

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA



**Ciências  
ULisboa**



INSTITUTO  
SUPERIOR DE  
AGRONOMIA  
*Hinc  
Patriam  
Sustinet*  
Universidade de Lisboa

**Avaliação do *fitness* fisiológico da *Lablab purpureus* (L.)  
Sweet cultivada em condições salinas**

Catarina Batista Mendes

**Mestrado em Biologia dos Recursos  
Vegetais**

Dissertação orientada por:  
Doutor Bernardo Duarte  
Doutora Patrícia Vidigal

2020

## Agradecimentos

Em primeiro lugar um obrigado do tamanho do mundo aos meus orientadores, Dra. Patrícia Vidigal e Professor Bernardo Duarte. Foram muitas horas de estufa, de laboratório e de discussão. Obrigada por terem apoiado o meu gosto pela fisiologia vegetal desde o início, mesmo quando demorámos 3 meses até conseguirmos ter plantas! Foi uma jornada e tanto!

À Professora Cristina Branquinho, Professora Anabela Silva e Dra. Filipa Monteiro um muito obrigada, quer seja pelo alento, apoio no laboratório, ou por conseguir NaCl em tempo recorde!

Aos meus colegas MBRV, obrigada por cada tarde, noite e até madrugada passada a vosso lado. Ao João e ao Filipe obrigada por horas na sala de estudo, ajuda no R e piadas secas que me animaram sempre o dia.

À Margarida pelas discussões sobre fisiologia, companhia e ajuda no laboratório. Obrigada por me demonstrares que às vezes também temos de seguir o coração e ir para os lugares que nos fazem felizes.

À Inês pelo apoio incondicional, por ter sempre acreditado em mim (às vezes mais que eu própria), pelas chamadas de horas, choro, riso e muita partilha de conhecimento. Fazer a tese na tua companhia tornou tudo muito mais fácil! Tenho a certeza que daqui para a frente tudo vai melhorar, e se não melhorar, pelo menos continuamos a poder chatear-nos uma à outra.

Aos meus colegas e amigos de laboratório do 4º piso: Eduardo, Pedro, Mafalda e Dona Manuela. Sem vocês as horas que passei no laboratório teriam sido muito mais difíceis e longas. Obrigada pela disponibilidade para as minhas mil perguntas, pelas noitadas, pelo café a meio da manhã, por me ajudarem a carregar garrações intermináveis do MARE até ao laboratório, por toda a ajuda que precisei a manter as plantas, e pelo alento sempre dado.

À Catarina e à Jéssica por tantos turnos trocados, por me ajudarem sempre a conciliar o trabalho com a tese, e pelo apoio. Aposto que também já se sentem um pouco biólogas.

À Rita e à Lili pelo apoio dentro e fora da tese. Obrigada pelas noitadas de estudo, lanches e jantares, e acima tudo, pela amizade e força que sempre me deram. Serão sempre as melhores, melhores amigas da vida!

À Sónia por me mostrar que existe sempre um lado positivo e de crescimento em tudo o que acontece na vida.

Aos meus pais e irmãs por sempre me darem a força necessária para seguir os meus sonhos, quer eles fossem vir para Lisboa ou ir ao espaço. Foram e serão sempre a minha razão para tudo o que faço na vida. À minha avó Alice, por todo o amor e respeito à natureza que sempre me transmitiu.

Ao Nuno, por todo o amor, respeito e paciência que teve para mim nestes últimos 2 anos, acredito que dos 9 que já passámos juntos, tenham sido os mais difíceis. Pelo riso, choro, choro de tanto rir, comida e café fora de horas. És um achado que pretendo manter para sempre.

## Resumo

A salinização é um processo de acumulação de sais que pode ocorrer naturalmente, através de fenômenos naturais (modificações da rocha-mãe, ação do vento, inundações, entre outros), ou por ação antropogênica, como por exemplo práticas agrícolas desadequadas. Em ambos os casos, a acumulação de sais na rizosfera causa uma situação de stresse para a planta. A salinidade é ainda um fator crítico ao nível da produção agrícola, uma vez que altera a estrutura física, química e ecológica do solo, o que pode afetar o desenvolvimento das culturas e por consequente a sua produtividade. Nesta perspetiva, um aumento de salinidade traduz-se numa deficiência em termos de nutrientes disponíveis para a planta, um aumento do stresse osmótico, aumento da toxicidade iónica e consequentemente do stresse oxidativo, devido à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), levando a limitações ao nível da eficiência do uso da água por parte da planta. Também do ponto de vista de produção, morfologia e fenologia, a salinidade induz uma redução da expansão foliar, fecho estomático, redução na produção primária e consequente perda de biomassa e desenvolvimento de sintomas de carências nutricionais.

Estima-se que, no mundo, exista 20% de terra disponível para produção agrícola, e 33% dos desses terrenos agrícolas são irrigados e afetados pela salinização; é ainda expectável que até 2050, devido à salinização mais de 50% dos terrenos agrícola deixem de ser produtivos. Face a esta perspetiva, é necessário encontrar estratégias de adaptação que permitam a realização de atividades agrícolas. Uma possível estratégia passa pela exploração de culturas tolerantes/resistentes à salinidade, que consigam oferecer uma variedade de produtos agrícolas versáteis ao mesmo tempo que contribuem para a melhoria da fertilidade e estrutura do solo e assim uma diminuição do uso de fatores de produção agrícola (mobilizações, fertilizantes e fitofármacos). As leguminosas multifuncionais que demonstrem tolerância/resistência à salinidade, poderão ser uma resposta sustentável, ao permitirem ao produtor uma flexibilidade de produção em zonas críticas (solo e água) para a produção de culturas de elevado rendimento. Contudo, nem todas as leguminosas oferecem esta versatilidade enquanto possuem uma resposta positiva à salinidade.

A *Lablab purpureus* (L.) Sweet, vulgarmente denominada de Lablab, pertence à família Fabaceae, e possui três subespécies. Esta espécie é uma das leguminosas domesticadas mais antigas, tendo sido documentada na Índia 1500 a.C., e na Núbia Egípcia no século IV d.C. Atualmente é utilizada com diversos objetivos: fonte de compostos fitofarmacêuticos, forragem e inclusive, como planta ornamental na Europa. Para além desta versatilidade, a Lablab tem uma elevada capacidade de adaptação a condições de seca, mesmo quando comparada com outras leguminosas como a *Vigna unguiculata* (L.) Walp ou *Phaseolus vulgaris* L. Esta característica levantou a questão de se esta espécie seria uma boa escolha para ser utilizada em campos salinos, uma vez que os mecanismos de resposta ao stresse hídrico são semelhantes ou comuns com os mecanismos de resposta ao stresse salino em várias espécies. Estes mecanismos podem variar de espécie para espécie, mas de uma forma geral envolvem a ativação de

defesas enzimáticas antioxidantes, produção de componentes antioxidantes não enzimáticos, transportadores de íons, solutos osmocompatíveis, assim como mecanismos de compartimentação iônica. Um estudo sobre Lablab sob stresse salino demonstrou mecanismos de resposta à salinidade distintos entre as folhas e raízes, sendo que o sistema radicular apresentou uma resposta mais marcada ao stresse salino. No entanto, ainda existem algumas incógnitas no que refere aos mecanismos da Lablab em resposta ao stresse salino, tal como as respostas metabólicas e fisiológicas que ocorrem durante o ciclo vegetativo e reprodutivo da Lablab sob stresse salino. Posto isto, o presente estudo pretende contribuir para aumentar o conhecimento de alguns dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos da Lablab em condições de stresse salino com o objetivo de compreender melhor a sua adaptação a este tipo de stresse.

Com este objetivo em vista, foram selecionadas para este estudo três variedades de Lablab que apresentaram excelente rendimento em ensaios de campo no âmbito do projeto do Programa de Desenvolvimento Rural 2020 STEnCIL - SusTentável EfiCiente Lablab (Parceria n.º 19 / Iniciativa n.º 27. PDR2020-101-031465). Assim, foram selecionadas duas variedades comerciais: Rongai (RG, com origem no Quênia) e Highworth (HW, com origem na Índia) e uma *landrace* – Wafula fupi (WF, também com origem no Quênia). Foram germinadas 18 sementes por variedade numa mistura de substrato comercial e perlite até atingirem a primeira trifoliada completamente expandida, momento após o qual foram transferidas para solução hidropônica. Ao fim deste período, e após nove dias de adaptação à solução hidropônica, foram estabelecidos três níveis de salinidade com a adição de NaCl ao meio de cultura (0 mM, 50 mM e 100 mM de NaCl) nos quais seis plantas de cada variedade foram mantidas durante 13 dias em condições de fotoperíodo de dia longo com 16 h / 8 h (dia/noite). Durante o período de crescimento em hidroponia foram recolhidos diferentes dados: fluorimetria de pulso de amplitude modulada (PAM) da clorofila a acompanhamento da área foliar, e no último dia de teste foi realizada a recolha de dados de termografia foliar. No fim dos ensaios, foram recolhidas amostras de folha da primeira trifoliada totalmente expandida a contar do ápice, assim como da raiz e caule de todas as plantas de todas as concentrações. Adicionalmente foram quantificados fenóis, flavonoides, produtos de peroxidação lipídica como malondialdeído (MDA), ácidos gordos, pigmentos (clorofilas, carotenóides, antocianinas e betacianinas), solutos osmocompatíveis (prolina) e hidratos de carbono na região foliar, assim como o teor hídrico na região foliar e caule e ainda o perfil iónico da raiz, caule e folha.

Os resultados demonstraram que as três variedades de Lablab apresentam alguma tolerância à salinidade, principalmente no nível intermédio de salinidade (50 mM NaCl). A variedade WF exibiu melhor capacidade de dissipação de energia através do aparelho fotossintético, tendo sido também a variedade que demonstrou melhor capacidade de manutenção da turgescência ao nível foliar, contrariamente à RG que demonstrou maior concentração de água ao nível do caule. A variedade HW pareceu apresentar algumas limitações ao nível fotoquímico, ainda que tenha demonstrado uma boa capacidade de utilização e acumulação de compostos antioxidantes, por exemplo através do ciclo das

xantófilas. Apesar das diferenças em determinadas respostas, todas as variedades demonstraram respostas comuns como o aumento da concentração de Na e Cl ao nível foliar, assim como o aumento da temperatura e diminuição da peroxidação lipídica. Estas respostas podem dever-se à tentativa de tolerância ao excesso osmótico, uma vez que a acumulação de Na ao nível foliar nos vacúolos pode atuar como medida de aprisionamento deste ião evitando a saída de K, assim como o aumento de temperatura pode ser sinal de emissão de excesso de energia sob a forma calor. A diminuição de MDA observada nas três variedades, poderá estar relacionada com o uso do Ca como antiporte do Na e K, uma resposta comum em alguns halófitos.

Assim sendo, este estudo fisiológico às três variedades de Lablab sugere a possibilidade da existência de mecanismos de tolerância à salinidade, principalmente a 50 mM NaCl, considerado o limite para não halófitos. Desta forma, a Lablab revelou ser uma cultura com potencial para ser utilizada enquanto cultura para rotação e/ou recuperação de solos salinos, dado manter a sua capacidade de produção mesmo em solos salinizados contribuindo para a valorização agrícola da Lablab.

**Palavras-chave:** Fotoquímica; *Lablab purpureus*; Metabólica; Osmorregulação; Salinidade

## Abstract

Salinization is a process of accumulation of salts that can occur naturally, through natural conditions such as rock modifications, wind action, floods, and others, or by anthropogenic actions, like inappropriate agricultural practices. In both cases, the accumulation of salts causes a situation of stress for the plant.

Salinity is a critical factor in agriculture production because it changes the physical, chemical, and ecological structure of the soil, which may affect the development of crops and consequently their productivity. The increase in salinity translates into a deficiency of nutrients available to the plant, an increase of the osmotic stress and ion toxicity and, therefore, increases in oxidative stress, due to the formation of reactive oxygen species (ROS), leading to plant water use efficiency limitations. Additionally, from the production, morphology, and phenology point of view, salinity induces a reduction in foliar expansion, stomata closure, reduction in primary production, and consequent loss of biomass and development of symptoms of nutritional deficiencies.

It is estimated that 20% of the world's land is available for agricultural production, and 33% of that land is irrigated and affected by salinization; it is also expected that until 2050 over 50% of agricultural land ceases to be productive due to salinization. Faced with this scenario, it is necessary to find adaptation strategies that allow agricultural activities to be carried out. A possible strategy is to exploit salinity-tolerant/resistant crops which can offer a variety of versatile products that at the same time contribute to improving the structure and fertility of the soil and thus a decrease in the use of agricultural production factors (mobilizations, fertilizers, and phytopharmaceuticals). Multifunctional legume crops that show tolerance/resistance to salinity could be a sustainable response for farmers by allowing flexibility in critical areas (soil and water) for the production of high yield crops. However, not all legume crops offer this versatility while having a positive response to salinity.

*Lablab purpureus* (L.) Sweet, commonly known as Lablab, belongs to the Fabaceae family and has three subspecies. This specie is one of the oldest domesticated legume crop, has been documented in India 1500 BC and in Egyptian Nubia in the fourth century AD. Nowadays, this plant is used for several purposes: phytopharmaceutical compounds, forage and even as an ornamental plant in Europe. Besides this versatility, Lablab has a high capacity to adapt to drought conditions, even in comparison to other legume crops/pulses like *Vigna unguiculata* (L.) Walp ou *Phaseolus vulgaris* L. This ability raised the question if this species would be a good choice for use in saline fields, since the mechanisms of response to hydric stress are similar or common with the mechanisms of response to saline stress in several species. These mechanisms can change from species to species, but generally involves the activation of antioxidant enzymatic defenses, production of non-enzymatic antioxidant components, ion carriers, osmocompatible solutes, as well as mechanisms of ion compartmentation. A study on Lablab under saline stress demonstrated different mechanisms of response to salinity between leaves and roots, whereas the root system showed a more pronounced response to saline stress. However, there are still

some remaining questions regarding Lablab's mechanisms in response to saline stress, such as metabolic and physiological responses that occur during Lablab's vegetative and reproductive cycle under saline stress. That said, the present study aims to contribute to increase the knowledge of some of Lablab's physiological and biochemical mechanisms under saline stress conditions in order to better understand their adaptation to this type of stress.

Three Lablab varieties were selected for this study that showed excellent yield in field trials under the Rural Development Program 2020 STEnCIL - SusTentável EfiCIente Lablab (Parceria n.º 19 / Iniciativa n.º 27. PDR2020-101-031465) project. Thus, two commercial varieties were selected: Rongai (RG, from Kenya) and Highworth (HW, from India); and a landrace: Wafula fupi (WF, from Kenya). Eighteen seeds per variety were germinated in a mixture of commercial substrate and perlite. When the first completely expanded trifoliolate leaf grew, the plants were then transferred to a hydroponic solution. After nine days of adaptation to the hydroponic solution, three levels of salinity were established with the addition of NaCl to the culture medium (0 mM, 50 mM, and 100 mM NaCl). Six plants of each variety were maintained in these culture medium for 13 days under a 16 h light/8 h dark photoperiod. During the hydroponic growth period, different data were recorded: Pulse–Amplitude–Modulation (PAM) fluorometry of chlorophyll, foliar area, and foliar thermography on the last day of the experiment. At the end of the trials, leaf samples were taken from the first fully expanded trifoliolate from the apex, as well as root and stem samples from all plants of all concentrations. Additionally, phenols, flavonoids, lipid peroxidation products such as malondialdehyde (MDA), fatty acids, pigments (chlorophylls, carotenoids, anthocyanins and betacyanins), osmocompatible solutes (proline), and carbohydrates from the leaf region were quantified, as well as the water content from the leaf and stem. The ionic profile of the root, stem, and leaf was also recorded.

According to the results, the three Lablab varieties have some tolerance to salinity, mainly in the intermediate salinity level (50 mM NaCl). The WF variety showed better energy dissipation capacity through the photosynthetic device, and it was also the variety that showed better turgidity maintenance ability at the leaf level, contrary to the RG that showed higher water concentration at the stem level. This difference may be related to the presence of mechanisms at the root or stem level. The HW variety seemed to exhibit some limitations at the photochemical level, although it has demonstrated a good capacity for use and accumulation of antioxidant compounds, for example through the xanthophyll cycle. Despite the differences in certain responses, all varieties demonstrated common responses such as increased concentration of Na and Cl at the leaf level, as well as increased temperature and decreased lipid peroxidation. These responses may be due to the attempt of tolerance to osmotic excess, since the accumulation of Na at leaf level in the vacuoles may act as a measure of this ion trapping, therefore avoiding the exit of K; as well as the increase in temperature which may be a sign of emission of excess energy in the form of heat. The decrease of MDA observed in the three varieties may be related to the use of Ca as an antiporter of Na and K, a common response in some halophytes.

Therefore, this physiological study of three Lablab varieties suggests the possibility of the existence of salinity tolerance mechanisms, mainly at 50 mM NaCl which is considered the limit for non-halophytes. Thus, Lablab has revealed to be a crop with the potential to be used as a crop for rotation and/or recovery of saline soils, as it maintains its production capacity even in saline soils, contributing to Lablab's agricultural valorization.

**Key-words:** Photochemistry; *Lablab purpureus*; Metabolic; Osmoregulation; Salinity

# Índice

Agradecimentos.....	2
Resumo.....	3
Abstract .....	6
Índice.....	9
Lista de quadros .....	11
Lista de figuras .....	11
Abreviações .....	15
1. Introdução.....	16
1.1 Os efeitos do stresse salino .....	16
1.2 A planta em estudo, a <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet.....	17
1.3 Stresse hídrico vs. stresse salino .....	17
2. Objetivos .....	19
3. Materiais e métodos.....	20
3.1 Material vegetal .....	20
3.2 Condições experimentais .....	20
3.3 Perfil iónico .....	21
3.4 Conteúdo hídrico .....	21
3.5 Determinação da área foliar.....	21
3.6 Fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM) da clorofila a .....	22
3.7 Composição pigmentar .....	22
3.8 Antocianinas e betacianinas.....	23
3.9 Hidratos de Carbono .....	24
3.10 Prolina.....	24
3.11 Quantificação de fenóis e flavonoides .....	25
3.12 Termografia .....	25
3.13 Perfil de ácidos gordos.....	25
3.14 Quantificação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica .....	26

3.15	Análise estatística .....	26
4.	Resultados .....	27
4.1	Conteúdo mineral/iônico .....	27
4.2	Conteúdo hídrico .....	31
4.3	Área foliar .....	31
4.4	Fotobiologia.....	32
4.4	Perfil pigmentar .....	39
4.4.1	Clorofilas e Carotenóides .....	39
4.4.2	Antocianinas e Betacianinas.....	39
4.5	Hidratos de carbono .....	41
4.6	Prolina.....	42
4.7	Fenóis e flavonoides .....	43
4.8	Temperatura Foliar .....	44
4.9	Perfil de Ácidos Gordos e Quantificação de MDA .....	45
5.	Discussão.....	50
6.	Conclusão .....	59
7.	Bibliografia.....	60

## Lista de quadros

Tabela 1 Concentração dos íons Na, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni e Cu na raiz, caule e folha no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas marcam as diferenças significativas entre as salinidades para a mesma variedade e as letras maiúsculas as diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ )	29
Tabela 2 Conteúdo de Clorofilas e carotenóides em $\mu\text{g g}^{-1}$ PS no final do período de stresse na variedades WF, HW e RG (média ± erro padrão, N=5, as letras marcam as diferenças significativas entre as salinidades para a mesma variedade, para o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ )	40
Tabela 3 Sumário dos parâmetros de análise da Fluorometria e a sua descrição sintetizada	70

## Lista de figuras

Figura 1 Sementes de Lablab purpureus (L.) Sweet purpureus usadas no estudo. RG (à esquerda), HW (no centro) e WF (à direita)	20
Figura 2 Análise canónica de coordenadas principais (CAP) aplicada à concentração elementar na raiz (R – root), caule (S – shoot) e folha (L – leaf) (A) em todas as variedades testadas, e individualmente nas variedades WF (B), HW (C) e RG (D) no final do período de exposição a NaCl	30
Figura 3 <b>A</b> e <b>B</b> – Conteúdo hídrico em percentagem no caule (A) e folha (B) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ )	31
Figura 4 Área foliar no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ )	31
Figura 5 <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> – Curva rápida de luz da taxa de transporte eletrónico (rETR); <b>D</b> – Taxa de transporte eletrónico máxima (rETR <sub>max</sub> ); <b>E</b> – Eficiência fotossintética ( $\alpha$ ) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ )	32
Figura 6 <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> – Curva de Kautsky no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média, N = 5)	33

