de frutose e de antocianinas pode melhorar a tolerância dos frutos frente a estresses abióticos (SHEN et al., 2017; SYED et al., 2016).

Quando os morangos foram submetidos ao déficit hídrico 85% ETc ocorreu um aumento no teor do 2,4-dimetilbenzaldeído em relação ao grupo controle. Este composto já foi encontrado nas raízes de *Eryngium amethystinum* L. (MATEJÍČ et al., 2018), óleo-resina de páprica (GUADAYOL et al., 1997), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (AL-HASHMI et al., 2013), suco de uva tinta (GONZÁLEZ-MAS et al., 2009) e mel oriundo de *Paliurus spina-christi* (JERKOVIĆ et al., 2009). São escassas as informações na literatura sobre o 2,4-dimetilbenzaldeído, no entanto, ele já foi encontrado em folhas de parreira (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) submetidas ao tratamento com déficit hídrico severo, porém não foram observadas diferenças em relação ao controle (Griesser et al., 2015).

A rota dos fenilpropanóides podem levar a formação de compostos benzênicos voláteis. Os aldeídos benzóicos, álcoois benzílicos e acetato de benzila são compostos voláteis sintetizados em mel, morangos, flores, entre outros (BOATRIGT et al., 2004; JERKOVIĆ et al., 2009; OLBRICHT et al., 2011). Os alcanos, assim como os aldeídos, cetonas e compostos aromáticos contribuem para o aroma de frutas. Neste estudo, foi observado um aumento significativo de hidrocarbonetos (alcanos) de cadeia longa (C20-C40) nos morangos submetidos aos tratamentos DH2 e ES.

Outro composto com poucas informações na literatura é o 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione que apresentou uma regulação positiva nos morangos submetidos ao tratamento DH2. Este composto já foi encontrado em flor de *Crataeva religiosa* (SHARMA et al., 2018), óleo essencial de água de coco amarelo (DA FONSECA et al., 2009), polpa de manga (LALEL et al., 2003), óleo essencial de casca de caule de *Cordia sebestena* (ADEOSUN et al., 2013) e casca de romã (BARATHIKANNAN et al., 2016). Sua presença também foi observada em óleos essenciais de folhas de duas espécies de goiaba cultivadas durante a época de seca e chuva. 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-dione é relatado na literatura como um fitoquímico com ação diurética e anti hipertensiva e também foi encontrado na composição de remédio utilizado na medicina para a

prevenção de asma e bronquite (CHINCHILLA et al., 2016; GROVER; PATNI, 2013; RAO et al., 2016).

O teor de β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose, que pertence à classe dos oligossacarídeos, diminuiu quando foi submetido ao tratamento DH2 em comparação ao grupo controle. Este composto foi encontrado nas mucilagens de raízes de *Abelmoschus manihot* M. (TOMODA et al., 1979) e *Hibiscus moscheutos* L. (TOMODA et al., 1986). As mucilagens são estruturas complexas de polissacarídeos formadas por L-arabinose, D-galactose, L-ramnose, D-xilose e ácido galacturônico ligados por ligações glicosídicas em diferentes proporções. Os grupos hidroxilas presentes nas mucilagens facilitam sua ligação com a água como forma de reserva (SEPÚLVEDA et al., 2007). Em estudos realizados por Perin et al. (2019) foi observada a diminuição da massa fresca nos morangos submetidos a este tratamento e isso pode estar relacionado ao baixo teor do composto β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose.

O teor de ácido trans-cinâmico, principal composto intermediário na rota dos fenilpropanóides, apresentou uma diminuição no tratamento DH2 em comparação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Sun et al. (2012) utilizando PEG (Polietilenoglicol) como indutor de estresse hídrico em que foi observada a diminuição do ácido cinâmico em folhas de pepino. Em morangos cv. Camarosa submetidos ao déficit hídrico 85% ETc os níveis de transcritos dos genes C4H1 e C4H2 (ácido cinâmico 4-hidrolase) aumentaram em relação ao grupo controle (PERIN et al., 2019) sugerindo que a diminuição do ácido cinâmico nos frutos sob escassez de água ocorreu pelo aumento da sua conversão em outros compostos da rota metabólica dos fenilpropanóides, induzindo o aumento da expressão da PAL (*phenylalanine ammonia lyase*) (PERIN et al., 2019) para intensificar o fluxo desta rota metabólica.

7.1.3 Alterações ocorridas em morangos cv. Camarosa submetidos ao excesso salino 80 mM NaCl (ES) analisados por metabolômica não direcionada

No tratamento ES o composto que apresentou maior acúmulo foi identificado como fosfocolina e compreende a classe dos glicerofosfolipídeos ou lipídeos de

membrana. Através do metabolismo de glicerofosfolipídeos são produzidos ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol e cardiolipina. A colina produzida pela desfosforilação da fosfocolina é utilizada como precursora para a síntese de compostos osmoprotetores, como a glicina betaína sugerindo que essa via metabólica atue em plantas como forma de proteção frente a estresses osmóticos, no entanto, a produção e/ou acúmulo de glicina betaína frente a estresse salino é dependente da espécie ou genótipo. Em plantas como espinafre, beterraba e trigo, o excesso salino induz o acúmulo de glicina betaína, já em *Arabidopsis thaliana* a produção não ocorre naturalmente. Mas é possível através de engenharia genética a produção de espécies capazes de acumular esse compostos com a finalidade de torná-las tolerantes a estresses abióticos (ASHRAF; FOOLAD, 2007; SUMMERS; WERETILNYK, 1993).

Em espinafre, as enzimas responsáveis pela produção de fosfocolina foram induzidas sob exposição ao excesso salino 100, 200 e 300 mM NaCl em relação ao controle. Já em *Arabidopsis*, a enzima CK (*choline kinase*) responsável pela fosforilação da colina em fosfocolina apresentou o dobro de atividade enzimática no tratamento com 200 mM NaCl, indicando que nesta espécie a via metabólica utilizada para produção de fosfatidilcolina é através da fosforilação, indicando que a ativação da via metabólica de fosfocolina é espécie-dependente (TASSEVA et al., 2004).

Em morangos submetidos a variações de temperatura durante o dia (18-30 °C) e noite (12-22 °C) foi observada uma elevação no teor dos lipídeos de membrana nas folhas, raízes e frutos de duas cultivares. As alterações que ocorrem na composição de lipídeos quando as plantas são expostas à fatores estressores alteram o metabolismo celular, podem aumentar a fluidez da membrana lipídica modificando a permeabilidade e o transporte de íons e solutos (WANG; LIN, 2006; WHITAKER, 2012). Dessa forma, sugere-se que sob condições de excesso salino, os lipídeos de membrana são modificados como forma de suportar a condição estressora.

O teor do aminoácido triptofano foi maior em morangos tratados com excesso salino quando comparados a morangos do grupo controle. O triptofano é um aminoácido essencial e é precursor do hormônio auxina (ácido indolacético – IAA), que regula o crescimento celular através do aumento da permeabilidade de

água intracelular, diminuição da pressão da membrana e indução da floração e frutificação. Embora seja um hormônio do crescimento, a auxina pode inibir ou promover o crescimento das raízes de acordo com a dose aplicada. A exposição ao excesso salino (50, 100 e 200 mM NaCl) durante a germinação de couve chinesa afetou negativamente o crescimento radicular das mudas. Nestes vegetais, o teor de auxina livre também foi dependente da dose aplicada, apresentou concentração 1,3 vezes maior na dose 200 mM NaCl do que o controle inibindo o crescimento das raízes. Por outro lado, o teor de triptofano diminuiu com o aumento das doses aplicadas (LEKSHMY et al., 2017; PAVLOVIĆ et al., 2018).

O teor do composto 29-metilsofucosterol foi reduzido nas frutas submetidas aos tratamentos DH1, DH2 e ES, já o teor de γ -sitosterol foi reduzido apenas nos tratamentos DH1 e ES em comparação aos morangos do grupo controle. Os fitoesteróis fazem parte da composição da bicamada lipídica das membranas, participam de processos metabólicos, são precursores para a síntese de hormônios, regulam a permeabilidade e fluidez da membrana e outras organelas e auxiliam na expansão e divisão celular (ABU-MURIEFAH, 2015; KUMAR et al., 2015). A hidroximetilglutaril-CoA (*HMG-CoA*) sintase é a principal enzima que regula a produção de fitosteróis na via do mevalonato e a superexpressão do gene *BjHMGS* de *Brassica juncea* em *Arabidopsis* induziu a expressão dos genes *HMGR*, *SMT2*, *DWF1*, *CYP710A1* promovendo resistência ao fungo *Botrytis cinerea* e tolerância a exposição ao peróxido de hidrogênio (WANG et al., 2012). Por outro lado, quando foi avaliado o efeito da desidratação e da aplicação de ABA e manitol na expressão do gene *BjHMGS* em mostarda castanha (*Brassica juncea*) foi observada uma diminuição no crescimento das sementes (ALEX et al., 2000).

Embora a via do mevalonato (MVA) responsável pela produção de ubiquinona, esteróis e sesquiterpenos e a via do metileritrol fosfato (MEP) responsável pela produção de ABA, ácido giberélico (GA), monoterpenos e carotenoides, ocorram de forma independente, há evidências de que ambas se conectam nos processos metabólicos (LAULE et al., 2003; WANG et al., 2012). O que pode explicar a redução dos fitosteróis encontrados nos tratamentos com déficit hídrico e excesso salino, uma vez que foi induzida a produção de ABA nestes tratamentos (PERIN et al., 2019).

8 Conclusão

A utilização da estratégia de análise metabolômica não direcionada, possibilitou identificar compostos dos metabolismos geral e especializado alterados pelos tratamentos DH1, DH2 e ES. O acúmulo de metilsiringina, de um dissacarídeo, ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico, fosfocolina, triptofano, frutose, 2,4-dimetilbenzaldeído, 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione e hidrocarbonetos e a redução de β -D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galacturonopiranosil-(1 \rightarrow 2)-L-ramnose, ácido trans-cinâmico, 29-metilisofucosterol e γ -sitosterol podem estar envolvidos na regulação das respostas metabólicas às condições estressoras.