Figura 7 Análise canónica de coordenadas principais (CAP) aplicada às curvas de indução de fluorescência final do período de exposição a NaCl em todas as variedades testadas (A) e individualmente nas variedades HW (B), WF (C) e RG (D).....	34
Figura 8 <b>A</b> – Complexos geradores de oxigénio ativo (OECS); <b>B</b> – taxa de fecho dos centros de reação do PSII ( $M_o$ ); <b>C</b> - taxa de turnover dos centros de reação (N); <b>D</b> – turnover redox múltiplo das quinonas ( $S_M$ ); <b>E</b> – Dimensão do pool de quinonas oxidadas $\times 10^6$ (Area); <b>F</b> – Medida de conectividade das antenas fotossintéticas ( $P_G$ ) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média $\pm$ erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	35
Figura 9 <b>A</b> – Fluxo de energia absorvida (ABS/CS); <b>B</b> – Fluxo de energia dissipada (DI/CS); <b>C</b> - Fluxo de energia preso (TR/CS); <b>D</b> – Fluxo de energia transportada (ET/CS); <b>E</b> – Centros de reação disponíveis (RC/CS); <b>F</b> – Densidade dos centros de reação nas antenas da clorofila do PSII (RC/ABS) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média $\pm$ erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ) .....	37
Figura 10 Parâmetros derivados das curvas de Kautsky relativos ao PSII e PSI: <b>A</b> – Contribuição do transporte eletrónico desde o plastoquinol até aos aceitadores de eletrões do PSI ( $RE_o/RC$ ); <b>B</b> – Contribuição da redução dos aceitadores de eletrões do PSI ( $\delta Ro/(1-\delta Ro)$ ); <b>C</b> – Contribuição das reações da fase escura entre a quinona A ( $Q_A$ ) e a plastoquinona ( $\psi_o/(1 - \psi_o)$ ); <b>D</b> – Contribuição das reações à luz para a fotoquímica primária ( $TR_o/DI_o$ ); <b>E</b> – Constante de equilíbrio redox entre o PSII/PSI ( $\psi_{Eo}/(1 - \psi_{Eo})$ ) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média $\pm$ erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	38
Figura 11 <b>A</b> – Concentração total de carotenoides; <b>B</b> – Concentração total de clorofilas; <b>C</b> – Rácio Carotenoides/Clorofila; <b>D</b> – Estado de De-Epoxidação (DES) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média $\pm$ erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	41
Figura 12 <b>A</b> – Concentração de antocianinas; <b>B e C</b> – Concentração de betacianinas no caule e na folha respetivamente, no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média $\pm$ erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	41

Figura 13 <b>A</b> : Concentração de hidratos de carbono solúveis totais; <b>B</b> : Concentração de amido total no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ) .....	42
Figura 14 Concentração de prolina no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	43
Figura 15 <b>A</b> – Concentração fenólica; <b>B</b> – Concentração de flavenóides no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas marcam as diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas as diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	43
Figura 16 Temperatura foliar (°C) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	44
Figura 17 Temperatura foliar (°C) sob a forma de visualização termográfica no final do período de exposição a NaCl nas variedades WF, HW e RG .....	45
Figura 18 Perfil de ácidos gordos no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	46
Figura 19 Classes de saturação de ácidos gordos: ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), ácidos gordos polinsaturados (PUFA), ácidos gordos insaturados (UFA) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ) .....	47
Figura 20 Índices de saturação de ácidos gordos: rácio ácidos gordos insaturados/saturados (UFA/SFA), rácio de ácidos gordos polinsaturados/saturados (PUFA/SFA), rácio C18:2/C18:3 (18:2/18:3), rácio do índice de duplas ligações (DBI) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para $p < 0,05$ ).....	47
Figura 21 Concentração de malondialdeído (MDA) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas	

entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )..... 48

Figura 22 Análise canónica de coordenadas principais (CAP) aplicada à concentração de ácidos gordos nas três variedades sob exposição a NaCl no final do período de exposição a NaCl (A) em WF (B), HW (C) e RG (D)..... 49

## Abreviações

A – Altura da folha

C16:0 – Ácido palmítico

C16:1t – Ácido hexadecanóico

C17:0 – Ácido heptadecanóico

C18:2 – Ácido linoleico

C18:3 – Ácido linolénico

CAP – Análise canônica de coordenadas principais

CTE – Cadeia transportadora de eletrões

CR – Centro de reação

DBI – Índice de duplas ligações

DES – Índice do Estado de De-epoxidação

$\epsilon$  – Coeficiente de extinção molar

ETR – Taxa de transporte eletrónico

FAMEs – Ésteres metílicos de ácidos gordos

HW – *Lablab purpureus* (L.) Sweet, cv. Highworth

L – Largura da folha

MDA – Malondialdeído

PAM – Fluorometria de pulso de amplitude modulada

PAR – Radiação fotossinteticamente ativa

PCA – Análise de componentes principais

PF – Peso fresco

PS – Peso seco

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

Q<sub>A</sub> – Quinona A

Q<sub>A</sub><sup>-</sup> – Quinona A reduzida

Q<sub>B</sub> – Quinona B

Q<sub>B</sub><sup>-</sup> – Quinona B reduzida

RG – *Lablab purpureus* (L.) Sweet, cv. Rongai

ROS – Espécies reativas de oxigénio

RLC – Curva Rápida de Luz

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

WF – *Lablab purpureus* (L.) Sweet, *landrace* Wafula fupi

## 1. Introdução

Estima-se que 33% dos terrenos agrícolas irrigados sejam afetados pelo processo de salinização (Shrivastava e Kumar, 2015). Esta situação deve-se a vários fatores, tais como baixa precipitação média anual, elevada evaporação à superfície, modificações da rocha-mãe, irrigação com águas salinas e práticas culturais inadequadas (Shrivastava e Kumar, 2015). É ainda expectável que até 2050 mais de 50% da terra deixe de ser arável devido à salinização (Flowers, 2004). Assim, vários trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos com vista à identificação de espécies halófitas ou tolerantes ao stresse salino com potencial alimentar ou valor de mercado, bem como ao desenvolvimento técnico de agricultura salina que possam ser utilizadas num futuro cenário de agravamento da salinização dos solos (Duarte *et al.*, 2014).

### 1.1 Os efeitos do stresse salino

A salinização é um processo de acumulação de sais (Rengasamy, 2006) que pode resultar naturalmente, ou por ação antropogénica (Butcher *et al.*, 2016). A salinização natural é designada de salinização primária que advém de fenómenos naturais, como modificações na rocha-mãe, ação dos ventos, chuvas e inundações marinhas; a salinização por ação antropogénica é designada de salinização secundária e encontra-se diretamente associada a práticas agrícolas e culturais desadequadas, como por exemplo, irrigação com águas com elevado teor em sais (Butcher *et al.*, 2016). Em ambos os casos, a resultante acumulação de sais nos solos e conseqüentemente na rizosfera, leva a que se gerem situações de stresse fisiológico para a planta. Para mitigar este crescente problema ambiental, é necessário criar estratégias de produção agrícola que não contribuam para o agravamento do problema da salinização crescente dos solos. Estas estratégias podem passar por adotar práticas agrícolas que promovam a fertilidade e estrutura do solo, bem como a redução da contaminação dos lençóis freáticos por nitratos e pesticidas (Bartzas *et al.*, 2015). Adicionalmente, outra estratégia pode passar pela produção de culturas versáteis que consigam oferecer uma variedade de produtos agrícolas e que, em simultâneo, contribuam para a melhoria dos solos com o objetivo de diminuir o uso de fatores de produção agrícola (mobilizações, fertilizantes e fitofármacos), como por exemplo as leguminosas multifuncionais. Estas espécies, para além de fornecerem alimento através da sua produção de grão, fornecem benefícios ecológicos e económicos. As leguminosas multifuncionais, para além de promoverem a fixação de azoto ao solo, podem ainda oferecer ao produtor adubo verde e/ou forragem, o que a longo prazo promove a produção de matéria-orgânica ao mesmo tempo que oferece uma fonte de rendimento ao produtor (Maass *et al.*, 2010; Nandwa *et al.*, 2011; NAS, 1979).

O aumento de salinidade traduz-se numa deficiência de nutrientes disponíveis para a planta, limitações ao nível da eficiência do uso da água, aumento do stresse osmótico e da toxicidade iónica. Conseqüentemente, são geradas espécies reativas de oxigénio (ROS) que originam fenómenos de stresse

oxidativo (Parihar *et al.*, 2015). Tudo isto afeta a produção, morfologia e fenologia da planta, através de uma redução na expansão foliar, fecho estomático, redução na produção primária e consequente perda de biomassa e desenvolvimento de sintomas de carências nutricionais (Duarte *et al.*, 2014). Efeitos semelhantes podem ser observados na raiz, com uma redução da biomassa radicular, diâmetro e comprimento da raiz e desenvolvimento de raízes laterais (Shahzad *et al.*, 2012). Contudo, as alterações morfológicas na raiz e folhas desenvolvidas como resposta ao stresse salino dependem de vários fatores, incluindo espécies, génotipos, fase de crescimento, duração do período de exposição e concentração de sais na rizosfera (Robin *et al.*, 2016).

## **1.2 A planta em estudo, a *Lablab purpureus* (L.) Sweet**

*Lablab purpureus* (L.) Sweet, denominada vulgarmente por Lablab, pertence à família Fabaceae, e é a única espécie do género monotípico Lablab Adans. (Verdcourt, 1970). A espécie *L. purpureus* possui três subespécies: spp. *uncinatus* (selvagem), spp. *purpureus* e spp. *bengalensis*, sendo que as duas últimas domesticadas e/ou cultivadas. Esta, embora seja hoje considerada uma cultura esquecida, é uma das leguminosas domesticadas mais antigas, o que explica a sua ampla diversidade morfológica e agronómica (Maass, 2016). A *Lablab purpureus* foi documentada na Índia 1500 a.C., e na Núbia Egípcia no século IV d.C. (Maass, 2016) e tem, atualmente, presença mundial, sendo a sua versatilidade explorada de acordo com as necessidades locais. Esta versatilidade resulta numa vasta coleção de germoplasma com mais de 3000 *accessions* conhecidas e que incluem as três subespécies. A subespécie *uncinatus* é originária da Etiópia, o centro de origem da espécie, enquanto as restantes duas subespécies são encontradas no Quénia (centro de diversidade primária), Índia (centro de diversidade secundária), Austrália, Estados Unidos da América e América do Sul (Maass, 2016; Maass *et al.*, 2010). A *Lablab* é uma leguminosa multifuncional, fonte de produtos edíveis (grão e vagem), utilizada como forragem, adubo verde e como fonte de compostos com potencial farmacêutico. Nos países africanos e na Índia esta espécie é amplamente utilizada na sua multitude de aplicações, inclusive fitofarmacêutica, enquanto na Austrália e Estado Unidos da América é explorada como forragem, sendo que na Europa é usada unicamente como ornamental (Maass *et al.*, 2010). Para além da sua versatilidade agronómica, esta leguminosa tem uma elevada adaptabilidade a várias condições edáfico-climáticas (Maass *et al.*, 2010), o que faz desta leguminosa uma cultura ecologicamente eficiente com enorme potencial para os sistemas agrícolas (Vidigal *et al.*, 2019) ou mesmo para a reabilitação de solos contaminados (Abreu *et al.*, 2020; Vidigal *et al.*, 2020).

## **1.3 Stresse hídrico vs. stresse salino**

O stresse hídrico afeta cerca de 40 % da área de solo dedicada à agricultura, sendo provocado por fenómenos de escassez de água e tendo como consequências inevitáveis o menor crescimento da

planta, menor eficiência energética dos seus processos metabólicos, bem como a acumulação intracelular de ROS (Chaves *et al.*, 2009; Kokila *et al.*, 2014).

Dado que a Lablab é uma planta com uma resposta eficiente ao stresse hídrico (Pengelly e Maass, 2001; Robotham e Chapman, 2017) especula-se se os mecanismos de adaptação a ambientes com baixa disponibilidade hídrica, poderiam conferir também uma capacidade de tolerância/resistência a stresse salino. A eficiência dos mecanismos de resposta ao stresse osmótico/salino varia de espécie para espécie (Acosta-Motos *et al.*, 2017), sendo que em algumas espécies são bastante mais eficazes, como é o caso das plantas halófitas. Este grupo de plantas exhibe uma elevada tolerância e/ou resistência ao stresse osmótico, apresentando vários mecanismos de osmorregulação, antioxidantes e de compartimentação de solutos (Flowers e Colmer, 2008). Os mecanismos utilizados pelas plantas halófitas são na verdade muito semelhantes aos utilizados pelas plantas quando se encontram em condições de stresse hídrico (Munns, 2002; Zhu, 2002). Esses mecanismos envolvem ativação de defesas enzimáticas antioxidantes (por exemplo a superóxido dismutase, glutatona redutase, ascorbato peroxidase, catalase), produção de componentes antioxidantes não enzimáticos (p.e. ácido ascórbico, glutatona reduzida, flavenóides e fenóis), alteração do perfil de hidratos de carbono, produção de solutos osmocompatíveis (por exemplo, prolina e betaínas), bem como alterações no transporte iónico e na compartimentação iónica (Flowers e Colmer, 2015; Zhu, 2003).

D'Souza e Devaraj (2010) já tinham demonstrado que plântulas de *L. purpureus* (cv. HA-4) sob stresse salino ativaram mecanismos distintos de resposta à salinidade nas folhas e raízes. E ainda, que o sistema radicular de HA-4 apresentou menor tolerância ao stresse salino em comparação com as folhas. No entanto, e apesar deste estudo, os mecanismos de adaptação e resposta da Lablab ao stresse salino não são totalmente conhecidos.

Posto isto, o presente estudo pretende contribuir com o aumento de conhecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de resposta da Lablab ao stresse salino e assim, compreender melhor a sua adaptação a este stresse.

## 2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é estudar mecanismos fisiológicos e bioquímicos de resposta de duas cultivares (Rongai - RG e Highworth - HW) e uma *landrace* (Wafula Fupi - WF) de Lablab ao stresse salino, ajudando a determinar qual destas variedades poderá estar mais apta para produção em condições de salinidade.

Tendo em consideração a elevada capacidade de adaptação da Lablab a elevados períodos de limitação hídrica, e sabendo que os mecanismos de tolerância ao stresse hídrico são semelhantes aos mecanismos de tolerância ao stresse salino, o presente trabalho irá debruçar-se no estudo dos mecanismos de natureza metabólica e fisiológica de resposta de três variedades de Lablab a vários níveis de stresse salino. Através de três concentrações de NaCl exógeno será possível avaliar vários parâmetros relacionados com o *fitness* fisiológico, de forma a melhor compreender os mecanismos de tolerância/resistência desta espécie ao stresse salino. O estudo destes mecanismos em duas cultivares (RG e HW) e uma *landrace* (WF), permite pela primeira vez determinar qual a cultivar/*landrace* mais adequada em condições de salinidade, para além de oferecer um ponto de partida para estudos futuros e seleção de outras variedades de Lablab.

Acresce, que os resultados obtidos no presente estudo irão contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia desta planta e dos seus mecanismos de tolerância e/ou resistência ao stresse salino, assim como determinar se será possível a exploração desta leguminosa versátil em terrenos agrícolas por vezes considerados marginais, e em que limites de stresse salino esta produção poderá ou não ocorrer.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Material vegetal

Como material vegetal foram utilizadas três variedades de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, spp. *purpureus*: duas variedades comerciais, cv. Rongai (doravante denominada RG, originária do Quênia) e cv. Highworth (doravante denominada HW, originária da Índia); e uma *landrace var.* Wafula Fupi (doravante denominada WF, originária do Quênia). Estas variedades foram selecionadas por serem geneticamente semelhantes (Vidigal *et al.*, 2018). As sementes de HW e de WF apresentam uma coloração negra enquanto a variedade RG tem uma coloração castanha (Figura 1).



Figura 1 Sementes de *Lablab purpureus* (L.) Sweet purpureus usadas no estudo. RG (à esquerda), HW (no centro) e WF (à direita).

Foram germinadas 18 sementes de cada variedade numa mistura de substrato vegetal Potplant 525 Extra50 (Projar, Portugal) e perlite (Projar, Portugal) numa razão de 4:1, a uma temperatura de 24/20°C (dia/noite) e em condições de fotoperíodo de dia longo com 16/8 h (dia/noite).

Dois dias após a sementeira foi possível observar a emergência das plântulas e 36 dias depois observou-se a primeira folha trifoliada totalmente expandida. Ao fim deste período as plantas foram transferidas do substrato sólido para condições de hidroponia em solução Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950). O seu crescimento realizou-se em câmara de crescimento (ARALAB, FitoClima 1200 PLH), com humidade relativa a 50% e intervalo de intensidade luminosa 200-300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### 3.2 Condições experimentais

Após 38 dias (tempo decorrido até ao aparecimento da primeira folha trifoliada completamente expandida), e de um período de adaptação de nove dias em hidroponia, iniciou-se a suplementação da solução nutritiva com NaCl, de forma a testar os três níveis de salinidade desejados: 0 mM, 50 mM e 100 mM de NaCl. A adição de NaCl foi realizada de forma gradual, a cada 2 dias até ao nível de NaCl a ser estudado, de modo a minimizar fenómenos de choque osmótico agudo. Uma vez atingida a concentração de NaCl alvo, as plantas foram mantidas por um período de 13 dias, durante os quais foram sempre suplementadas com a solução nutritiva de forma a manter a salinidade alvo.

### 3.3 Perfil iónico

O perfil elementar/iónico das amostras recolhidas de folha, caule e raiz foi determinado segundo Duarte *et al.* (2015b). As amostras foram homogeneizadas com recurso a moinho de esferas (Retsch MM 4000, Alemanha). Cerca de 100 mg do produto homogeneizado foi posteriormente mineralizado com 2 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, 65% v/v) em reator de Teflon durante 3 horas a 110 °C. Após o arrefecimento dos reatores, a 995 µL do produto de mineralização foram adicionados 5 µL de solução de Gálio (1000 mg L<sup>-1</sup>) como *standard* interno. Do extrato resultante foram retirados 5 µL e aplicados em disco de quartzo previamente coberto com sílica hidrofóbica (10 µL). O perfil elementar das amostras foi analisado com recurso a Espectrofotometria de Fluorescência de Raio-X com Reflexão Total (TXRF, S2 Picofox, Brucker). As amostras foram irradiadas durante 1000 segundos, usando uma lâmpada de 50 kV, 1 mA com espelho de Molibdénio e recetor monocromador de 17,5 keV. A concentração dos elementos alvo foi determinada por análise da área dos picos em comparação com a obtida para o *standard* interno.

### 3.4 Conteúdo hídrico

No final do ensaio e após as medições fisiológicas, as plantas foram lavadas com água destilada para remover impurezas, e as diferentes amostras (folhas, caule, raízes) foram separadas. Para cada uma das amostras foi determinado o seu peso fresco (PF). As amostras foram posteriormente colocadas a secar a 60 °C até peso constante, e determinado o seu peso seco (PS). O conteúdo hídrico (CH) das amostras foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$3.1 \text{ CH}(\%) = \frac{PF-PS}{PF} \times 100$$

### 3.5 Determinação da área foliar

A medição de área foliar foi realizada através da captura de imagem em cinco indivíduos de cada variedade por tratamento. As imagens recolhidas foram analisadas recorrendo ao programa *Fiji-ImageJ 1.52i* (Abràmoff *et al.*, 2004) de forma a determinar a altura (A) e a largura (L) das folhas, assim como a área. Aos dados recolhidos manualmente, será aplicado o fator 'f', tal que

$$3.2 \text{ Área foliar} = L \times A \times f$$

em que *f* é um fator de correlação entre a área calculada pelo programa e a área obtida por L x A (Nepomuceno *et al.*, 2013).