As informações obtidas neste estudo podem contribuir para o melhor entendimento das vias metabólicas que são ativadas sob condições estressoras e que podem, possivelmente, indicarem compostos marcadores de estresses.

Referências

- ABU-MURIEFAH, S. S. Effect of sitosterol on growth, metabolism and protein pattern of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants grown under salt stress conditions. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 8, n. 2, p. 94–106, 2015.
- ADAK, N.; GUBBUK, H.; TETIK, N. Yield, quality and biochemical properties of various strawberry cultivars under water stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 304–311, 2018.
- ADEOSUN, C. B.; OLASEINDE, S.; OPEIFA, A. O.; ATOLANI, O. Essential oil from the stem bark of *Cordia sebestena* scavenges free radicals. **Journal of Acute Medicine**, v. 3, n. 4, p. 138–141, 2013.
- AKHATOU, I.; RECAMALES, Á. F. Influence of cultivar and culture system on nutritional and organoleptic quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 5, p. 866–875, 2014.
- AL-HASHMI, L. S.; HOSSAIN, M. A.; WELI, A. M.; AL-RIYAMI, Q.; AL-SABAHI, J. N. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of different organic crude extracts from the local medicinal plant of *Thymus vulgaris* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 69–73, 2013.
- AL-SHORAF, W.; MAHADEEN, A.; AL-ABSI, K. Evaluation for salt stress tolerance in two strawberry cultivars. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 9, n. 3, p. 334–341, 2014.
- ALEX, D.; BACH, T. J.; CHYE, M. L. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive. **Plant Journal**, v. 22, n. 5, p. 415–426, 2000.
- ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, p. 156-161, 2013.
- ARANHA, B. C.; HOFFMANN, J. F.; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. Untargeted metabolomic analysis of *Capsicum* spp. by GC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 439–447, 2017.
- ARBONA, V.; MANZI, M.; OLLAS, C.; GÓMEZ-CADENAS, A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4885–4911, 2013.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206–216, 2007.
- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523–3544, 2012.

BARATHIKANNAN, K.; VENKATADRI, B.; KHUSRO, A.; AL-DHABI, N. A.; AGASTIAN, P.; ARASU, M. V.; CHOI, H. S.; KIM, Y. O. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 264, n. 16, p. 1–10, 2016.

BLANKE, M. M.; COOKE, D. T. Effects of flooding and drought on stomatal activity, transpiration, photosynthesis, water potential and water channel activity in strawberry stolons and leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 2, p. 153–160, 2004.

BOATRRIGHT, J.; NEGRE, F.; CHEN, X.; KISH, C. M.; WOOD, B.; PEEL, G.; ORLOVA, I.; GANG, D.; RHODES, D.; DUDAREV, N. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1993–2011, 2004.

BROSCHÉ, M.; VINOCUR, B.; ALATALO, E. R.; LAMMINMÄKI, A.; TEICHMANN, T.; OTTOW, E. A.; DJILIANOV, D.; AFIF, D.; BOGEAT-TRIBOULOT, M. B.; ALTMAN, A.; POLLE, A.; DREYER, E.; RUDD, S.; PAULIN, L.; AUVINEN, P.; KANGASJÄRVI, J. Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. **Genome Biology**, v. 6, n. 12, 2005.

BUCHANAN, BOB B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2015. 1283 p.

CABANE, M.; AFIF, D.; HAWKINS, S. Lignins and abiotic stress. In: JOUANIN, L.; LAPIERRE C. **Advances in botanical research. Lignins: biosynthesis, biodegradation and bioengineering**. Reino Unido: Academic Press, 2012. p. 220–249.

CASTILLO, S.; GOPALACHARYULU, P.; YETUKURI, L.; OREŠIČ, M. Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 108, n. 1, p. 23–32, 2011.

CASTRO-PUYANA, M.; HERRERO, M. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 74–87, 2013.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; REYES-DE-CORCUERA, J. I.; ETXEBERRIA, E.; DANYLUK, M.D.; RODRICK, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 11–12, p. 557–566, 2009.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.

CHEN, H.; JIANG, J.-G. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. **Environmental Reviews**, v. 18, p. 309–319, 2010.

CHINCHILLA, F. G.; VILLEGAS, E.; MOLINA, A.; ARIAS, C. Composition, chemical fingerprinting and antimicrobial assessment of Costa Rican cultivated guavas

(*Psidium friedrichsthalianum* (o. berg) nied. and *Psidium guajava* L.) essential oils from leaves and fruits. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 04, n. 06, 2016.

CLASQUIN, M. F.; MELAMUD, E.; RABINOWITZ, J. D. LC-MS data processing with MAVEN: A metabolomic analysis and visualization engine. **Curr Protoc Bioinformatics**, 2014. DOI: 10.1002/0471250953.bi1411s37.

CORRALES, A. R.; CARRILLO, L.; LASIERRA, P.; NEBAUER, S. G.; DOMINGUEZ-FIGUEROA, J.; RENAUMORATA, B.; POLLMANN, S.; GRANELL, A.; MOLINA, R. V.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; MEDINA, J. Multifaceted role of cycling DOF factor 3 (CDF3) in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell and Environment**, v. 40, n. 5, p. 748–764, 2017.

CRAMER, G. R.; ERGÜL, A.; GRIMPLET, J.; TILLET, R. L.; TATTERSALL, E. A. R.; BOHLMAN, M. C.; VINCENT, D.; SONDEREGGER, J.; EVANS, J.; OSBORNE, C.; QUILICI, D.; SCHLAUCH, K. A.; SCHOOLEY, D. A.; CUSHMAN, J. C. Water and salinity stress in grapevines: Early and late changes in transcript and metabolite profiles. **Functional and Integrative Genomics**, v. 7, n. 2, p. 111–134, 2007.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

D'URSO, G.; D'AQUINO, L.; PIZZA, C.; MONTORO, P. Integrated mass spectrometric and multivariate data analysis approaches for the discrimination of organic and conventional strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) crops. **Food Research International Journal**, v. 77, p. 264–272, 2015.

DA FONSECA, A. M.; BIZERRA, A. M. C.; DE SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q.; DE OLIVEIRA, M. D. C. F.; DE MATTOS, M. C.; CORDELL, G. A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 193–198, 2009.

DAI, A. H.; NIE, Y. X.; YU, B.; LI, Q.; LU, L. Y.; BAI, J. G. Cinnamic acid pretreatment enhances heat tolerance of cucumber leaves through modulating antioxidant enzyme activity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 79, p. 1–10, 2012.

DAI, Z. W.; LÉON, C.; FEIL, R.; LUNN, J. E.; DELROT, S.; GOMÈS, E. Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1345–1355, 2013.

DARNELL, R. L. Strawberry growth and development. In: CHILDERS, N. F. **The strawberry: A book for growers, others**. Gainesville: Dr. Norman F. Childers Publication, 2003, p 3-9.

DE LIVERA, A. M.; DIAS, D. A.; DE SOUZA, D.; RUPASINGHE, T. PYKE, J.; TULL, D.; ROESSNER, U.; MCCONVILLE, M.; SPEED, T. P. Normalizing and integrating metabolomics data. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 24, p. 10768–10776, 2012.

DE SOUZA, L. P.; NAAKE, T.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R. From chromatogram to analyte to metabolite. How to pick horses for courses from the massive web resources for mass spectral plant metabolomics. **GigaScience**, v. 6, n. 7, p. 1–20, 2017.

DE VOS, R. C. H.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J. B.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 778–791, 2007.

DOCO, T.; WILLIAMS, P.; VIDAL, S.; PELLERIN, P. Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. **Carbohydrate Research**, v. 297, p. 181–186, 1997.

DELMAS, F.; SÉVENO, M.; NORTHEY, J. G. B.; HERNOULD, M.; LEROUGE, P.; MCCOURT, P.; CHEVALIER, C. The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 10, p. 2639–2647, 2008.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 1, p. 51–78, 2007.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D.; BEGLEY, P.; ZELENKA, E.; FRANCIS-MCINTYRE, S.; ANDERSON, N.; BROWN, M.; KNOWLES, J. D.; HALSALL, A.; HASELDEN, J. N.; NICHOLLS, A. W.; WILSON, I. D.; KELL, D. B.; GOODACRE, R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 6, n. 7, p. 1060–1083, 2011.

ESALQ: Normas de classificação – Morango. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/cprural/informacoes/mostra/232>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

FAGHERAZZI, A. F.; GRIMALDI, F.; KRETZSCHMAR, A. A.; MOLINA, A. R.; GONÇALVES, M. A.; ANTUNES, L. E.C.; BARUZZI, G.; RUFATO, L. Strawberry production progress in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 1156, p. 937–940, 2017.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization. Production crops and all area groups. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185–212, 2009.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

FIEHN, O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 114, p. 30.4.1-30.4.32, 2017.

GALL, H.; PHILIPPE, F.; DOMON, J. M.; GILLET, F.; PELLOUX, J.; RAYON, C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. **Plants**, v. 4, n. 1, p. 112–166, 2015.

GALLI, V.; MESSIAS, R. S.; PERIN, E. C.; BOROWSKI, J. M.; BAMBERG, A. L.; ROMBALDI, C. V. Mild salt stress improves strawberry fruit quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 693–699, 2016.

GALLI, V.; MESSIAS, R. S.; GUZMAN, F.; PERIN, E. C.; MARGIS, R.; ROMBALDI, C. V. Transcriptome analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum**, v. 1, p. 1, 2018.

GHADERI, N.; SIOSEMARDEH, A. Response to drought stress of two strawberry cultivars (cv. Kurdistan and Selva). **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 6–12, 2011.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 31, p. 6697–6703, 2011.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GINÉ-BORDONABA, J.; TERRY, L. A. Effect of deficit irrigation and methyl jasmonate application on the composition of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit and leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 199, p. 63–70, 2016.

GINÉ-BORDONABA, J.; TERRY, L. A. Manipulating the taste-related composition of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) from different cultivars using deficit irrigation. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1020–1026, 2010.

GONG, Q.; LI, P.; MA, S.; RUPASSARA, S. I.; BOHNERT, H. J. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 44, n. 5, p. 826–839, 2005.