### 3.6 Fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM) da clorofila *a*

Após o período de adaptação às condições de hidroponia e com a introdução das condições experimentais a testar, a evolução fisiológica das plantas foi acompanhada diariamente durante todo o período experimental, através da fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM) da clorofila *a*, segundo o método descrito em Duarte *et al.* (2017a).

Todas as medições de fluorescência foram realizadas na primeira folha trifoliada completamente expandida localizada abaixo do ápice. As medições foram realizadas após adaptação das folhas à escuridão durante um período mínimo de 15 minutos. Após este período, as medições de fluorescência foram realizadas na face adaxial em dois dos folíolos da folha trifoliada selecionada, usando um fluorómetro de pulso de amplitude modulada - FluoroPen FP100 (Photon System Instruments, República Checa). Para determinação dos parâmetros elementares da fotossíntese foram efetuadas curvas rápidas de luz (RLC) usando o protocolo LC1 pré-programado do FluoroPen. Este protocolo consiste numa sequência de pulsos de intensidade crescente entre 0 aos 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sendo feitas medições de eficiência quântica do Fotossistema II ( $\phi_{\text{PSII}}$ ) no final de cada patamar luminoso (20, 50, 100, 200, 300 e 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), permitindo assim relacionar a eficiência quântica do Fotossistema II (PSII) com a densidade do fluxo de elétrons (PAR) (Duarte *et al.*, 2015a). A taxa de transporte eletrónico (ETR) em diferentes níveis de luz, assim como parâmetros daí derivados, foram calculados como descrito na **Tabela 3** em anexo. Adicionalmente foram ainda efetuadas medições dos transientes da clorofila *a*, através da utilização do protocolo OJIP no FluoroPen. Este protocolo avalia a taxa de redução cinética dos vários componentes do PSII, provocada pela iluminação de uma folha adaptada ao escuro com um feixe de intensidade luminosa saturante (3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), exibindo desta forma um aumento de fluorescência polifásico conhecido como Efeito de Kautsky com inflexões características denominadas pelas letras O-J-I-P. Cada letra reflete diferentes inflexões na curva de indução (Duarte *et al.*, 2015b): fase O a fluorescência de base ( $F_0$ ) e corresponde à fase onde todos os centros de reação (CR) se encontram oxidados, sem redução da quinona a ( $Q_A$ ) (intensidade luminosa que dura 10 ms); o aumento da fluorescência para a fase J corresponde à redução fotoquímica da  $Q_A$  (o aceitador primário de elétrons do PSII) para  $Q_A^-$  (dura cerca de 2 ms); a transição da fase J para a fase I corresponde ao estado de total redução dos centros de reação e transportadores eletrónicos, tais como, a  $Q_A^- Q_B^-$ ,  $Q_A Q_{B2}$  e  $Q_A^- Q_B H_2$  (dura cerca de 2-30 ms); a fase P (que dura 300 ms) corresponde à concentração máxima de  $Q_A^- Q_{B2}$  com o pool de plastoquinol reduzido ao máximo; esta fase reflete ainda o balanço entre a luz incidente no PSII, a taxa de utilização da energia química (potencial) e a taxa de dissipação de energia pela forma de calor (Zhu *et al.*, 2005).

### 3.7 Composição pigmentar

Com o objetivo de avaliar a composição pigmentar, as amostras foliares foram liofilizadas durante 24 h na escuridão a -50 °C. A liofilização prévia das amostras reduz a formação de alómeros,

epímeros e isómeros *cis-trans* dos pigmentos, além dos encontrados nas amostras resultantes do tratamento a que as plantas foram submetidas. A extração de pigmentos ocorreu durante 24 h a -20 °C no escuro para evitar a degradação de pigmentos, usando acetona a 100 % como extratante. Após adição da acetona as amostras foram submetidas 2 minutos a um banho de ultrassons, de forma a garantir a total ruptura das células. Após este período de extração as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 4000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi posteriormente utilizado para análise espectral num espectrofotômetro UV-Vísivel entre 350 e 750 nm (intervalos de 0.5 nm), como descrito em Duarte *et al.* (2015a). Para a análise pigmentar foi utilizado o método de integração gaussiana dos picos espectrais (Küpper *et al.*, 2007), através do qual o espectro de absorvância obtido para cada amostra é comparado com uma biblioteca de espectros gaussianos, usando o *software* SigmaPlot v12.0 (Küpper *et al.*, 2007). Ao usar este método foi possível identificar e quantificar vários pigmentos: clorofila *a*, clorofila *b*, anteraxantina, β-caroteno, auroxantina, luteína, violoxantina e zeaxantina. Com os dados obtidos foi possível calcular o estado de De-epoxidação (DES):

$$3.3 \text{ DES} = \frac{[\text{Anteraxantina}] + [\text{Zeaxantina}]}{[\text{Violaxantina}] + [\text{Anteraxantina}] + [\text{Zeaxantina}]}$$

### 3.8 Antocianinas e betacianinas

De forma a analisar a concentração de antocianinas e betacianinas, as amostras de material vegetal (discos foliares e caule) foram liofilizadas durante 24 h, e a extração feita segundo o método descrito em Duarte *et al.* (2013). De forma a quantificar a concentração de antocianinas, os discos foliares foram homogeneizados numa solução com metanol (100%) e HCl (37 %) (99:1). Para calcular o conteúdo em betacianinas, as folhas e caule foram homogeneizados numa solução de 80 % (v/v) metanol com 50 mM de ácido ascórbico. Para assegurar a destruição total das células, os homogenatos foram submetidos a um banho de ultrassons durante 2 min. Ambas as extrações ocorreram a -20 °C durante 24 h no escuro. Após a extração, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 4000 x g à temperatura de 4 °C, e os sobrenadantes analisados por espectrofotometria UV-Vísivel a 530 e 536 nm (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004), respetivamente para quantificação de antocianinas e betacianinas. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para calcular a concentração de antocianinas e betacianinas totais utilizando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{530 \text{ nm}} = 98.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $\epsilon_{536 \text{ nm}} = 65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respetivamente de acordo com as equações:

$$3.4 \text{ Antocianinas totais } (\mu\text{g g}^{-1} \text{PS}) = \frac{\frac{\text{Abs}_{530 \text{ nm}}}{98,2} \times \text{Volume extração}}{\text{Peso Fresco}}$$

$$3.5 \text{ Betacianinas totais } (\text{meq Betaína} \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{PS}) = \frac{\frac{\text{Abs}_{536 \text{ nm}}}{65} \times \text{Volume extração}}{\text{Peso Fresco}}$$

### 3.9 Hidratos de Carbono

Para a quantificação da concentração de amido presente nas amostras de folha procedeu-se à extração das amostras foliares com metanol a 80 % durante 5 min a 80 °C. Ao sobrenadante do extrato resultante foram adicionados 500 µL de água Mili-Q e armazenado a -20 °C (Extrato 1) (Arrabaça, 1981), tendo o excedente sido utilizado para uma reação de hidrólise ácida com HCl a 30 % durante 15 min a 90 °C. Ao produto desta reação foi adicionado KOH, 5N, tendo-se recolhido o sobrenadante e armazenado a -20 °C (Extrato 2). Utilizaram-se 10 µL de amostra do Extrato 2, aos quais foram adicionados 90 µL de água Mili-Q e 9 mL de ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fervidos durante 10 min a 100 °C de modo a quantificar o amido presente nas amostras, segundo método descrito por Sebastiana *et al.* (2018).

Para a determinação do conteúdo em açúcares solúveis totais, utilizaram-se 100 µL do Extrato 1 aos quais se adicionaram 9 mL de DNS, durante 10 min a 100 °C (Almeida *et al.*, 2007; Arrabaça, 1981).

Para todas as quantificações as leituras foram realizadas por espectrofotometria em leitor de microplacas Bio Tek Modelo Epoch2 (BioTek Instruments, USA), tendo as absorvâncias dos diferentes extratos sido analisadas a 490 nm. A quantificação de açúcares solúveis totais e de amido foi realizada utilizando retas de calibração para a glucose, tendo todas as concentrações sido expressas em miligramas (mg) de equivalentes de glucose por cm<sup>-2</sup>.

### 3.10 Prolina

O conteúdo em prolina foi calculado através do protocolo de Bates *et al.* (1973) onde as amostras de material vegetal foram homogeneizadas em ácido sulfossalicílico a 3 % (m/v) e os respetivos homogenatos centrifugados a 8000 x g durante 15 min a 0 °C. De forma a revelar o conteúdo em prolina, a 2 mL de extrato vegetal foram adicionados 2 mL de ácido acético glacial e 2 mL de ninidrina ácida (preparada anteriormente com 1,25 g de ninidrina, 30 mL de ácido glacial acético e 20 mL de ácido fosfórico a 6M). A reação foi promovida a 100 °C durante 1 h, tendo no final deste período sido parada colocando as amostras em gelo. De forma a extrair o cromóforo gerado pela reação da prolina com o reagente de ninidrina ácida, adicionou-se 4 mL de tolueno à mistura. A absorvância da fração orgânica foi medida no espectrofotómetro a 520 nm e comparada com os valores da curva de calibração elaborada com concentrações conhecidas de prolina. A concentração de prolina foi expressa em micromole por grama de peso fresco (µmol g<sup>-1</sup> PF).

### 3.11 Quantificação de fenóis e flavonoides

Para a quantificação de fenóis e flavonoides procedeu-se à maceração do material vegetal em metanol puro (CH<sub>3</sub>OH) na proporção de 1:100 (m/v). Para a análise fenólica, a 500 µL de extrato vegetal adicionou-se 2,5 mL de reagente Follin-Ciocalteu seguido de 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Duarte *et al.*, 2013). Para a análise dos flavonoides, a 500 µL de extrato adicionaram-se 500 µL de AlCl<sub>3</sub> como descrito por Duarte *et al.* (2013). Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, foram medidas as absorvâncias a 760 nm para a quantificação de fenóis totais, e a 420 nm para a determinação do conteúdo em flavonoides. A concentração de fenóis totais foi calculada através de comparação com a curva de calibração elaborada usando ácido gálico como fenol padrão e expressa em miliequivalentes (meq) de Ácido gálico g<sup>-1</sup> PF. A concentração de flavonoides totais foi calculada através da curva de calibração usando quercetina como flavonoide padrão e expressa em mg de Quercetina g<sup>-1</sup> PF.

### 3.12 Termografia

A temperatura foliar e a abertura estomática foram avaliadas, através de termografia de infravermelhos (técnica não invasiva), utilizando uma câmara FLIR E50bx (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, EUA). Foram fotografadas todas as plantas a igual distância e temperatura envolvente. Posteriormente os resultados foram processados através do programa FLIR Tools v4.1.1.14066.1001, utilizando uma área igual para todas as imagens, de forma a garantir um valor médio de superfície para as amostras em estudo.

### 3.13 Perfil de ácidos gordos

A composição de ácidos gordos presentes nas amostras de folhas foi determinada através da metilação direta das amostras foliares previamente pesadas e preservadas a -80 °C (Duarte *et al.*, 2017, Feijão *et al.*, 2017; Matos *et al.*, 2007). A extração foi realizada com recurso a uma mistura de CH<sub>3</sub>OH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (7:1) durante uma hora a 70 °C. Foi ainda adicionado ao meio de extração um *standard* interno (ácido heptadecanóico – C17:0). Os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) foram posteriormente extraídos com 3 mL de éter de petróleo e 2 mL de água ultra-pura, tendo esta mistura sido centrifugada a 4000 x g durante 5 min à temperatura ambiente. A fase superior (orgânica) resultante foi recolhida e posteriormente evaporada com recurso a corrente de azoto (N<sub>2</sub>) a 37 °C. Após evaporação, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de hexano. Finalmente, este extrato foi analisado através de cromatografia gasosa (3900 Gas Chromatograph; Varian, Palo Alto, CA, USA) num cromatógrafo equipado com um detetor de ionização de chama de hidrogénio numa coluna capilar de 50 m (WCOT Fused Silica, CP-Sil 88 for FAME; Varian) (Duarte *et al.*, 2017; Feijão *et al.*, 2017; Matos *et al.*, 2007). Para análise foi injetado 1 µL de amostra. Os ácidos gordos detetados foram identificados através da comparação com tempos de retenção obtidos com padrões de referência (Sigma-Aldrich). Os

cromatogramas resultantes foram analisados usando o *software* Galaxy v1.9.301.220. A concentração de cada ácido gordo foi calculada por comparação com o padrão interno. O índice de duplas ligações (DBI) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$3.6 \text{ DBI} = \frac{2 \times ((16:1t+18:1)+2 \times 18:2+3 \times 18:3)}{100}$$

### 3.14 Quantificação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica

A quantificação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica foi realizada segundo o método descrito por Heath and Packer (1968). O material vegetal foi homogeneizado com uma solução de 0.1 % (m/v) de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) e 20 % (m/v) Ácido Tricloroacético (TCA) e posteriormente incubado a 90 °C durante 30 min. Os extratos foram arrefecidos em gelo e centrifugados a 3000 x g durante 5 min a 4 °C. A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm (comprimento de onda cuja a absorvância do malondialdeído é máxima) e 600 nm (comprimento de onda utilizado para efetuar a correção para a clorofila e seus produtos de degradação em meio ácido) e os seus valores utilizados no cálculo da concentração de malondialdeído (MDA) usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Heath and Packer, 1968) e expressas em mmol g<sup>-1</sup> PF.

$$3.7 \text{ MDA (mg g}^{-1} \text{ PF)} = \frac{\frac{Abs_{532nm} - Abs_{600nm}}{155} \times \text{Volume extração}}{\text{Peso Fresco}}$$

### 3.15 Análise estatística

Devido à falta de normalidade na distribuição das amostras e de homogeneidade na distribuição dos resíduos, a análise dos dados foi baseada em testes não paramétricos. A fim de comparar os efeitos das exposições testadas, foram feitas análises de variância de Kruskal-Wallis seguidas do teste de Dunn package versão 1.3.5 (Gibbons e Chakraborti, 2006) usando o *software* RStudio versão 3.6.1.

Foram ainda aplicadas análises estatísticas multivariadas usando o *software* Primer 6 (Clarke, 1993). Após normalização, os dados biofísicos, bioquímicos e elementares foram utilizados para construir uma matriz de similaridade baseada no padrão euclidiano de distâncias entre amostras. Às matrizes de similaridade geradas foram depois aplicadas análises canônicas de coordenadas principais (CAP) de forma a gerar modelos estatísticos multivariados baseados nos pacotes bioquímicos com elevado número de variáveis (curvas de indução, perfil de ácidos gordos e perfil iônico). Esta abordagem multivariada mostrou ser insensível a dados heterogêneos e frequentemente usados para comparar amostras de diferentes grupos usando as características intrínsecas de cada grupo (por exemplo, características metabólicas) (Cabrita *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2019, 2017b).

## 4. Resultados

### 4.1 Conteúdo mineral/iônico

O aumento da concentração de NaCl no meio de crescimento hidropônico, resultou, de uma forma geral, num gradiente de acumulação de todos os iões, da raiz para o caule e do caule para folha. Independentemente da variedade de Lablab em estudo, não foram observadas diferenças significativas no teor de sódio (Na) na raiz, caule ou folha (Tabela 1) ao longo do gradiente de salinidade, exceto os indivíduos da variedade HW que registaram um aumento de Na na região do caule, nas plantas expostas a 100 mM NaCl (Tabela 1). Também o teor em cloro (Cl) aumentou em todas as variedades nos indivíduos expostos a 50 mM NaCl. No entanto entre 50 mM NaCl e 100 mM NaCl não se observaram diferenças significativas em nenhuma das partes das plantas analisadas (Tabela 1), em nenhuma das variedades. Com o aumento da concentração de NaCl, ocorreu ainda a diminuição do teor de potássio (K) na raiz, caule e folha (Tabela 1). Esta diminuição foi significativa nas regiões do caule e folha em todas as variedades nos indivíduos submetidos a 50 mM NaCl. Contudo, com o aumento da concentração de 50 mM NaCl para 100 mM NaCl, observou-se um acentuado decréscimo do teor de K nas zonas da raiz, caule e folhas (Tabela 1). O teor de Ca nas plantas expostas a 50 mM NaCl, diminuiu em toda a planta (raiz, caule e folha), com exceção das folhas das plantas da variedade RG (Tabela 1). Em todas as variedades, nas plantas expostas a 100 mM NaCl, o teor de Ca diminuiu nas folhas, mantendo-se, no entanto, semelhante no caule e na raiz, relativamente ao observado em indivíduos expostos a 50 mM NaCl.

À exceção da variedade WF nas folhas, em todas as variedades estudadas verificou-se um aumento de manganês (Mn) na raiz, caule e folha após a exposição a 50 mM NaCl, ainda que não significativo. Contudo, com o aumento da concentração para 100 mM NaCl, observou-se uma diminuição do teor Mn na raiz, caule e folhas. No que se refere à acumulação de ferro (Fe), e com o aumento da concentração exógena de NaCl, verificou-se uma resposta bastante variável dependendo da variedade, tendo-se observado maioritariamente um aumento do teor em Fe na raiz e no caule (Tabela 1), ainda que não significativo em nenhuma variedade ou salinidade. Em simultâneo observou-se uma diminuição da concentração de Fe ao nível da folha (Tabela 1), principalmente na variedade RG onde este decréscimo foi significativo. No que respeita ao níquel (Ni), a resposta por parte das variedades foi bastante diversa, ainda que ao nível da raiz a 50 mM NaCl tenha-se verificado um aumento deste ião na variedade RG (Tabela 1), e ao nível do caule um aumento da presença deste com o aumento de NaCl, também na variedade RG. Contrariamente aos elementos anteriormente descritos, verificou-se um aumento do conteúdo em cobre (Cu) na raiz com o aumento da concentração de NaCl (Tabela 1), ainda que não significativo, em todas as variedades; no caule e nas folhas não foram registadas alterações significativas na concentração de Cu em nenhuma das variedades, à exceção da variedade RG que registou a maior concentração de Cu nas folhas a 50 mM de NaCl. O teor em zinco (Zn) também não

sofreu variações significativas com o aumento de NaCl nas três partes de planta analisadas, ainda que todas as variedades tenham registado um aumento não significativo no caule a 50 mM NaCl (Tabela 1). A acumulação de Zn nas folhas de todas as variedades foi semelhante ao observado para o Cu, com mínimas variações não significativas entre concentrações de NaCl, mas com um aumento na variedade RG a 50 mM NaCl (Tabela 1).

No entanto e considerando que alguns destes elementos estão diretamente interligados, procedeu-se a uma análise multivariada tendo em conta o perfil elementar como um todo (Figura 2). Analisando todas as variedades e órgãos em simultâneo é possível verificar perfis iónicos diferenciais entre variedades, apesar de existir alguma similaridade entre amostras expostas a uma mesma concentração de NaCl (Figura 2 A). Analisando individualmente cada variedade é possível observar um aumento da percentagem de classificação dos grupos formados tendo em conta o nível de exposição e tendo como vetores canónicos o perfil elementar (Figura 2 B-D). Este facto indica que existe uma elevada correlação entre a exposição a NaCl e o perfil iónico nos diferentes órgãos das plantas, sendo específica de cada variedade. Verifica-se ainda que a acumulação intra-variedade nos diferentes órgãos das plantas apresenta também uma dinâmica intraespecífica criando grupos canónicos em que é possível isolar determinado órgão exposto a determinada concentração exógena de NaCl. Este facto é mais evidente nos casos extremos de exposição (0 e 100 mM de NaCl).

Tabela 1 Concentração dos iões Na, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni e Cu na raiz, caule e folha no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas marcam as diferenças significativas entre as salinidades para a mesma variedade e as letras maiúsculas as diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

		<i>WF</i>			<i>HW</i>			<i>RG</i>		
		0 mM	50 mM	100 mM	0 mM	50 mM	100 mM	0 mM	50 mM	100 mM
<i>Na</i>	Raiz	967,05 ± 33,87 <sup>Aa</sup>	1137,27 ± 174,58 <sup>Aa</sup>	1208,85 ± 151,20 <sup>Aa</sup>	1251,87 ± 191,00 <sup>Aa</sup>	1097,01 ± 17,34 <sup>Aa</sup>	1312,82 ± 71,42 <sup>Aa</sup>	1120,83 ± 109,92 <sup>Aa</sup>	1125,89 ± 61,77 <sup>Aa</sup>	1242,08 ± 52,32 <sup>Aa</sup>
	Caule	1423,40 ± 140,93 <sup>Aa</sup>	1414,79 ± 156,96 <sup>Aa</sup>	1544,82 ± 76,47 <sup>Aa</sup>	1342,21 ± 95,99 <sup>Aab</sup>	1227,71 ± 67,54 <sup>Aa</sup>	1604,29 ± 40,36 <sup>Ab</sup>	1186,29 ± 71,70 <sup>Aa</sup>	1316,19 ± 170,44 <sup>Aa</sup>	1370,28 ± 100,63 <sup>Aa</sup>
	Folhas	1069,17 ± 127,84 <sup>Aa</sup>	1869,04 ± 614,32 <sup>Aa</sup>	1512,80 ± 259,17 <sup>Aa</sup>	1263,04 ± 194,38 <sup>Aa</sup>	1093,15 ± 68,54 <sup>Aa</sup>	1380,19 ± 85,23 <sup>Aa</sup>	1173,41 ± 90,09 <sup>Aa</sup>	2300,75 ± 991,18 <sup>Aa</sup>	1347,08 ± 189,70 <sup>Aa</sup>
<i>Cl</i>	Raiz	23,13 ± 2,41 <sup>Aa</sup>	173,10 ± 14,85 <sup>Ab</sup>	100,76 ± 11,05 <sup>Aab</sup>	17,80 ± 3,50 <sup>Aa</sup>	272,42 ± 46,28 <sup>Ab</sup>	115,66 ± 3,29 <sup>Ab</sup>	26,84 ± 5,18 <sup>Aa</sup>	197,95 ± 25,66 <sup>Ab</sup>	118,66 ± 14,84 <sup>Ab</sup>
	Caule	56,39 ± 13,31 <sup>Aa</sup>	247,69 ± 32,17 <sup>Ab</sup>	257,15 ± 22,65 <sup>Ab</sup>	67,35 ± 3,05 <sup>Aa</sup>	314,25 ± 48,15 <sup>Ab</sup>	302,49 ± 44,51 <sup>Ab</sup>	117,55 ± 18,52 <sup>Ba</sup>	287,41 ± 58,63 <sup>Ab</sup>	421,53 ± 47,51 <sup>Bb</sup>
	Folhas	73,80 ± 7,98 <sup>Aa</sup>	774,44 ± 250,40 <sup>Ab</sup>	924,34 ± 90,96 <sup>Ab</sup>	52,65 ± 4,70 <sup>Aa</sup>	828,84 ± 107,75 <sup>Ab</sup>	1379,84 ± 312,20 <sup>Ab</sup>	65,23 ± 9,69 <sup>Aa</sup>	2198,49 ± 1173,70 <sup>Ab</sup>	974,63 ± 144,07 <sup>Ab</sup>
<i>K</i>	Raiz	5294,60 ± 367,09 <sup>Aa</sup>	4871,62 ± 371,89 <sup>Aa</sup>	694,00 ± 187,56 <sup>Ab</sup>	5525,43 ± 376,67 <sup>Aa</sup>	4677,23 ± 604,08 <sup>Aa</sup>	983,89 ± 169,01 <sup>Ab</sup>	5597,49 ± 581,91 <sup>Aa</sup>	4040,78 ± 391,79 <sup>Aa</sup>	1189,07 ± 238,98 <sup>Ab</sup>
	Caule	4873,06 ± 834,47 <sup>Aa</sup>	1981,71 ± 389,99 <sup>Aab</sup>	904,65 ± 94,78 <sup>Ab</sup>	7254,85 ± 427,26 <sup>Aa</sup>	1732,40 ± 114,57 <sup>Aab</sup>	669,83 ± 82,01 <sup>Ab</sup>	9800,82 ± 593,41 <sup>Ba</sup>	1686,85 ± 394,53 <sup>Ab</sup>	845,78 ± 91,91 <sup>Ab</sup>
	Folhas	5888,31 ± 377,80 <sup>Aa</sup>	2874,79 ± 394,48 <sup>Ab</sup>	2057,15 ± 196,00 <sup>Ab</sup>	7172,46 ± 391,93 <sup>Ba</sup>	6518,94 ± 129,30 <sup>Ba</sup>	4140,67 ± 226,59 <sup>Bb</sup>	7209,32 ± 437,83 <sup>Ba</sup>	8379,67 ± 4907,49 <sup>ABab</sup>	3099,69 ± 376,98 <sup>ABb</sup>
<i>Ca</i>	Raiz	871,43 ± 96,71 <sup>Aa</sup>	740,13 ± 171,64 <sup>Aa</sup>	1303,19 ± 406,12 <sup>Aa</sup>	994,45 ± 192,93 <sup>Aa</sup>	734,58 ± 56,38 <sup>Aa</sup>	762,22 ± 92,06 <sup>Aa</sup>	1039,63 ± 147,95 <sup>Aa</sup>	799,92 ± 105,06 <sup>Aa</sup>	716,64 ± 215,10 <sup>Aa</sup>
	Caule	2614,59 ± 418,69 <sup>Aa</sup>	1687,05 ± 215,58 <sup>Aa</sup>	1639,37 ± 130,09 <sup>Aa</sup>	3611,98 ± 322,36 <sup>ABa</sup>	2130,27 ± 219,42 <sup>Ab</sup>	2067,95 ± 222,25 <sup>ABb</sup>	4294,83 ± 217,39 <sup>Ba</sup>	1667,30 ± 310,42 <sup>Ab</sup>	2415,27 ± 159,23 <sup>Bb</sup>
	Folha	3344,52 ± 472,66 <sup>Aa</sup>	1385,30 ± 269,47 <sup>Ab</sup>	993,22 ± 191,95 <sup>Ab</sup>	2025,23 ± 218,96 <sup>Aa</sup>	2463,27 ± 384,22 <sup>Aa</sup>	1028,82 ± 822,36 <sup>Ab</sup>	3782,00 ± 822,36 <sup>Aa</sup>	5975,85 ± 3892,24 <sup>ABab</sup>	1054,43 ± 166,99 <sup>Ab</sup>
<i>Mn</i>	Raiz	45,24 ± 7,78 <sup>ABab</sup>	63,68 ± 8,61 <sup>Aa</sup>	23,09 ± 2,45 <sup>Ab</sup>	34,05 ± 2,64 <sup>ABab</sup>	60,95 ± 12,54 <sup>Aa</sup>	13,32 ± 1,4 <sup>Bb</sup>	57,11 ± 5,90 <sup>Ba</sup>	71,57 ± 9,47 <sup>Aa</sup>	18,64 ± 2,96 <sup>ABa</sup>
	Caule	6,28 ± 0,96 <sup>ABab</sup>	12,38 ± 2,40 <sup>Aa</sup>	2,65 ± 0,35 <sup>Ab</sup>	7,77 ± 0,58 <sup>ABa</sup>	8,43 ± 0,63 <sup>Aa</sup>	3,85 ± 0,53 <sup>Ab</sup>	9,67 ± 0,75 <sup>Ba</sup>	11,09 ± 2,98 <sup>Aa</sup>	2,95 ± 0,25 <sup>Ab</sup>
	Folhas	36,67 ± 5,91 <sup>Aa</sup>	29,93 ± 3,94 <sup>Aa</sup>	15,70 ± 2,53 <sup>Ab</sup>	26,42 ± 1,08 <sup>Aa</sup>	36,54 ± 8,85 <sup>Aa</sup>	14,27 ± 1,40 <sup>Ab</sup>	40,61 ± 8,35 <sup>Aa</sup>	130,09 ± 83,02 <sup>Aa</sup>	13,31 ± 2,41 <sup>Ab</sup>
<i>Fe</i>	Raiz	503,81 ± 87,23 <sup>Aa</sup>	511,96 ± 191,83 <sup>Aa</sup>	1170,52 ± 279,70 <sup>Aa</sup>	687,26 ± 67,10 <sup>Aa</sup>	830,19 ± 66,44 <sup>ABa</sup>	735,65 ± 88,84 <sup>ABa</sup>	440,95 ± 109,85 <sup>Aa</sup>	1004,90 ± 172,66 <sup>Ba</sup>	535,33 ± 102,52 <sup>Ba</sup>
	Caule	15,24 ± 3,49 <sup>Aa</sup>	13,58 ± 1,89 <sup>Aa</sup>	36,04 ± 19,62 <sup>Aa</sup>	10,69 ± 0,92 <sup>Aa</sup>	29,54 ± 10,29 <sup>Aa</sup>	39,27 ± 23,01 <sup>Aa</sup>	16,76 ± 2,75 <sup>Aa</sup>	18,91 ± 4,04 <sup>Aa</sup>	14,28 ± 2,16 <sup>Aa</sup>
	Folhas	66,72 ± 12,46 <sup>ABa</sup>	40,15 ± 9,96 <sup>Aa</sup>	68,08 ± 30,05 <sup>Aa</sup>	38,65 ± 30,05 <sup>Aa</sup>	38,62 ± 7,19 <sup>Aa</sup>	28,97 ± 6,04 <sup>Aa</sup>	190,81 ± 123,37 <sup>Ba</sup>	67,39 ± 23,97 <sup>Aa</sup>	25,23 ± 2,62 <sup>Aa</sup>
<i>Ni</i>	Raiz	0,16 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,19 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	0,16 ± 0,04 <sup>ABa</sup>	0,15 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	0,26 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	0,07 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,49 ± 0,04 <sup>Bb</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>Ba</sup>
	Caule	0,47 ± 0,23 <sup>Aa</sup>	0,46 ± 0,09 <sup>ABa</sup>	0,35 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	0,54 ± 0,10 <sup>ABa</sup>	0,36 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	0,98 ± 0,13 <sup>Ba</sup>	0,77 ± 0,14 <sup>Bab</sup>	0,48 ± 0,08 <sup>Ab</sup>
	Folhas	0,69 ± 0,16 <sup>ABa</sup>	0,30 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	0,48 ± 0,14 <sup>Aa</sup>	0,29 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	0,70 ± 0,07 <sup>Bb</sup>	0,43 ± 0,05 <sup>ABab</sup>	0,89 ± 0,25 <sup>Ba</sup>	1,45 ± 0,73 <sup>Ba</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>Ab</sup>
<i>Cu</i>	Raiz	37,67 ± 2,36 <sup>ABa</sup>	43,59 ± 7,33 <sup>Aa</sup>	50,38 ± 7,17 <sup>Aa</sup>	45,39 ± 4,73 <sup>Aa</sup>	52,63 ± 3,52 <sup>ABa</sup>	42,78 ± 3,00 <sup>Aa</sup>	33,33 ± 1,54 <sup>Ba</sup>	64,02 ± 7,86 <sup>Ba</sup>	42,44 ± 8,23 <sup>Aa</sup>
	Caule	10,08 ± 8,83 <sup>Aa</sup>	1,79 ± 0,23 <sup>Aa</sup>	1,54 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	1,20 ± 0,14 <sup>Aa</sup>	1,57 ± 0,24 <sup>Aa</sup>	1,81 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	1,41 ± 0,29 <sup>Aa</sup>	2,06 ± 0,28 <sup>Aa</sup>	1,73 ± 0,20 <sup>Aa</sup>
	Folhas	1,65 ± 0,18 <sup>Aa</sup>	1,57 ± 0,36 <sup>Aa</sup>	1,27 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	1,94 ± 0,32 <sup>Aa</sup>	1,80 ± 0,18 <sup>ABa</sup>	1,95 ± 0,30 <sup>Ba</sup>	1,68 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	6,09 ± 3,59 <sup>Ba</sup>	1,55 ± 0,08 <sup>ABa</sup>
<i>Zn</i>	Raiz	76,71 ± 6,37 <sup>Aa</sup>	97,58 ± 8,42 <sup>Aa</sup>	113,91 ± 14,99 <sup>Aa</sup>	122,57 ± 11,97 <sup>Ba</sup>	91,86 ± 18,87 <sup>Aa</sup>	80,10 ± 19,13 <sup>Aa</sup>	97,02 ± 6,34 <sup>ABa</sup>	108,95 ± 11,31 <sup>Aa</sup>	91,90 ± 14,64 <sup>Aa</sup>
	Caule	35,57 ± 12,74 <sup>Aa</sup>	52,56 ± 6,73 <sup>Aa</sup>	38,76 ± 5,43 <sup>Aa</sup>	41,26 ± 5,31 <sup>Aa</sup>	52,51 ± 4,92 <sup>Aa</sup>	40,89 ± 6,46 <sup>Aa</sup>	51,87 ± 9,16 <sup>Aa</sup>	60,60 ± 13,14 <sup>Aa</sup>	47,29 ± 6,17 <sup>Aa</sup>
	Folhas	27,80 ± 4,21 <sup>Aa</sup>	30,93 ± 10,86 <sup>Aa</sup>	21,88 ± 2,18 <sup>Aa</sup>	26,75 ± 3,95 <sup>Aa</sup>	27,47 ± 5,25 <sup>ABa</sup>	19,00 ± 1,43 <sup>Aa</sup>	31,32 ± 5,07 <sup>Ab</sup>	132,35 ± 84,43 <sup>Ba</sup>	20,10 ± 1,95 <sup>Ab</sup>

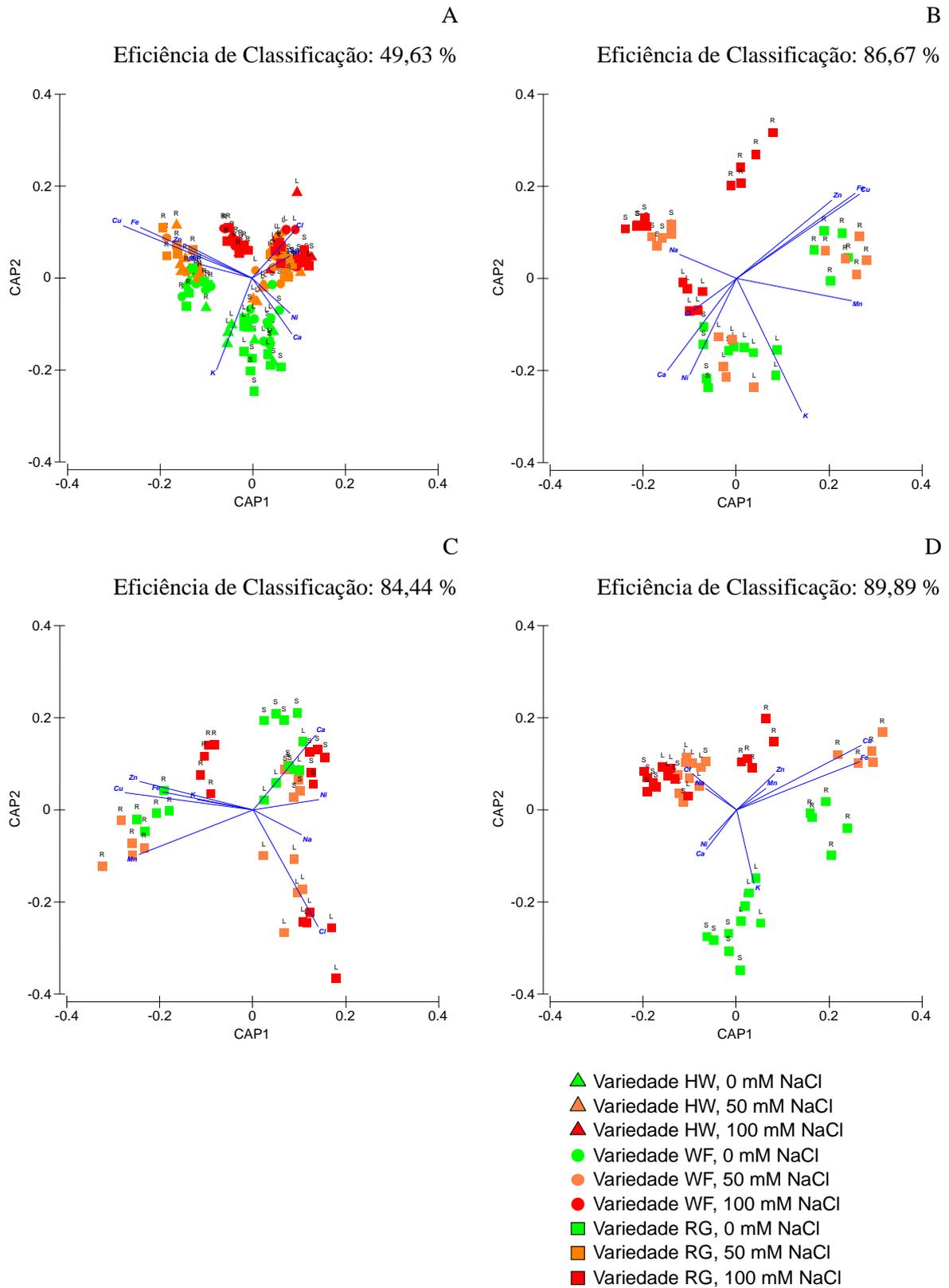


Figura 2 Análise canônica de coordenadas principais (CAP) aplicada à concentração elementar na raiz (R – root), caule (S – shoot) e folha (L – leaf) (A) em todas as variedades testadas, e individualmente nas variedades WF (B), HW (C) e RG (D) no final do período de exposição a NaCl

## 4.2 Conteúdo hídrico

No que respeita ao teor hídrico das plantas sujeitas a diferentes salinidades, apenas a variedade RG registou um aumento do conteúdo hídrico do caule quando exposta a 50 mM e 100 mM de NaCl (Figura 3 A) em comparação com as plantas que cresceram a 0 mM NaCl; as folhas das plantas das variedades WF e HW apresentaram um aumento significativo do seu conteúdo hídrico (Figura 3 B) quando expostas a 50 mM e a 100 mM de NaCl.

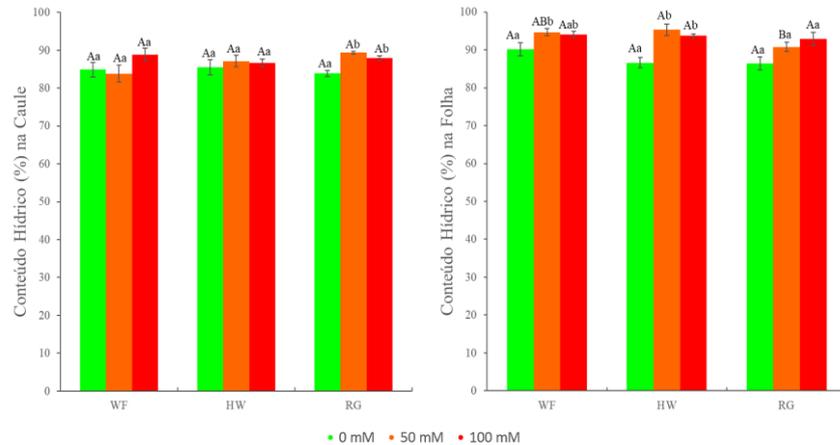


Figura 3 A e B – Conteúdo hídrico em percentagem no caule (A) e folha (B) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

## 4.3 Área foliar

O aumento da concentração de NaCl até 100 mM levou a uma diminuição da área foliar nos indivíduos das variedades WF e HW (Figura 4), comparativamente à área foliar das plantas que cresceram a 0 mM NaCl. Esta diminuição foi mais demarcada na variedade HW, ainda que, comparativamente às plantas da variedade WF não se verificarem diferenças significativas. Os indivíduos da variedade RG não apresentaram variações significativas de área foliar com o aumento da concentração de NaCl. Contudo, os indivíduos da variedade RG a 100 mM de NaCl registaram a maior área foliar de entre as variedades estudadas.