GONG, Y.; RAO, L.; YU, D. Abiotic stress in plants. **IntechOpen**, DOI: 10.5772/55865. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/agricultural-chemistry/abiotic-stress-in-plants>>. Acesso em: 21 ago. 2018.

GONZÁLEZ-MAS, M. C.; GARCÍA-RIAÑO, L. M.; ALFARO, C.; RAMBLA, J. L.; PADILLA, A. I.; GUTIERREZ, A. Headspace-based techniques to identify the principal volatile compounds in red grape cultivars. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 510–518, 2009.

GORROCHATEGUI, E.; JAUMOT, J.; LACORTE, S.; TAULER, R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425–442, 2016.

GOWDA, H.; IVANISEVIC, J.; JOHNSON, C. H.; KURCZY, M. E.; BENTON, H. P.; RINEHART, D.; NGUYEN, T.; RAY, J.; KUEHL, J.; AREVALO, B.; WESTENSKOW, P. D.; WANG, J.; ARKIN, A. P.; DEUTSCHBAUER, A. M.; PATTI, G. J.; SIUZDAK, G. Interactive XCMS online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 6931–6939, 2014.

GRIESSER, M.; WEINGART, G.; SCHOEDL-HUMMEL, K.; NEUMANN, N.; BECKER, M.; VARMUZA, K. Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 88, p. 17–26, 2015.

GROVER, N.; PATNI, V. Phytochemical characterization using various solvent extracts and GC-MS analysis of methanolic extract of *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz. leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 291–295, 2013.

GUADAYOL, J. M.; CAIXACH, J.; RIBÉ, J.; CABAÑAS, J.; RIVERA, J. Extraction, separation and identification of volatile organic compounds from paprika oleoresin (Spanish type). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1868–1872, 1997.

GULEN, H.; ERIS, A. Some physiological changes in strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Camarosa') plants under heat stress. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 894–898, 2003.

HALKET, J. M.; WATERMAN, D.; PRZYBOROWSKA, A. M.; PATEL, R. K. P.; FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 219–243, 2005.

HERRERO, M.; SIMÓ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, p. 49–69, 2012.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: Principles and Applications**. 3.ed. Inglaterra: Wiley, 2007.

HOFFMANN, J. F.; CARVALHO, I. R.; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. *Butia* spp. (*Arecaceae*) LC-MS-based metabolomics for species and geographical origin discrimination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 523–532, 2017.

HONG, J.; YANG, L.; ZHANG, D.; SHI, J. Plant metabolomics: An indispensable system biology tool for plant science. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 767, 2016.

HU, C.; SHI, J.; QUAN, S.; CUI, B.; KLEESSEN, S.; NIKOLOSKI, Z.; TOHGE, T.; ALEXANDER, D.; GUO, L.; LIN, H.; WANG, J.; CUI, X.; RAO, J.; LUO, Q.; ZHAO, X. FERNIE, A. R.; ZHANG, D. Metabolic variation between *japonica* and *indica* rice cultivars as revealed by non-targeted metabolomics. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5067, p. 5067, 2014.

HU, C.; XU, G. Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 36–46, 2013.

HUSAINI, A. M.; ZAKI, F. A. Strawberries: A general account. In: HUSAINI, A. M.; NERI, D. **Strawberry: Growth, development and diseases**. Ingleterra: CABI, 2016, p. 1–4.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 284, p. 1–9, 1996.

JANDRIĆ, Z.; ROBERTS, D.; RATHOR, M. N.; ABRAHIM, J. A.; ISLAM, M.; CANNAVAN, A. Assessment of fruit juice authenticity using UPLC-QToF MS: A metabolomics approach. **Food Chemistry**, v. 148, p. 7–17, 2014.

JERKOVIĆ, I.; TUBEROSO, C. I. G.; MARIJANOVIĆ, Z.; JELIĆ, M.; KASUM, A. Headspace, volatile and semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 239–245, 2009.

JOHNSON, H. E.; BROADHURST, D.; GOODACRE, R.; SMITH, A. R. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 919–928, 2003.

KALING, M.; KANAWATI, B.; GHIRARDO, A.; ALBERT, A.; WINKLER, J. B.; HELLER, W.; BARTA, C.; LORETO, F.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; SCHNITZLER, J. P. UV-B mediated metabolic rearrangements in poplar revealed by non-targeted metabolomics. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, n. 5, p. 892–904, 2015.

KÅRLUND, A.; MOOR, U.; MCDOUGALL, G.; LEHTONEN, M.; KARJALAINEN, R. O.; HANHINEVA, K. Metabolic profiling discriminates between strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars grown in Finland or Estonia. **Food Research International**, v. 89, p. 647–653, 2016.

KESICI, M.; GULEN, H.; ERGIN, S.; TURHAN, E.; IPEK, A.; OKSAL, N. Heat-stress tolerance of some strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 244, 2018.

KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Modifications of strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 4066–4072, 2007.

KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1413–1420, 2008a.

- KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Contribution of amino acids to strawberry fruit quality and their relevance as stress indicators under NaCl salinity. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 642–647, 2008b.
- KIM, M. R.; HYUN, T. M.; DONG, G. L.; WOO, E. A new lignan glycoside from the stem bark of *Styrax japonica* S. et Z. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 4, p. 425–430, 2007.
- KIM, S.; KIM, J.; YUN, E. J.; KIM, K. H. Food metabolomics: From farm to human. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 16–23, 2016.
- KITAJIMA, J.; ISHIKAWA, T.; TANAKA, Y.; ONO, M.; ITO, Y.; NOHARA, T. Water-soluble constituents of fennel. V. glycosides of aromatic compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1587–1590, 1998.
- KLAMKOWSKI, K.; TREDER, W. Response to drought stress of three strawberry cultivars grown under greenhouse conditions. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 16, p. 179–188, 2008.
- KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; GREEF, J. V. D.; TAS, A. C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 307–328, 2011.
- KUMAR, M. S. S.; ALI, K.; DAHUJA, A.; TYAGI, A. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 83–89, 2015.
- LALEL, H. J. D.; SINGH, Z.; TAN, S. C. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of “Kensington Pride” mango fruit at different stages of maturity. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, n. 2, p. 205–218, 2003.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.
- LAULE, O.; FURHOLZ, A.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; WANG, X.; HEIFETZ, P. B.; GRUISSEM, W.; LANGE, B. M. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **PNAS**, v. 100, n. 11, p. 6866–6871, 2003.
- LEKSHMY, S.; KRISHNA, G. K.; JHA, S. K.; SAIRAM, R. K. Mechanism of auxin mediated stress signaling in plants. In: PANDEY, G. K. **Mechanism of plant hormone signaling under stress**, New Jersey: Wiley Blackwell, 2017, p. 37–46.
- LEUCCI, M. R.; LENUCCI, M. S.; PIRO, G.; DALESSANDRO, G. Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 11, p. 1168–1180, 2008.
- LICHTENTHALER, H. K. The stress concept in plants: An introduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 187–198, 1998.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: A primer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 274–284, 2017.

MATEJIĆ, J. S.; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. Z.; RISTIĆ, M. S.; VESELINOVIĆ, J. B.; ZLATKOVIĆ, B. K.; MARIN, P. D.; DŽAMIĆ, A. M. Chemical characterization, in vitro biological activity of essential oils and extracts of three *Eryngium* L. species and molecular docking of selected major compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 8, p. 2910–2925, 2018.

MIRÁS-AVALOS, J. M.; INTRIGLIOLO, D. S. Grape composition under abiotic constraints: Water stress and salinity. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 851, 2017.

MADAIL, J. C. M. Panorama econômico. In: ANTUNES, L. E. C.; JÚNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2016, p. 17–32.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, 2006.

MOCO, S.; BINO, R. J.; DE VOS, R. C. H.; VERVOORT, J. Metabolomics technologies and metabolite identification. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 855–866, 2007.

MOING, A.; RENAUD, C.; GAUDILLÈRE, M.; RAYMOND, P.; ROUDEILLAC, P.; DENOYES-ROTHAN, B. Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 126, n. 4, p. 394–403, 2001.

MONTI, L. L. BUSTAMANTE, C. A. OSORIO, S.; GABILONDO, J.; BORSANI, J.; LAUXMANN, M. A.; MAULIÓN, E.; VALENTINI, G.; BUDDE, C. O.; FERNIE, A. R.; LARA, M. V.; DRINCOVICH, M. F. Metabolic profiling of a range of peach fruit varieties reveals high metabolic diversity and commonalities and differences during ripening. **Food Chemistry**, v. 190, p. 879–888, 2016.

MUSHTAQ, M. Y.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; WILSON, E. G. Extraction for metabolomics: Access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 291–306, 2014.

O'NEILL, M. A.; ISHII, T.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 109–139, 2004.

OKAZAKI, Y.; SAITO, K. Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2012.

OLBRICHT, K.; ULRICH, D.; WEISS, K.; GRAFE, C. Variation in the amounts of selected volatiles in a model population of *Fragaria x ananassa* Duch. as influenced

by harvest year. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 944–952, 2011.

OLIVEIRA, A. B. DE; ALENCAR, N. L. M.; GOMES-FILHO, E. Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. **IntechOpen**, DOI: 10.5772/54223. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/responses-of-organisms-to-water-stress/comparison-between-the-water-and-salt-stress-effects-on-plant-growth-and-development>>. Acesso em: 08 abr. 2018.

OLIVEIRA, A. C. B. Melhoramento genético e principais cultivares. In: ANTUNES, L. E. C.; JÚNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2016, p. 135–145.

OMS-OLIU, G.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; VAN DE POEL, B.; AMPOFO-ASIAMA, J.; GEERAERD, A. H.; NICOLAI, B. M. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, n. 1, p. 7–16, 2011.

PADULA, M. C.; LEPORE, L.; MILELLA, L.; OVESNA, J.; MALAFRONTI, N.; MARTELLI, G.; DE TOMMASI, N. Cultivar based selection and genetic analysis of strawberry fruits with high levels of health promoting compounds. **Food Chemistry**, v. 140, n. 4, p. 639–646, 2013.