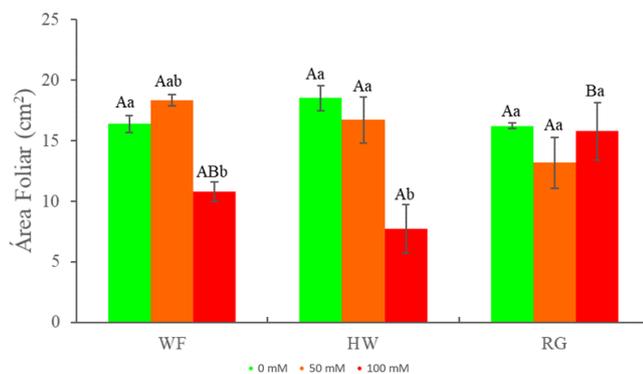


Figura 4 Área foliar no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

#### 4.4 Fotobiologia

Verificou-se uma disparidade na taxa de transporte eletrônico relativo para a fotossíntese (rETR) nas três variedades em estudo, ainda que, para todas elas, as plantas expostas a 100 mM NaCl apresentaram um acentuado decréscimo (Figura 5 A – C). Nos indivíduos da variedade WF a descida da rETR foi gradual com o aumento da concentração de NaCl e mais acentuada para níveis de intensidade luminosa de maior intensidade (Figura 5 A). No que diz respeito aos indivíduos pertencentes à variedade HW, o maior valor de rETR foi observado a 50 mM NaCl (Figura 5 B). Para os indivíduos da variedade RG, verificou-se uma sobreposição de rETR nas plantas expostas a 50 mM NaCl quando comparado com o mesmo parâmetro em indivíduos expostos a 0 mM NaCl (Figura 5 C). A taxa de transporte eletrônico máxima (ETR<sub>max</sub>) diminuiu significativamente (Figura 5 D) em todas as variedades quando expostas a 100 mM de NaCl, assim como a eficiência fotossintética ( $\alpha$ , Figura 5 E), contudo foram os indivíduos da variedade HW que demonstraram uma diminuição mais significativa de  $\alpha$ .

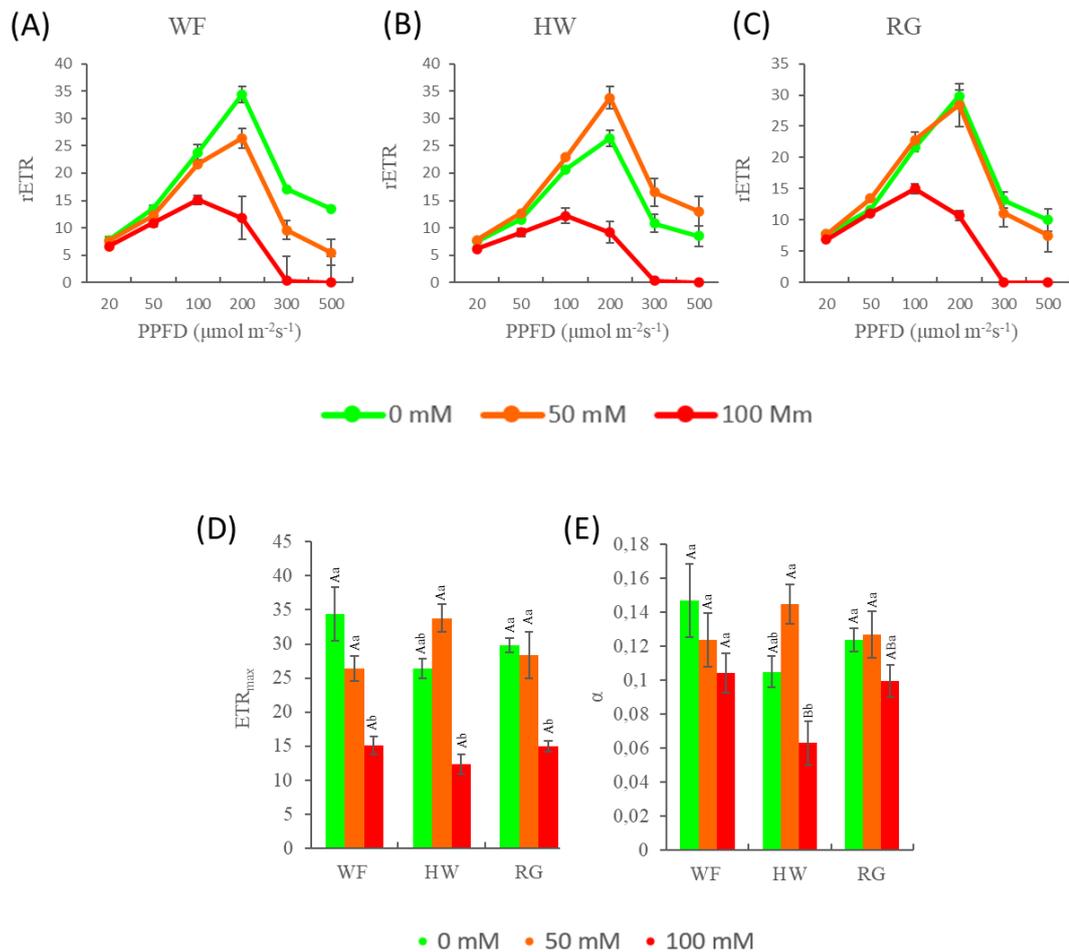


Figura 5 **A, B e C** – Curva rápida de luz da taxa de transporte eletrônico (rETR); **D** – Taxa de transporte eletrônico máxima (rETR<sub>max</sub>); **E** – Eficiência fotossintética ( $\alpha$ ) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

As curvas de Kautsky, demonstram uma clara diferença entre concentrações de NaCl nas três variedades (Figura 6). Foi possível observar não só alterações da intensidade dos valores de fluorescência obtidos ao longo da curva de indução, mas também da forma das curvas, devido a alterações nos pontos de inflexão das mesmas. Estas alterações traduzem-se em variações em diversos parâmetros fotoquímicos derivados destas curvas e com relevância fisiológica.

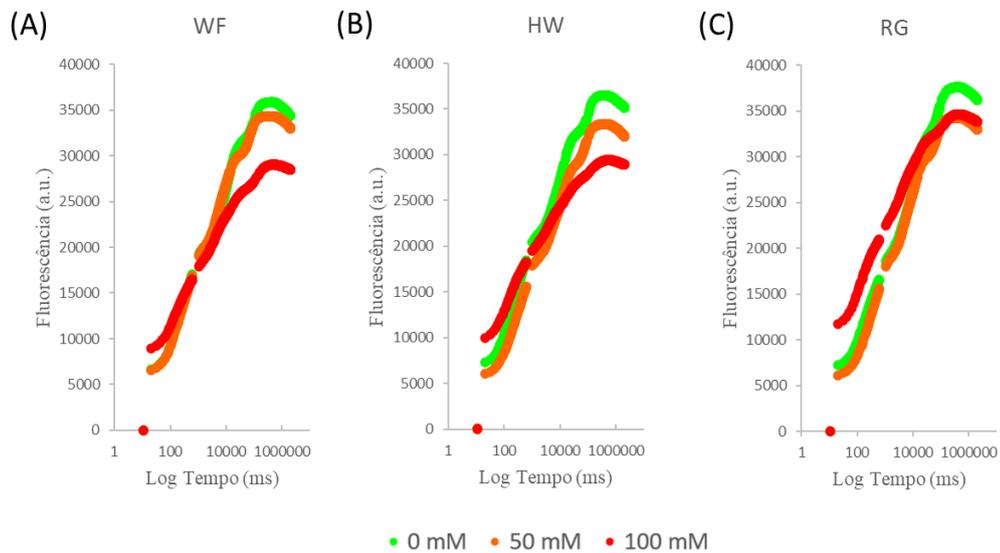


Figura 6 A, B e C – Curva de Kautsky no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média, N = 5)

Utilizando todos os pontos de fluorescência obtidos nas curvas de indução como potenciais descritores da exposição das variedades a diferentes níveis de NaCl, foi possível proceder a uma análise multivariada das amostras. Numa primeira abordagem é possível verificar que os valores de fluorescência observados discriminam eficientemente (eficiência de classificação: 97,78 %) a exposição a diferentes níveis de NaCl sendo as diferentes amostras das diferentes variedades agrupadas por nível de exposição (Figura 7 A). Avaliando cada variedade individualmente (Figura 7 B-D) é observada a mesma discriminação sendo que no caso, da variedade RG, a utilização dos dados de fluorescência obtidos a partir das curvas de indução, permite identificar corretamente 100% das amostras testadas.

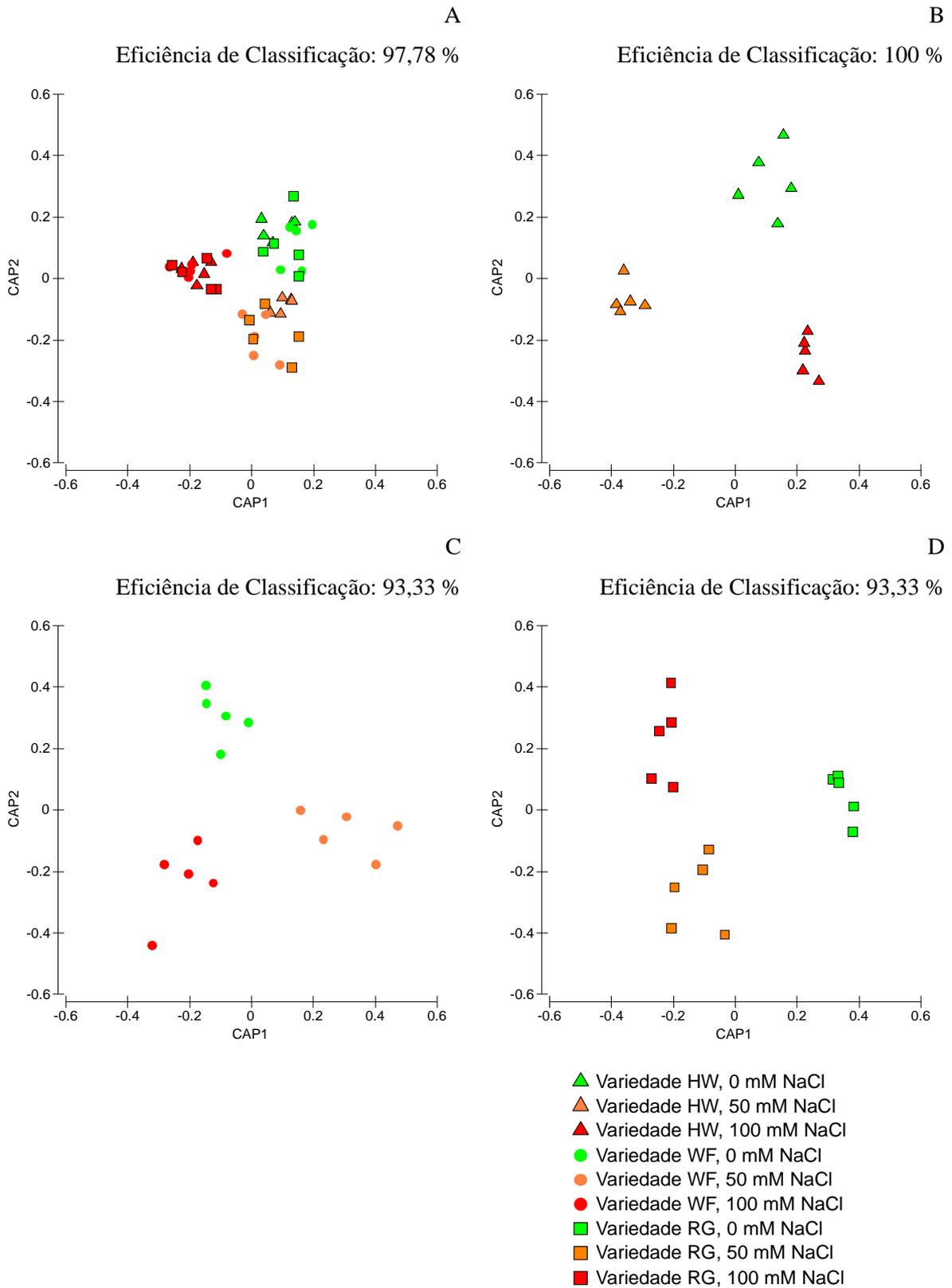


Figura 7 Análise canônica de coordenadas principais (CAP) aplicada às curvas de indução de fluorescência final do período de exposição a NaCl em todas as variedades testadas (A) e individualmente nas variedades HW (B), WF (C) e RG (D)

Ao nível dos complexos geradores de oxigênio ativo (OECs), localizados do lado dador do PSII, verificou-se uma diminuição da sua atividade nas variedades WF e RG exposta a 100 mM NaCl, contrariamente ao observado na variedade HW onde ocorreu um aumento desta atividade nas plantas expostas à mesma concentração de NaCl exógeno (Figura 8 A). O aumento da concentração de NaCl conduziu ainda a um aumento da taxa de fecho dos centros de reação do PSII ( $M_o$ ), especialmente significativo na variedade RG exposta a 100 mM NaCl (Figura 8 B). Foi observado um aumento significativo da taxa de *turnover* dos centros de reação (N) (Figura 8 C), nas plantas das variedades WF e HW sujeitas a 100 mM de NaCl. A mesma tendência verificou-se relativamente ao turnover de redox múltiplo das quinonas ( $S_M$ , Figura 8 D) onde os indivíduos das variedades WF e HW demonstraram um aumento deste parâmetro com o aumento da concentração de NaCl para 100 mM.

A dimensão do pool de quinonas oxidadas (Area, Figura 8 E) não sofreu alterações significativas com o aumento da concentração de NaCl em nenhuma das variedades testadas. No entanto, verificou-se uma diminuição da conectividade entre as antenas do PSII, demonstrada pelo aumento do parâmetro  $P_G$  (Figura 8 F). Esta resposta foi mais evidente a 50 mM NaCl nos indivíduos da variedade HW, e a 100 mM NaCl para todas as variedades.

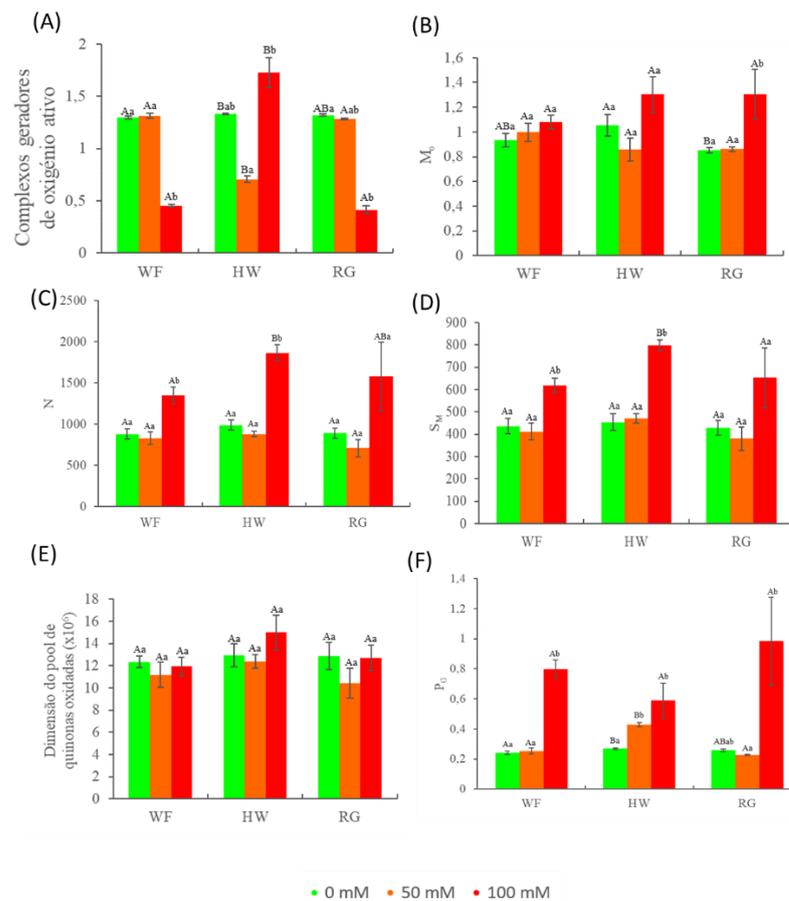


Figura 8 A – Complexos geradores de oxigênio ativo (OECs); B – taxa de fecho dos centros de reação do PSII ( $M_o$ ); C - taxa de turnover dos centros de reação (N); D – turnover redox múltiplo das quinonas ( $S_M$ ); E – Dimensão do pool de quinonas oxidadas  $\times 10^6$  (Area); F – Medida de conectividade das antenas fotossintéticas ( $P_G$ ) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

Relativamente aos fluxos de energia fenológicos, foi também possível observar algumas diferenças substanciais com o aumento da concentração de NaCl (Figura 9). O fluxo de energia absorvida (ABS/CS) e de energia dissipada (DI/CS) aumentaram significativamente em todas as variedades quando expostas a 100 mM NaCl (Figura 9 A e B). O fluxo de energia aprisionado (TR/CS) (Figura 9 C) sofreu poucas variações, com exceção dos indivíduos da variedade HW expostos a 50 mM NaCl que demonstraram sofrer uma diminuição deste fluxo, e dos indivíduos da variedade RG sujeitos a 100 mM NaCl que sofreram um aumento significativo deste fluxo. Uma resposta semelhante foi observada com o fluxo de energia transportada (ET/CS), onde apenas os indivíduos da variedade RG mostraram uma diminuição significativa deste fluxo quando sujeitos a 50 mM NaCl (Figura 9 D).

Os centros de reação dos fotossistemas são estruturas importantes para o correto funcionamento do processo fotossintético. Quando em excesso de energia, ou sob stresse abiótico, os centros de reação ficam menos disponíveis a receber fotões uma vez que se encontram saturados. Observou-se uma diminuição significativa do número de centros de reação oxidados por seção transversal (RC/CS) as plantas das variedades WF e RG expostas a 100 mM NaCl e nos indivíduos da variedade HW sujeitos a 50 mM NaCl (Figura 9 E). Com o aumento da concentração de NaCl, observou-se ainda que a densidade de centros de reação nas antenas (RC/ABS) sofreu um aumento quando expostos a 50 mM NaCl nas plantas das variedades HW e RG, sendo possível observar um decréscimo nos indivíduos expostos a 100 mM de NaCl para valores semelhantes aos observados nas plantas cultivadas na ausência de NaCl (Figura 9 F). Neste caso em específico, a variedade WF não registou diferenças significativas quando exposta a 50 mM de NaCl, sofrendo, no entanto, uma diminuição da densidade de centros de reação nas antenas fotossintéticas nos indivíduos expostos a 100 mM de NaCl.

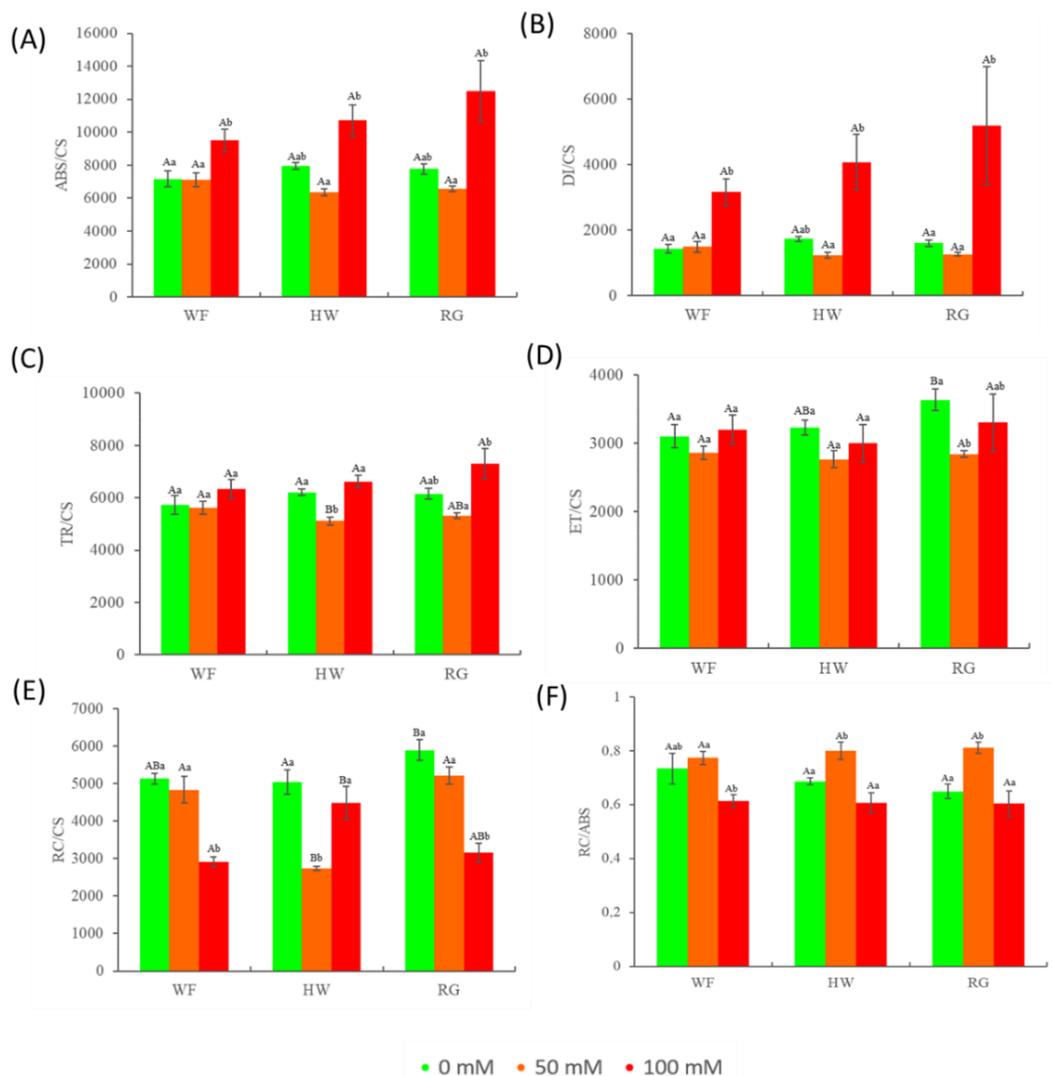


Figura 9 **A** – Fluxo de energia absorvida (ABS/CS); **B** – Fluxo de energia dissipada (DI/CS); **C** - Fluxo de energia preso (TR/CS); **D** – Fluxo de energia transportada (ET/CS); **E** – Centros de reação disponíveis (RC/CS); **F** – Centros de reação disponíveis (RC/ABS) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

As curvas de Kautsky para além dos parâmetros anteriormente descritos podem ainda dar informação relativa à contribuição dos aceitadores e dadores de elétrons dos fotossistemas para os processos fotoquímicos primários. No caso da contribuição do transporte eletrónico desde o plastoquinol até aos aceitadores de elétrons do PSI ( $RE_0/RC$ , Figura 10 A) e da contribuição da redução dos aceitadores de elétrons do PSI ( $\delta_{R_0}/(1-\delta_{R_0})$ , Figura 10 B), o aumento da concentração de NaCl não provocou alterações significativas em nenhuma das variedades estudadas. De forma semelhante, a contribuição das reações da fase escura entre a quinona A ( $Q_A$ ) e a plastoquinona ( $(\psi_0/(1-\psi_0))$ , Figura 10 C) também não sofreram alterações significativas, excetuando para as plantas da variedade RG expostas a 100 mM de NaCl, onde foi possível verificar uma diminuição deste parâmetro face ao registado a 0 mM e a 50 mM de NaCl. Contrariamente ao parâmetro anterior, a contribuição das reações

à luz para a fotoquímica primária ( $TR_0/DI_0$ ) diminuiu significativamente nas variedades WF e HW (Figura 10 D) quando expostas a 100 mM de NaCl.

A constante de equilíbrio redox entre o PSII/PSI ( $\psi_{E_0}/(1 - \psi_{E_0})$ ) foi inferior a um em todas as variedades (Figura 10 E), e foi ainda mais baixa nas plantas expostas a 100 mM NaCl. Este decréscimo no equilíbrio redox demonstra uma mudança de sentido das reações no sentido do PSI.

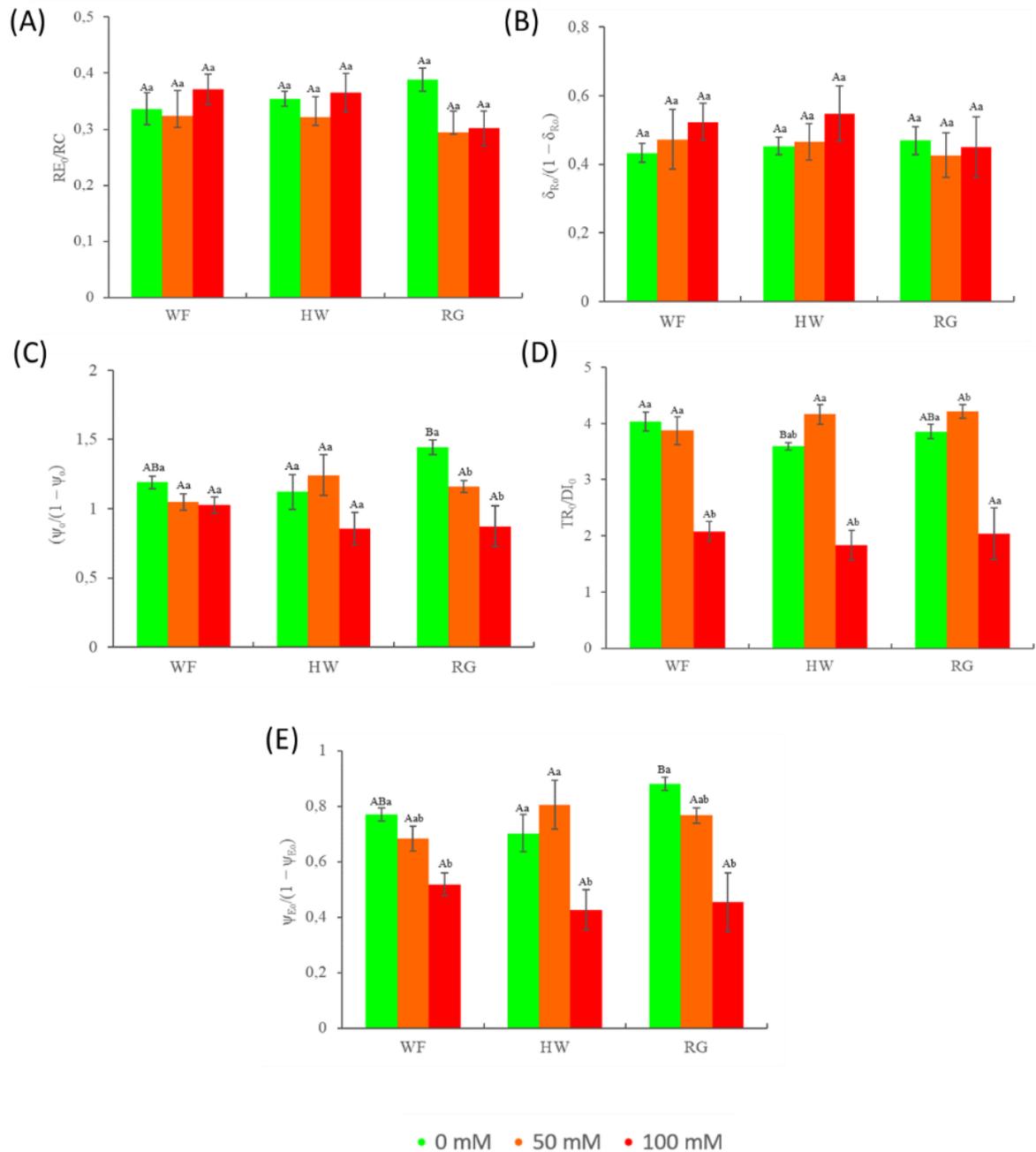


Figura 10 Parâmetros derivados das curvas de Kautsky relativos ao PSII e PSI: **A** – Contribuição do transporte eletrônico desde o plastoquinol até aos aceitadores de elétrons do PSI ( $RE_0/RC$ ); **B** – Contribuição da redução dos aceitadores de elétrons do PSI ( $\delta Ro/(1 - \delta Ro)$ ); **C** – Contribuição das reações da fase escura entre a quinona A ( $Q_A$ ) e a plastoquinona ( $\psi_o/(1 - \psi_o)$ ); **D** – Contribuição das reações à luz para a fotoquímica primária ( $TR_0/DI_0$ ); **E** – Constante de equilíbrio redox entre o PSII/PSI ( $\psi_{E_0}/(1 - \psi_{E_0})$ ) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

## 4.4 Perfil pigmentar

### 4.4.1 Clorofilas e carotenóides

Em todas as variedades, observou-se uma diminuição da concentração de clorofila *a* e clorofila *b* (Tabela 2) com o aumento da concentração de NaCl. O mesmo foi observado para a concentração de feofitina *a* e feofitina *b*, com exceção das plantas da variedade RG em que se observou um aumento das feofotinas nas plantas expostas a 50 mM e a 100 mM NaCl (Tabela 2), embora de forma não significativa.

Esta resposta foi semelhante também na concentração de carotenoides (neoxantina, anteraxantina, violoxantina, zeaxantina,  $\beta$ -caroteno e luteína), nos quais, em todas as variedades, ocorreu uma diminuição das concentrações, com o aumento da concentração de NaCl (Tabela 2). Exceção para a concentração de auroxantina que apresentou um aumento ao longo do gradiente de concentração de NaCl, principalmente nas plantas das variedades WF e RG, onde a concentração de auroxantina nas folhas, aumentou cerca de 14 a 17 vezes.

O conteúdo total de clorofilas e carotenoides, diminuiu com o aumento da concentração de NaCl em todas as variedades (Figura 11 A e B). Nas plantas das variedades WF e RG foi observado um aumento do rácio carotenoides/clorofila de 0 mM para 50 mM NaCl. Contrariamente, os indivíduos da variedade HW, não se verificaram diferenças significativas neste parâmetro. Para todas as variedades em estudo, foi observada uma diminuição de carotenoides/clorofila nos indivíduos expostos a 100 mM NaCl, comparativamente com as plantas sujeitas a 50 mM de NaCl (Figura 11 C). No entanto, em todas as variedades, o rácio carotenoides/clorofila a 100 mM NaCl foi superior ao observado a 0 mM NaCl.

O estado de de-epoxidação (DES), sofreu um aumento nos indivíduos das variedades WF e HW quando expostos a 50 mM NaCl, no entanto para as plantas da variedade RG verificou-se um decréscimo deste índice. Em todas as variedades, a exposição a 100 mM NaCl induziu valores de índice DES semelhantes aos observados nos indivíduos cultivados na ausência de NaCl (Figura 11 D).

### 4.4.2 Antocianinas e Betacianinas

O conteúdo em antocianinas diminuiu em todas as variedades estudadas nos indivíduos expostos a 50 mM NaCl, comparativamente ao conteúdo observado a 0 mM NaCl (Figura 12 A). Já o conteúdo em betacianinas foi bastante variável dependendo da variedade, da concentração de NaCl aplicada, e também, da zona da planta em estudo – caule ou folha. Apenas a variedade HW demonstrou um decréscimo significativo na concentração destes compostos nas plantas expostas a 100 mM de NaCl na região do caule (Figura 12 B) e nas folhas quando expostas a 50 mM e 100 mM de NaCl (Figura 12 C)

Tabela 2 Conteúdo de Clorofilas e carotenóides em  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS no final do período de stresse nas variedades WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N=5, as letras marcam as diferenças significativas entre as salinidades para a mesma variedade, para o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

	<i>WF</i>			<i>HW</i>			<i>RG</i>		
	0 mM	50 mM	100 mM	0 mM	50 mM	100 mM	0 mM	50 mM	100 mM
<i>Clorofila a</i>	545,33 $\pm$ 85,83 <sup>Aa</sup>	52,77 $\pm$ 7,40 <sup>Ab</sup>	118,36 $\pm$ 28,54 <sup>Ab</sup>	394,00 $\pm$ 131,97 <sup>Aa</sup>	126,93 $\pm$ 42,06 <sup>Aa</sup>	96,20 $\pm$ 23,48 <sup>Aa</sup>	474,16 $\pm$ 57,73 <sup>Aa</sup>	120,76 $\pm$ 42,33 <sup>Ab</sup>	140,90 $\pm$ 48,10 <sup>Ab</sup>
<i>Clorofila b</i>	206,97 $\pm$ 30,64 <sup>Aa</sup>	21,80 $\pm$ 2,40 <sup>Ab</sup>	51,38 $\pm$ 11,29 <sup>Aab</sup>	157,85 $\pm$ 58,08 <sup>Aa</sup>	52,08 $\pm$ 18,43 <sup>Aa</sup>	39,78 $\pm$ 7,90 <sup>Aa</sup>	161,11 $\pm$ 20,99 <sup>Aa</sup>	51,43 $\pm$ 19,08 <sup>Ab</sup>	56,95 $\pm$ 13,83 <sup>Ab</sup>
<i>Feofitina a</i>	27,76 $\pm$ 7,69 <sup>Aa</sup>	10,55 $\pm$ 2,97 <sup>Aa</sup>	8,13 $\pm$ 2,53 <sup>Aa</sup>	45,09 $\pm$ 5,68 <sup>Aa</sup>	26,57 $\pm$ 8,44 <sup>Aab</sup>	6,48 $\pm$ 3,15 <sup>Ab</sup>	6,43 $\pm$ 2,19 <sup>Ba</sup>	21,17 $\pm$ 9,79 <sup>Aa</sup>	11,62 $\pm$ 3,90 <sup>Aa</sup>
<i>Feofitina b</i>	32,64 $\pm$ 13,21 <sup>Aa</sup>	12,99 $\pm$ 2,61 <sup>Aa</sup>	10,25 $\pm$ 3,10 <sup>Aa</sup>	86,54 $\pm$ 22,53 <sup>Aa</sup>	35,32 $\pm$ 15,87 <sup>Aab</sup>	7,10 $\pm$ 4,35 <sup>Ab</sup>	3,44 $\pm$ 3,44 <sup>Ba</sup>	32,16 $\pm$ 14,76 <sup>Aa</sup>	16,16 $\pm$ 7,45 <sup>Aa</sup>
<i>Anteraxantina</i>	20,89 $\pm$ 2,80 <sup>Aa</sup>	6,18 $\pm$ 1,32 <sup>Ab</sup>	5,36 $\pm$ 0,59 <sup>Ab</sup>	21,09 $\pm$ 3,19 <sup>Aa</sup>	11,88 $\pm$ 1,90 <sup>Aab</sup>	5,82 $\pm$ 0,75 <sup>Ab</sup>	18,42 $\pm$ 2,92 <sup>Aa</sup>	9,70 $\pm$ 3,74 <sup>Aa</sup>	8,83 $\pm$ 1,70 <sup>Aa</sup>
<i><math>\beta</math>-caroteno</i>	26,89 $\pm$ 3,27 <sup>Aa</sup>	8,58 $\pm$ 0,81 <sup>Ab</sup>	10,46 $\pm$ 1,98 <sup>Ab</sup>	30,22 $\pm$ 5,45 <sup>Aa</sup>	13,37 $\pm$ 1,86 <sup>Ab</sup>	8,35 $\pm$ 1,05 <sup>Ab</sup>	23,20 $\pm$ 3,27 <sup>Aa</sup>	13,04 $\pm$ 4,00 <sup>Aa</sup>	12,66 $\pm$ 3,02 <sup>Aa</sup>
<i>Luteína</i>	27,53 $\pm$ 4,63 <sup>Aa</sup>	5,77 $\pm$ 1,57 <sup>Ab</sup>	8,23 $\pm$ 1,79 <sup>Ab</sup>	26,89 $\pm$ 5,84 <sup>Aa</sup>	12,55 $\pm$ 1,62 <sup>Ab</sup>	9,72 $\pm$ 1,38 <sup>Ab</sup>	28,09 $\pm$ 3,73 <sup>Aa</sup>	9,69 $\pm$ 4,36 <sup>Ab</sup>	11,18 $\pm$ 2,19 <sup>Ab</sup>
<i>Neoxantina</i>	30,52 $\pm$ 5,67 <sup>Aa</sup>	5,11 $\pm$ 1,09 <sup>Aab</sup>	2,05 $\pm$ 0,84 <sup>Ab</sup>	17,44 $\pm$ 2,56 <sup>Aa</sup>	8,60 $\pm$ 2,17 <sup>Aa</sup>	2,57 $\pm$ 0,33 <sup>ABb</sup>	33,92 $\pm$ 9,60 <sup>Aa</sup>	8,27 $\pm$ 1,34 <sup>Ab</sup>	10,39 $\pm$ 6,22 <sup>Bb</sup>
<i>Violaxantina</i>	23,21 $\pm$ 4,48 <sup>Aa</sup>	3,78 $\pm$ 1,62 <sup>Ab</sup>	4,30 $\pm$ 1,16 <sup>Ab</sup>	18,03 $\pm$ 3,44 <sup>Aa</sup>	9,67 $\pm$ 1,01 <sup>Aab</sup>	5,11 $\pm$ 0,99 <sup>Ab</sup>	19,98 $\pm$ 3,96 <sup>Aa</sup>	6,45 $\pm$ 2,99 <sup>Ab</sup>	6,32 $\pm$ 1,10 <sup>Ab</sup>
<i>Zeaxantina</i>	55,76 $\pm$ 8,47 <sup>Aa</sup>	10,53 $\pm$ 1,81 <sup>Ab</sup>	13,88 $\pm$ 3,30 <sup>Ab</sup>	59,02 $\pm$ 12,07 <sup>Aa</sup>	19,42 $\pm$ 3,41 <sup>Bb</sup>	13,61 $\pm$ 2,29 <sup>Ab</sup>	40,18 $\pm$ 8,23 <sup>Aa</sup>	17,29 $\pm$ 5,32 <sup>ABa</sup>	16,06 $\pm$ 2,95 <sup>Aa</sup>

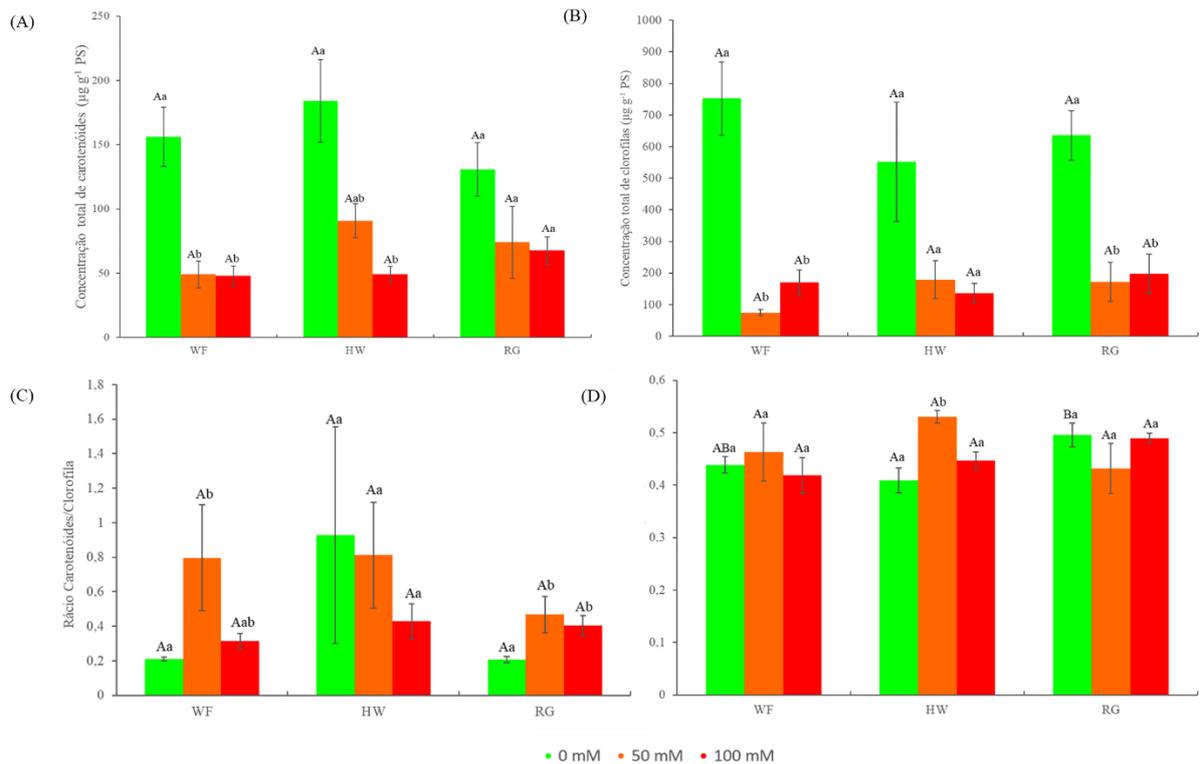


Figura 11 **A** – Concentração total de carotenoides; **B** – Concentração total de clorofilas; **C** – Rácio Carotenoides/Clorofila; **D** – Estado de De-Epoxidação (DES) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

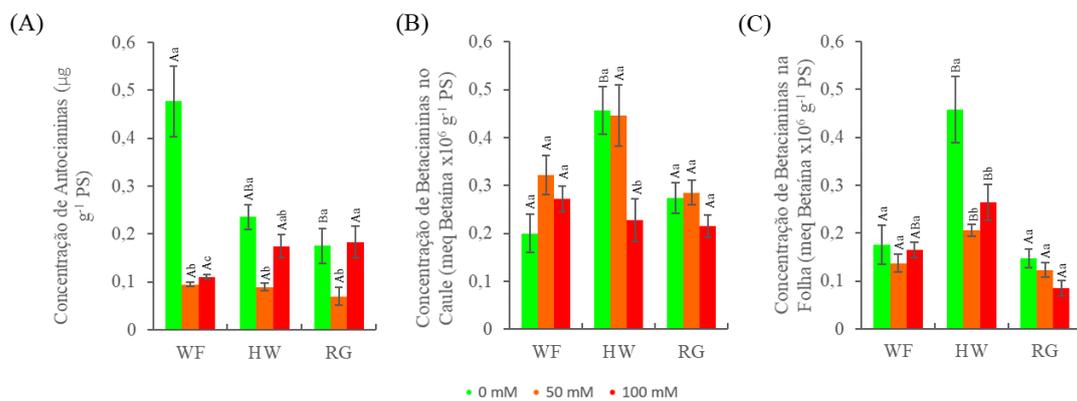


Figura 12 **A** – Concentração de antocianinas; **B** e **C** – Concentração de betacianinas no caule e na folha respectivamente, no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

## 4.5 Hidratos de carbono

A concentração foliar de amido e de hidratos de carbono solúveis totais foi bastante variável entre as três variedades. Com o aumento da salinidade de 0 mM NaCl para 50 mM NaCl, as plantas da variedade WF viram a sua concentração de amido e de hidratos de carbono solúveis totais aumentar, enquanto os indivíduos das variedades HW e RG mostraram uma diminuição da sua concentração. Contrariamente, quando expostas a 100 mM NaCl, as plantas da variedade WF apresentaram um

decréscimo na concentração de amido e de hidratos de carbono solúveis totais, enquanto as plantas das variedades HW e RG apresentaram um aumento nestes mesmos parâmetros (Figura 13 A e B).