PARK, Y. J.; SEONG, S. H.; KIM, M. S.; SEO, S. W.; KIM, M. R.; KIM, H. S. High-throughput detection of antioxidants in mulberry fruit using correlations between high-resolution mass and activity profiles of chromatographic fractions. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 108, 2017.

PAVLOVIĆ, I.; PĚNČÍK, A.; NOVÁK, O.; VUJČIĆ, V.; BRKANAC, S. R.; LEPEDUŠ, H.; STRNAD, M.; SALOPEK-SONDI, B. Short-term salt stress in *Brassica rapa* seedlings causes alterations in auxin metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 125, p. 74–84, 2018.

PERIN, E. C.; MESSIAS, R. S.; BOROWSKI, J. M.; CRIZEL, R. L.; SCHOTT, I. B.; CARVALHO, I. R.; ROMBALDI, C. V.; GALLI, V. ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. **Food Chemistry**, v. 271, p. 516–526, 2019.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19–34, 2009.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; OREŠIČ, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 395, 2010.

PUTRI, S. P.; YAMAMOTO, S.; TSUGAWA, H.; FUKUSAKI, E. Current metabolomics: Technological advances. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 9–16, 2013.

RAO, M. R. K.; RAVI, A.; NARAYANAN, S.; PRABHU, K.; KALAISELVI, V. S.; DINAKAR, S.; RAJAN, G.; KOTTEESWARAN, N. Antioxidant study and GC MS analysis of an ayurvedic medicine 'Talisapatradi Choornam'. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 36, n. 1, p. 158–166, 2016.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 738 p.

RECAMALES, Á. F.; MEDINA, J. L.; HERNANZ, D. Physicochemical characteristics and mineral content of strawberries grown in soil and soilless system. **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 5, p. 837–853, 2007.

RIPOLL, J.; URBAN, L.; STAUDT, M.; LOPEZ-LAURI, F.; BIDEL, L. P. R.; BERTIN, N. Water shortage and quality of fleshy fruits-making the most of the unavoidable. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 15, p. 4097–4117, 2014.

ROCHA, M.; LICAUSI, F.; ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESE, A.; SODEK, L.; FERNIE, A. R.; DONGEN, J. T. V. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, p. 1501–1513, 2010.

SACCENTI, E.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A.; HENDRIKS, M. M. W. B. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, v. 10, n. 3, p. 361–374, 2014.

SAITO, K.; MATSUDA, F. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 463–489, 2010.

SCALBERT, A.; BRENNAN, L.; FIEHN, O.; HANKEMEIER, T.; KRISTAL, B. S.; VAN OMMEN, B.; PUJOS-GUILLOT, E.; VERHEIJ, E.; WISHART, D.; WOPEREIS, S. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. **Metabolomics**, v. 5, n. 4, p. 435–458, 2009.

SEPÚLVEDA, E.; SÁENZ, C.; ALIAGA, E.; ACEITUNO, C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. **Journal of Arid Environments**, v. 68, p. 534–545, 2007.

SEVERO, J.; DE OLIVEIRA, I. R.; BOTT, R.; LE BOURVELLEC, C.; RENARD, C. M. G. C.; PAGE, D.; CHAVES, F. C.; ROMBALDI, C. V. Preharvest UV-C radiation impacts strawberry metabolite content and volatile organic compound production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 390–393, 2017.

SHARMA, S.; MISHRA, P.; PATNI, V. Analysis of volatile constituents in normal flower and insect induced flower gall of *Crataeva religiosa*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 1, p. 2667–2673, 2018.

SHEN, X.; GUO, X.; ZHAO, D.; ZHANG, Q.; JIANG, Y.; WANG, Y.; PENG, X.; WEI, Y.; ZHAI, Z.; ZHAO, W.; LI, T. Cloning and expression profiling of the *PacSnRK2*

and *PacPP2C* gene families during fruit development, ABA treatment, and dehydration stress in sweet cherry. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 119, p. 275–285, 2017.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 2, p. 199–208, 2008.

SINGH, R.; GUPTA, P.; KHAN, F.; SINGH, S. K.; SANCHITA; MISHRA, T.; KUMAR, A.; DHAWAN, S. S.; SHIRKE, P. A. Modulations in primary and secondary metabolic pathways and adjustment in physiological behaviour of *Withania somnifera* under drought stress. **Plant Science**, v. 272, p. 42–54, 2018.

SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M. H.; BEGER, R.; DAYKIN, C. A.; FAN, T. W. M.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.; HANKEMEIER, T.; HARDY, N.; HARNLY, J.; HIGASHI, R.; KOPKA, J.; LANE, A. N.; LINDON, J. C.; MARRIOTT, P.; NICHOLLS, A. W.; REILY, M. D.; THADEN, J. J.; VIANT, M. R. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2013.

SUN, W. J.; NIE, Y. X.; GAO, Y.; DAI, A.; BAI, J. G. Exogenous cinnamic acid regulates antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 2, p. 641–655, 2012.

SYED, N. H.; PRINCE, S. J.; MUTAVA, R. N.; PATIL, G.; LI, S.; CHEN, W.; BABU, V.; JOSHI, T.; KHAN, S.; NGUYEN, H. T. Core clock, *SUB1*, and *ABAR* genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 22, p. 7129–7149, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 722p.

TASSEVA, G.; RICHARD, L.; ZACHOWSKI, A. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v. 566, p. 115–120, 2004.

TAUTENHAHN, R.; PATTI, G. J.; RINEHART, D.; SIUZDAK, G. XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 11, p. 5035–5039, 2012.

TERRY, L. A.; CHOPE, G. A.; GINÉ BORDONABA, J. Effect of water deficit irrigation and inoculation with *Botrytis cinerea* on strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10812–10819, 2007.

TOMODA, M.; SHIMADA, K.; SHIMIZU, N.; KANARI, M.; KANEKO, E. The carbohydrate structure of a mucilage from the roots of *Hibiscus moscheutos* L. **Carbohydrate Research**, v. 151, p. 29–35, 1986.

TOMODA, M.; SUZUKI, T.; SATOH, N. Partial hydrolysis of *Abelmoschus*-mucilage M and the structural features of its polysaccharide moiety. **Chemical and**

Pharmaceutical Bulletin, v. 27, n. 7, p. 1651–1656, 1979.

TUBEROSA, R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1–27, 2012.

TURHAN, E.; ERIS, A. Changes of micronutrients, dry weight, and chlorophyll contents in strawberry plants under salt stress conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 36, n. 7–8, p. 1021–1028, 2005.

TURHAN, E.; ERIS, A. Changes of growth, amino acids, and ionic composition in strawberry plants under salt stress conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 40, n. 21–22, p. 3308–3322, 2009.

TURNER, N. C.; WRIGHT, G. C.; SIDDIQUE, K. H. M. Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. In: SPARKES, D. **Advances in Agronomy**. Reino Unido: Academic Press, v. 71, 2001, p. 193–217.

URANO, K.; MARUYAMA, K.; OGATA, Y.; MORISHITA, Y.; TAKEDA, M.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SAITO, K.; SHIBATA, D.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. **Plant Journal**, v. 57, n. 6, p. 1065–1078, 2009.

VIGNOLO, G. K.; PICOLOTTO, L.; GONÇALVES, M. A.; COCCO, C.; ANTUNES, L. E. C. Origem e botânica. In: ANTUNES, L. E. C.; JÚNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2016, p. 37–44.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613–646, 2005.

VOTH, V.; SHAW, D. V.; BRINGHURST, R. S. United States Patent. Strawberry Plant Called 'Camarosa', 1994. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/63/f8/f3/2cb5af668594a9/USPP8708.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

WAHYUNI, Y.; BALLESTER, A. R.; TIKUNOV, Y.; DE VOS, R. C. H.; PELGROM, K.T. B.; MAHARIJAYA, A.; SUDARMONOWATI, E.; BINO, R. J.; BOVY, A. G. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics**, v. 9, n. 1, p. 130–144, 2013.

WANG, H.; NAGEGOWDA, D. A.; RAWAT, R.; BOUVIER-NAVÉ, P.; GUO, D.; BACH, T. J.; CHYE, M. L. Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in *Arabidopsis* up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 31–42, 2012.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Effect of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 1, p. 35–42, 2006.

WANG, Y.; FREI, M. Stressed food - The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 141, n. 3–4, p. 271–286, 2011.

WANG, Y.; XU, L.; SHEN, H.; WANG, J.; LIU, W.; ZHU, X.; WANG, R.; SUN, X.; LIU, L. Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & Cd stress response of radish roots. **Scientific Reports**, v. 5, p. 18296, 2015.

WEBER, N.; ZUPANC, V.; JAKOPIC, J.; VEBERIC, R.; MIKULIC-PETKOVSEK, M.; STAMPAR, F. Influence of deficit irrigation on strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 849–857, 2017.

WHITAKER, B. D. Membrane lipid metabolism and oxidative stress involved in postharvest ripening, senescence, and storage disorders of fruits. **Acta Horticulturae**, v. 945, p. 269–282, 2012.

WREGE, M. S.; JÚNIOR, C. R.; ANTUNES, L. E. C.; OLIVEIRA, R. P.; HERTER, F. G.; STEINMETZ, S.; GARRASTAZU, M. C.; MATZENAUER, R.; JOÃO, P. L.; SANTOS, A. M. Zoneamento agroclimático para a produção de mudas de morangueiro no Rio Grande do Sul. p. 1–30, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/745906/1/documento187.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

WU, Y.; LI, L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1430, p. 80–95, 2015.

XIA, J.; PSYCHOGIOS, N.; YOUNG, N.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 652–660, 2009.

YANG, X. B.; WU, S. L.; ZHU, D. P.; WU, H.; JIANG, T.; QIAN, Y. H.; JIAO, F. Expression of the 2-dehydro-3-deoxyphosphooc-tonate aldolase (*KdsA*) gene in mulberry leaves (*Morus alba* L.) is down-regulated under high salt and drought stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 11955–11964, 2015.

ZHANG, J.; WANG, X.; YU, O.; TANG, J.; GU, X.; WAN, X.; FANG, C. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 1103–1118, 2011.