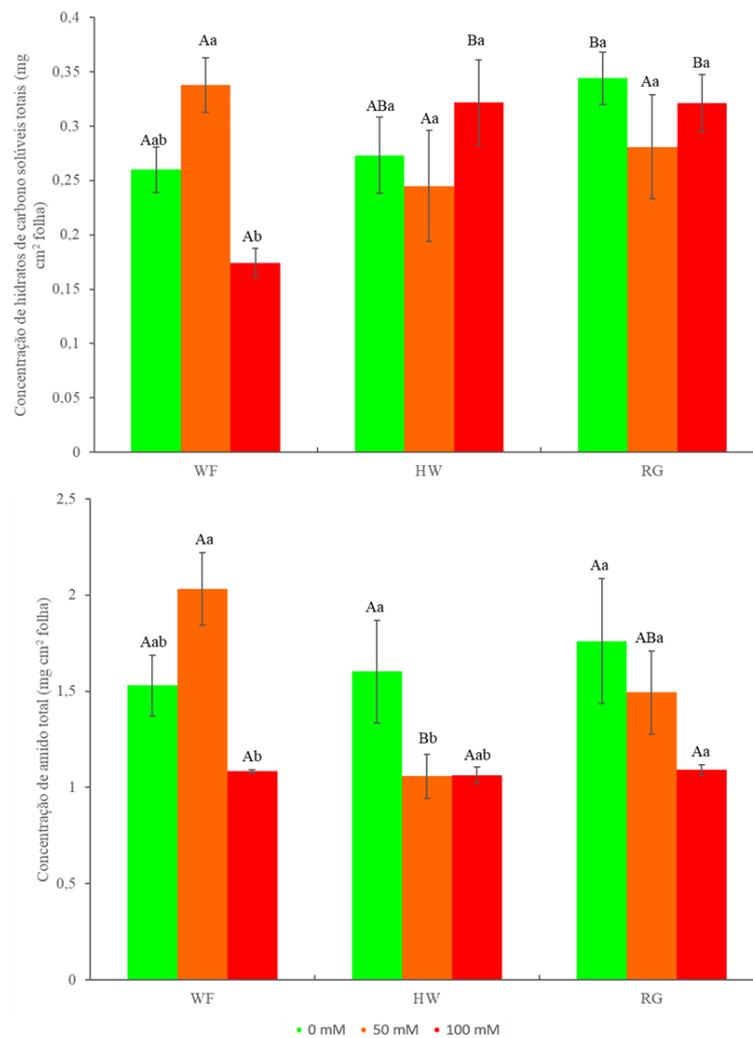


Figura 13 **A**: Concentração de hidratos de carbono solúveis totais; **B**: Concentração de amido total no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

#### 4.6 Prolina

O conteúdo foliar em prolina diminuiu significativamente em todas as variedades, nas plantas expostas a 50 mM e 100 mM de NaCl (Figura 14). Com o aumento da concentração de NaCl de 0 mM NaCl para 50 mM NaCl, as plantas das variedades WF e RG apresentaram um decréscimo mais acentuado do conteúdo deste osmossoluto (aproximadamente 40 % e 30 %, respetivamente). Os indivíduos da variedade HW mostraram uma diminuição de 15 % no conteúdo de prolina a 50 mM NaCl. No entanto, de 50 mM NaCl para 100 mM NaCl, as plantas da variedade HW apresentaram um decréscimo de cerca de 16 % no conteúdo de prolina, enquanto as plantas das variedades WF e RG exibiram um decréscimo de 3 % e 12 %, respetivamente.

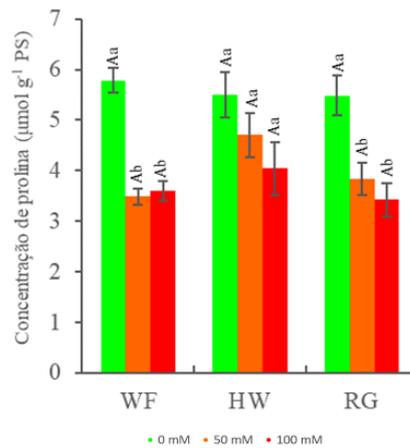


Figura 14 Concentração de prolina no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

#### 4.7 Fenóis e flavonoides

O aumento da concentração de NaCl não provocou alterações significativas no que respeita à concentração fenólica foliar das variedades estudadas (Figura 15 A), ainda que nas variedades WF e RG tenha ocorrido uma diminuição desta concentração. Ao nível da concentração de flavonoides a resposta por parte das variedades foi distinta entre si, sendo que os indivíduos da variedade WF apresentaram um decréscimo significativo da concentração destes compostos em plantas expostas a 50 mM NaCl e a 100 mM de NaCl, contrariamente às plantas da variedade RG, onde apesar de ocorrer uma diminuição da concentração de flavonoides, esta não foi significativa quando comparada com a concentração observada nas plantas expostas a 0 mM NaCl (Figura 15 B). Nas plantas da variedade WH, a concentração de flavonoides apresentou um decréscimo com o aumento de NaCl, mais evidente nos indivíduos expostos a 100 mM de NaCl.

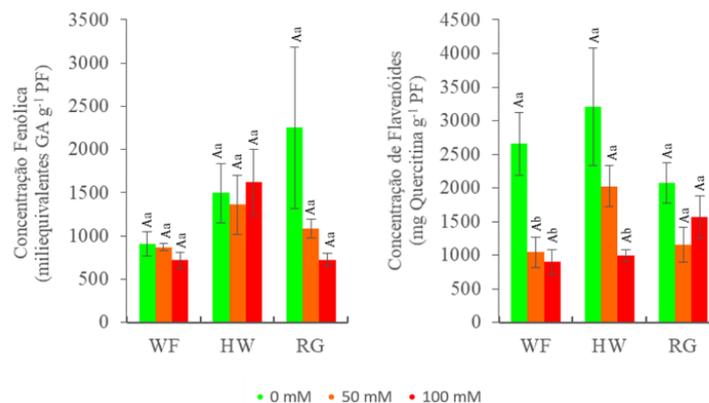


Figura 15 **A** – Concentração fenólica; **B** – Concentração de flavonoides no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas marcam as diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas as diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

## 4.8 Temperatura Foliar

Ao nível da parte aérea, a temperatura foliar aumentou tendencialmente em todas as variedades nos indivíduos cultivados na presença de NaCl, sendo que, nas plantas da variedade HW se pode verificar diferenças menores comparativamente às variedades WF e RG (Figura 16 e 17). Com o aumento da concentração de NaCl exógeno de 0 mM para 50 mM NaCl, a temperatura foliar nos indivíduos da variedade WF aumentou 11 %, enquanto as plantas das variedades HW e RG registaram um aumento da sua temperatura foliar de 6 % e 9 %, respetivamente. A exposição a 100 mM NaCl levou a um aumento de temperatura foliar em todas variedades para valores semelhantes aos observados a 50 mM NaCl.

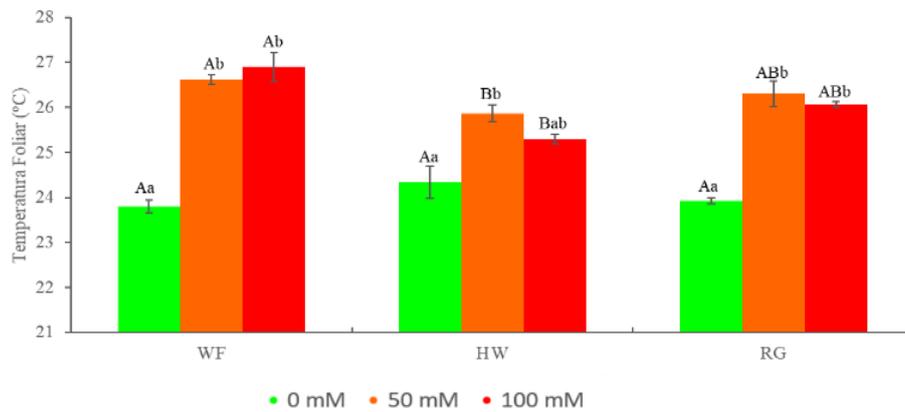


Figura 16 Temperatura foliar (°C) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

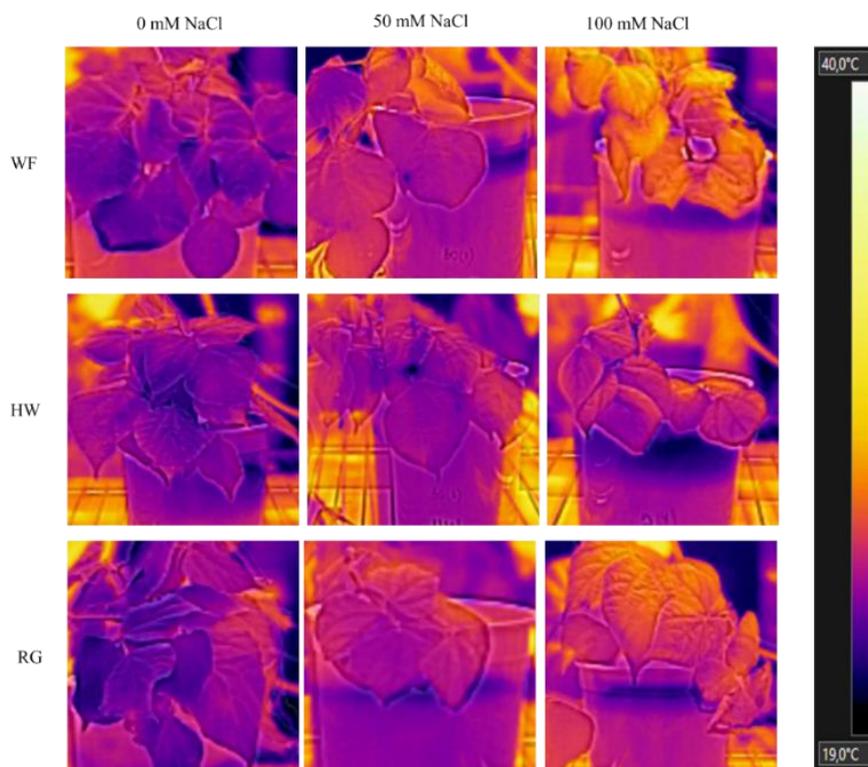


Figura 17 Temperatura foliar (°C) sob a forma de visualização termográfica no final do período de exposição a NaCl nas variedades WF, HW e RG

#### 4.9 Perfil de Ácidos Gordos e Quantificação de MDA

Ao nível foliar, os ácidos gordos presentes em maiores concentrações nas três variedades de Lablab foram o ácido palmítico (C16:0), o ácido hexadecanóico (C16:1t), o ácido linoleico (C18:2) e o ácido linolénico (C18:3). A exposição a 100 mM de NaCl levou a um aumento significativo do teor em C16:0 e C16:1t nas plantas das variedades WF e RG, assim como de C18:2 (Figura 18). Contrariamente a estes, o ácido gordo C18:3 sofreu um decréscimo na sua concentração com o aumento da concentração de NaCl, sendo esta diminuição significativa nas plantas das variedades WF e RG expostas a 50 mM NaCl.

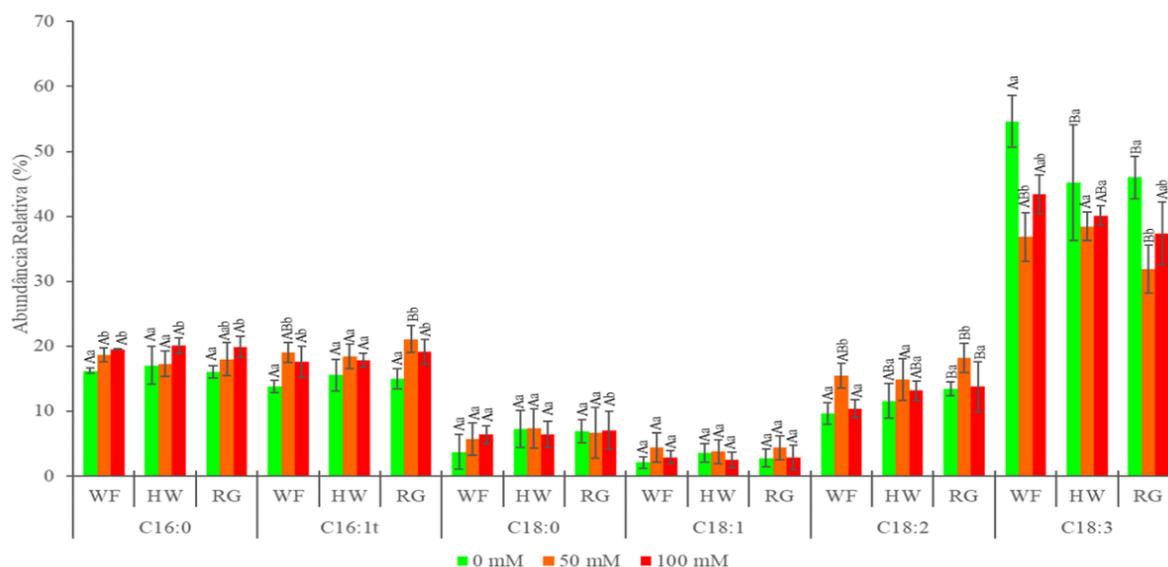


Figura 18 Perfil de ácidos gordos no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média ± erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

Os ácidos gordos analisados podem ainda ser agrupados de acordo com o seu grau de saturação (Figura 19). As plantas da variedade WF demonstraram uma diminuição da abundância em ácidos gordos insaturados (*unsaturated fatty acids*, UFA) e polinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) com o aumento da salinidade para 50 mM NaCl e 100 mM de NaCl. O mesmo pode ser observado nos indivíduos da variedade RG, ainda que apenas a concentração foliar de PUFA tenha revelado variações significativas. Esta tendência é contrária ao verificado nos ácidos gordos saturados (*saturated fatty acids*, SFA) e monoinsaturados (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) onde as plantas da variedade WF demonstraram um aumento dos mesmos face ao aumento da concentração de NaCl exógena. As plantas da variedade RG demonstraram um aumento de MUFA a 50 mM de NaCl.

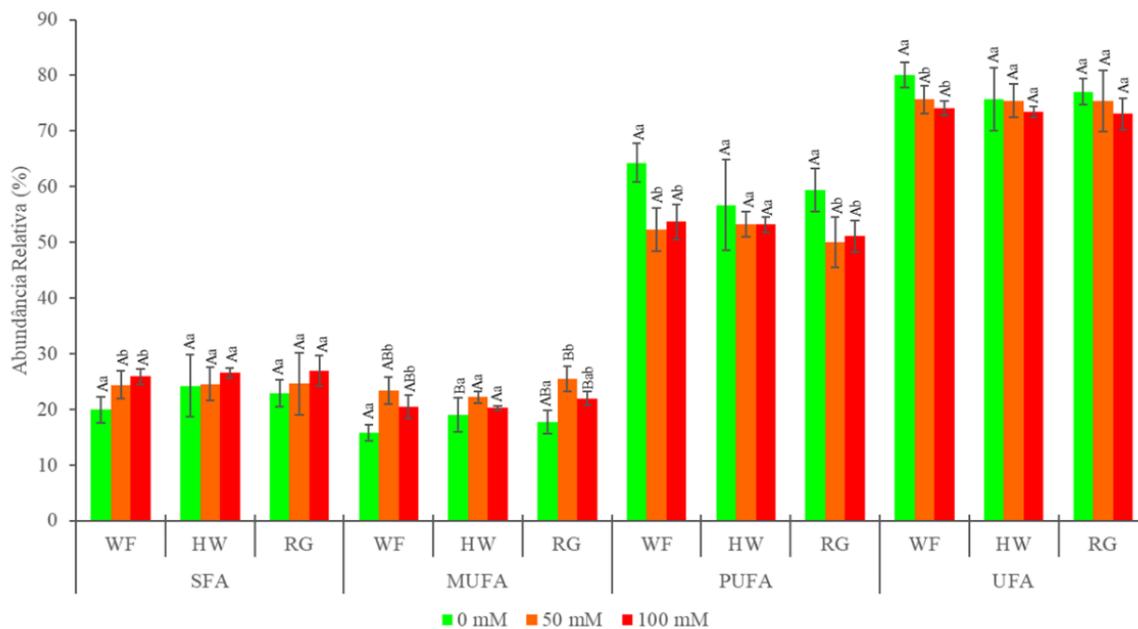


Figura 19 Classes de saturação de ácidos gordos: ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), ácidos gordos polinsaturados (PUFA), ácidos gordos insaturados (UFA) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

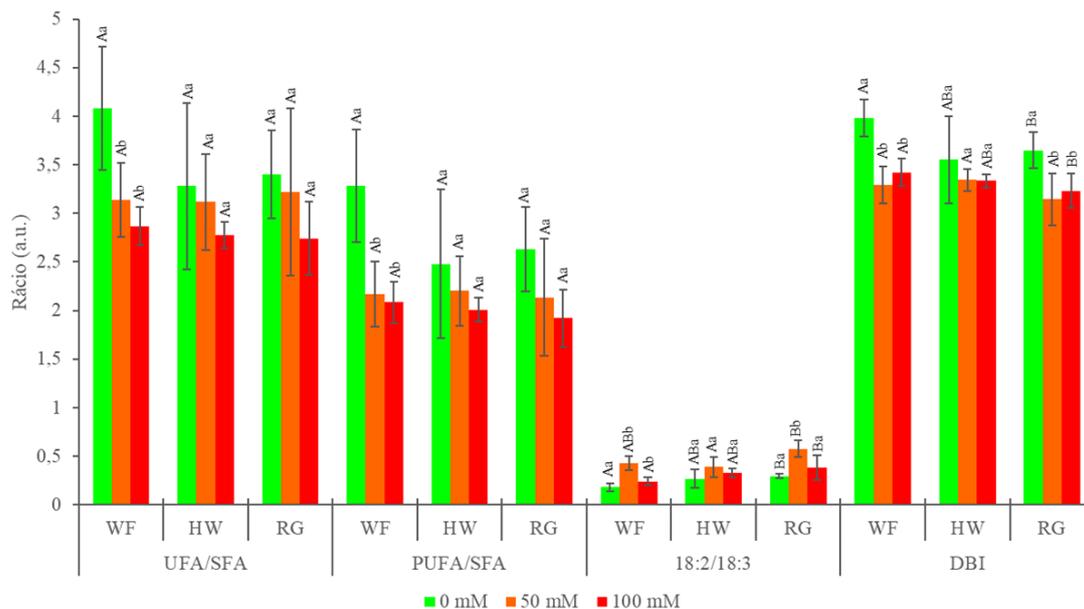


Figura 20 Índices de saturação de ácidos gordos: rácio ácidos gordos insaturados/saturados (UFA/SFA), rácio de ácidos gordos polinsaturados/saturados (PUFA/SFA), rácio C18:2/C18:3 (18:2/18:3), rácio do índice de duplas ligações (DBI) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

A maior abundância de UFA e PUFA face aos SFA verificou-se também nos índices UFA/SFA e PUFA/SFA (Figura 20), os quais sofreram uma diminuição face ao aumento da concentração de NaCl, principalmente nos indivíduos da variedade WF. O índice C18:2/C18:3 aumentou nas plantas das variedades WF e RG expostas a 50 mM de NaCl. Foi ainda possível verificar uma diminuição deste rácio nas plantas expostas a 100 mM de NaCl, comparativamente ao observado indivíduos cultivados

na ausência de NaCl. As plantas das variedades WF e RG registaram também uma diminuição significativa no índice de duplas ligações (*Double Bound Index*, DBI) com o aumento da concentração de NaCl para 100 mM NaCl.

O stresse oxidativo pode levar a um processo de peroxidação lipídica, do qual resulta a formação de malondialdeído (MDA). Contrariamente ao esperado, todas as variedades demonstraram uma diminuição na concentração deste composto com o aumento da concentração de NaCl (Figura 21). Esta diminuição é mais acentuada nas variedades WF e RG expostas a 100 mM NaCl, quando comparadas com as plantas a 0 mM NaCl.

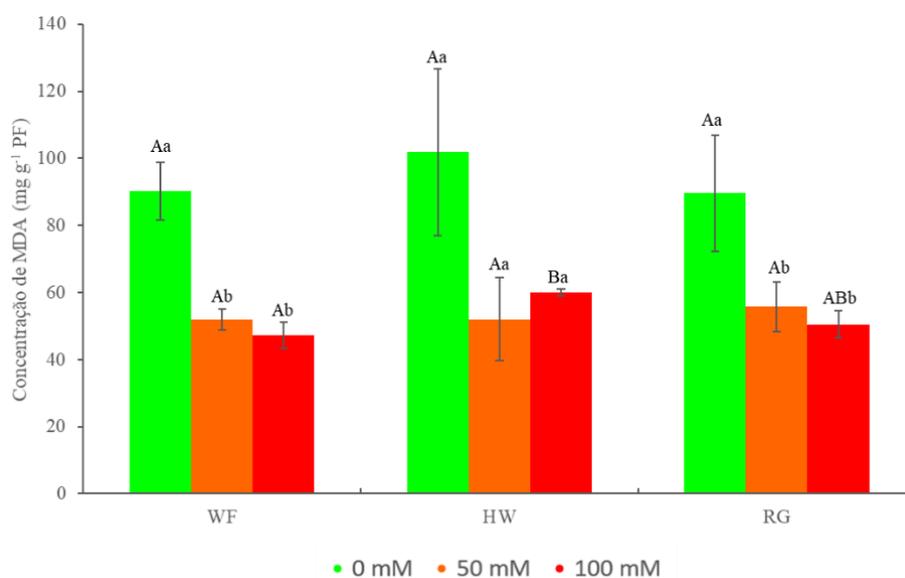


Figura 21 Concentração de malondialdeído (MDA) no final do período de exposição a NaCl em WF, HW e RG (média  $\pm$  erro padrão, N = 5; as letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as salinidades na mesma variedade e as letras maiúsculas a diferenças significativas para a mesma salinidade entre variedades, utilizando o teste Kruskal-Wallis, para  $p < 0,05$ )

Aplicando as concentrações relativas de cada ácido gordo como vetores numa análise CAP, podemos verificar que, ao contrário das análises multivariadas anteriores, neste caso o perfil de ácidos gordos não constitui um descritor para todas as variedades. Aplicando esta abordagem a todas as variedades é possível verificar que existe uma elevada capacidade de distinção dos diferentes grupos de exposição salina (Figura 22 A), promovida pela elevada eficiência individual verificada nas variedades WF e RG (Figura 22 C e D). No entanto nos indivíduos da variedade HW, o perfil de ácidos gordos surge como sendo relativamente insensível na discriminação dos níveis de exposição salina, principalmente nas amostras de salinidade intermédia (50 mM NaCl), onde o modelo canónico apresenta uma eficiência de classificação de 0% (apenas no que diz respeito ao grupo de plantas expostas a 50 mM NaCl). Desta forma o perfil de ácidos gordos da variedade HW não é grandemente afetado pela exposição a NaCl apresentando similaridades entre os níveis de exposição e por isso uma maior sobreposição dos grupos de classificação formados.

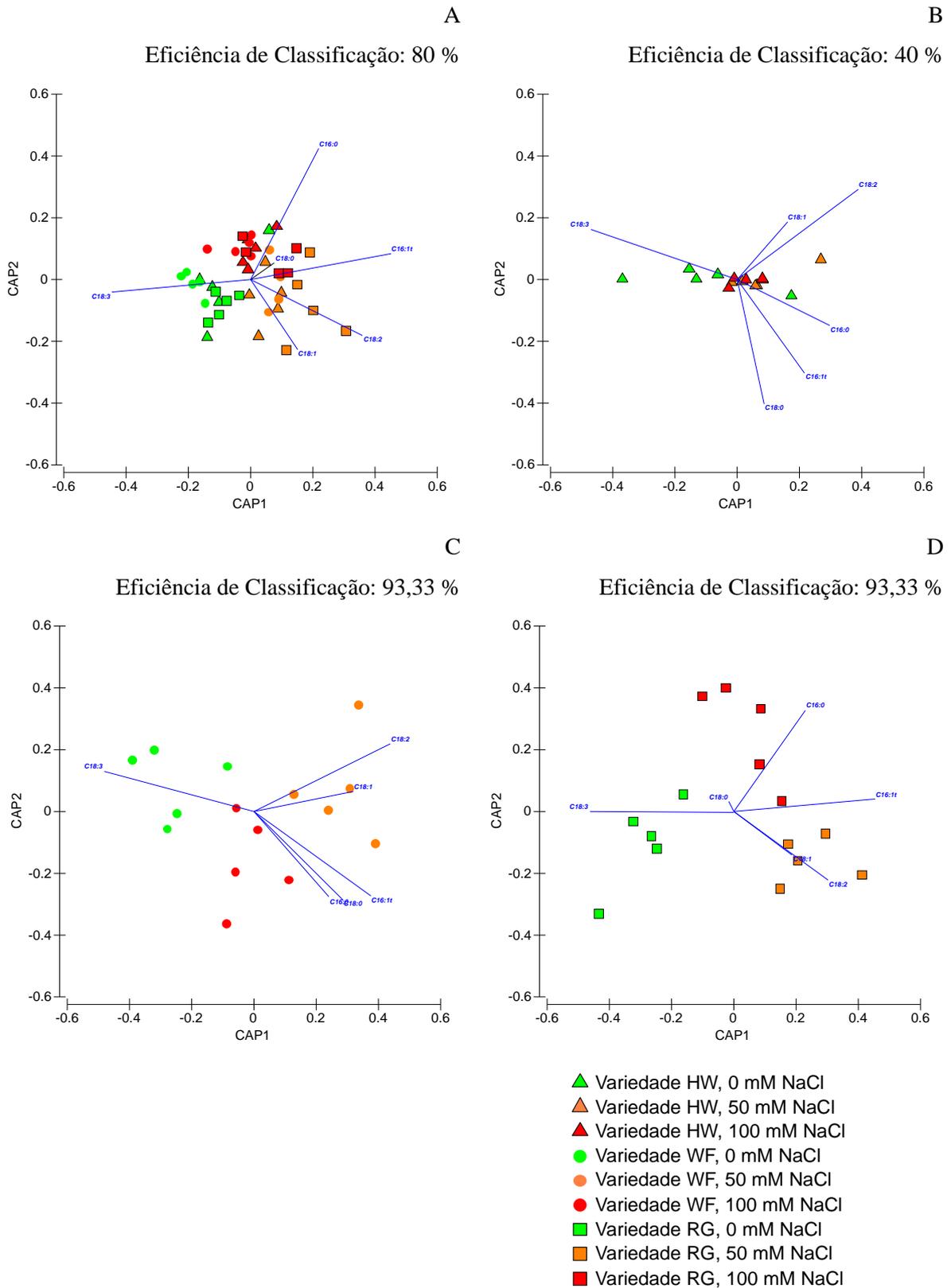


Figura 22 Análise canônica de coordenadas principais (CAP) aplicada à concentração de ácidos gordos nas três variedades sob exposição a NaCl no final do período de exposição a NaCl (A) em WF (B), HW (C) e RG (D)

## 5. Discussão

A salinização dos solos tem sido uma das problemáticas que mais preocupa devido à perda de solo fértil e consequente diminuição da área de produção agrícola. Torna-se então necessário encontrar estratégias que ofereçam aos produtores opções de produção em áreas que de outra forma seriam negligenciadas para produção. Estas estratégias podem passar por encontrar espécies tolerantes a condições de salinidade e a solos organicamente empobrecidos. Por ser tolerante à seca, a Lablab poderá ser uma opção viável neste sentido, considerando que os mecanismos de tolerância ao stresse hídrico são semelhantes ao stresse salino (Duarte *et al.*, 2020). Contudo, existe pouca informação sobre os mecanismos da Lablab em resposta a este tipo de stresse (D'Souza e Devaraj, 2010).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi estudar a resposta fisiológica de três variedades de Lablab, duas cultivares (RG e HW) e uma *landrace* (WF), a três níveis de salinidade (0 mM, 50 mM e 100 mM NaCl).

### ***Resposta fisiológica da Lablab a 0 mM NaCl***

De um modo geral as três variedades demonstraram concentrações semelhantes dos diferentes íons analisados (Tabela 1) nas plantas expostas a 0 mM de NaCl. Destacando-se, no entanto, a existência de concentrações mais elevadas nas regiões do caule e folha, uma vez que o seu transporte se dá no sentido aéreo, como se observou ocorrer com o Ca, Na, Cl, Mn e Ni. O aumento destes íons reflete o sentido do transporte de nutrientes da raiz até à folha onde ocorrem as trocas necessárias para a manutenção das funções essenciais às plantas, tais como a ativação de compostos enzimáticos e a regulação de membranas (Peel, 2013). Na ausência de NaCl, os indivíduos das três variedades apresentaram concentrações semelhantes de K na raiz e folhas, o que revela a existência de trocas ativas através dos canais iônicos Na/K, que permitem o equilíbrio osmótico (Duarte *et al.*, 2013).

Na ausência de salinidade ainda que não tenham sido observadas diferenças significativas entre as três variedades ao nível do conteúdo hídrico (Figura 3A e B) e da temperatura foliar (Figura 16), a resposta fotoquímica das plantas revelou diferenças basais entre as três variedades. Os indivíduos da variedade HW demonstraram ter menor eficiência no uso da energia absorvida, como pode ser observado pelas diferenças observadas no valor máximo de rETR ( $ETR_{max}$ ), e no valor da eficiência fotossintética ( $\alpha$ ), quando comparada a variedade HW com as variedades RG e WF (Figura 5). Estes resultados sugerem que a variedade HW poderá possuir um ponto de saturação de luz menor, resultando em possíveis fenómenos de fotoinibição causados pelo excesso de energia, o que pode representar possíveis problemas ao nível do PSII (Li *et al.*, 2018; Öquist *et al.*, 1992). Consequentemente, estas plantas poderão ter uma menor capacidade de absorção e utilização de fotões nos processos fotoquímicos (Duarte *et al.*, 2014) e, consequentemente, menor tolerância à salinidade. Estes resultados indicam ainda que a variedade HW poderá ser mais propensa a sofrer stresse oxidativo em condições de stresse abiótico e, consequentemente, mais suscetível a sofrer níveis elevados de dano membranar como, por exemplo,

a peroxidação lipídica. Este processo ocorre quando as espécies reativas de oxigênio (ROS) reagem com os ácidos gordos polinsaturados membranares, tendo como consequência a potencial ruptura da membrana e a formação de MDA (Duarte *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2000). Efetivamente, os indivíduos da variedade HW expostos a 0 mM de NaCl apresentaram uma maior concentração de MDA comparativamente às variedades RG e WF nas mesmas condições de NaCl (Figura 21), o que sugere que esta variedade poderá ter à partida uma maior predisposição para sofrer peroxidação lipídica. No entanto, os indivíduos da variedade HW apresentam também valores mais elevados de concentração de betacianinas e flavonoides (Figura 12 C e 15 B), compostos com elevada capacidade antioxidante e de proteção contra os ROS (Cotelle, 2001; Hayakawa e Agarie, 2010), o que poderá sugerir que, embora a variedade HW seja mais suscetível à ocorrência de danos membranares, poderá recorrer a estes compostos como mecanismo de defesa contra stresse oxidativo. Adicionalmente, sabe-se que existem mecanismos de regulação osmótica que poderão ser coadjuvantes na osmorregulação celular como, por exemplo, a presença de aquaporinas. As aquaporinas são proteínas que se encontram presentes no plasma e nas membranas intracelulares das células, e que facilitam o transporte transmembranar de água e/ou de outros solutos (Jia *et al.*, 2020; Maurel *et al.*, 2008). A sua sobre-expressão poderá ser indicadora da capacidade por parte das folhas da planta de manterem o conteúdo hídrico face ao stresse osmótico (Liu *et al.*, 2012).

Relativamente aos indivíduos das variedades WF e RG, ambos apresentaram um comportamento semelhante no que respeita à resposta fotoquímica face às condições de crescimento sem presença de NaCl. No entanto, os indivíduos da variedade WF revelaram ter um menor número de OECs ativos (Figura 8 A), em comparação com as plantas das variedades HW e RG, sugerindo a existência de alterações ao nível do lado dador do PSII e consequente menor transferência de eletrões para a cadeia transportadora de eletrões.

Apesar de todas as variedades terem perfis pigmentares semelhantes, na ausência de salinidade a variedade RG demonstrou a presença de menor quantidade de feofitinas (Tabela 2) comparativamente às variedades WF e HW.

### ***Resposta fisiológica da Lablab ao aumento da concentração para 50 mM NaCl***

Com o aumento da concentração de NaCl para 50 mM, foram desencadeadas algumas respostas nas plantas das três variedades. Com o aumento de iões Na e Cl no meio envolvente à raiz, e sendo o transporte de iões através do xilema o mecanismo que garante o aporte iónico essencial à planta (Ishikawa e Shabala, 2019), são expectáveis alterações nas quantidades de iões translocadas para as folhas.

Este aumento de Na intracelular nas variedades WF e RG, ainda que não significativo, poderá induzir a saída do Ca membranar (Duarte *et al.*, 2015b) para o meio extracelular, o que poderá gerar problemas nos processos de transdução de sinais de stresse (Sanders *et al.*, 2002) e, por sua vez, afetar o metabolismo do K e das enzimas que utilizem este ião como cofator (Cramer *et al.*, 1985; Leigh e

Jones, 1994). Após adição de NaCl (50 mM), o aumento de Na ocorreu em simultâneo com a diminuição de K em todas as plantas, com exceção da variedade RG que demonstrou um aumento deste elemento na região foliar (Tabela 1), comparativamente ao observado a 0 mM NaCl. Esta resposta poderá indicar um possível mecanismo de tolerância ao excesso iónico presente no xilema das plantas da variedade RG, que permitirá contrabalançar o aumento de Na com a manutenção dos níveis de K ao nível do xilema, mantendo os valores de Na dentro do limite tolerável nas plantas da variedade RG (Bose *et al.*, 2014; Munns e Tester, 2008; Zarei *et al.*, 2019). Uma das diferenças entre estas variedades, na resposta ao stresse osmótico a 50 mM NaCl, poderá ser no local onde aloca os iões e nas estratégias que utilizam nos locais de acumulação, de forma a não induzirem disrupções nos processos celulares. Estes resultados corroboram o que é observado através na análise CAP (Figura 2), sendo visível uma resposta distinta entre a parte aérea e a parte radicular, principalmente nos indivíduos da variedade RG (Figura 2 D). Tendo em conta estes factos, surge a hipótese de que a raiz possa desempenhar um papel fundamental no *uptake*, seleção e regulação dos iões que são posteriormente translocados para a parte aérea (Haynes, 1980; Karley *et al.*, 2000), demonstrando ter um papel fundamental na resposta à salinidade.

Como descrito anteriormente, o K foi um dos iões que apresentou mais alterações ao nível da acumulação na região foliar e da raiz, tendo ocorrido uma diminuição do mesmo em ambas as partes nas três variedades a 50 mM NaCl. Tendo este elemento um papel fundamental na regulação da abertura e fecho estomático (Parihar *et al.*, 2015; Tavakkoli *et al.*, 2011), a diminuição da sua concentração pode resultar no fecho dos estomas e consequentemente ao aumento da temperatura foliar (Figura 16) e do conteúdo hídrico foliar (Figura 3 A). Nas plantas da variedade RG expostas a 50 mM NaCl, para além do aumento do conteúdo hídrico foliar, foi também registado um aumento semelhante ao nível do caule (Figura 3 B). Este aumento poderá indicar uma maior acumulação de água no caule como estratégia de diluição da concentração iónica (Duarte *et al.*, 2013). Para os indivíduos da variedade RG expostos a 50 mM de NaCl, esta poderá ser uma das estratégias de defesa ao choque iónico.

Estas alterações provocadas pelo stresse salino ao nível do *uptake* iónico e da regulação osmótica causam impacto severo no metabolismo primário das plantas especialmente, ao nível fotossintético. A diminuição do potencial hídrico celular (Parihar *et al.*, 2015) e a diminuição na produção de pigmentos fotossintéticos que constituem os centros de reações, como a clorofila, e o aumento do seu produto de degradação, i.e. feofotina (Chutipaijit *et al.*, 2011; Tavakkoli *et al.*, 2011), são alguns dos efeitos provocados pelo aumento da salinidade que resultam na redução das taxas de fotossíntese. Estes são visíveis através dos parâmetros ABS/CS, TR/CS e ET/CS (Figura 9A, C e D) que apontaram para uma clara diminuição no fluxo de energia absorvido, aprisionado e transportado pela CTE. A diminuição de clorofilas totais (Figura 11 B), principalmente nas plantas das variedades WF e RG, poderá também justificar esta diminuição de fluxo de energia absorvido, uma vez que estes pigmentos são essenciais para a receção e absorção de energia nas antenas fotossintéticas e na transferência da mesma a forma de eletrões para o a CTE (Taiz e Zeiger, 2003). Esta diminuição, suportada pela redução do número de centros de reação ativos (Figura 9 E) e por uma menor taxa de

*turnover* dos centros de reação (Figura 8 C), pode indicar problemas ao nível da captação de energia luminosa pelo PSII, provocada pelo aumento da concentração de NaCl de 0 mM NaCl para 50 mM NaCl.

O excesso de energia que decorre do decréscimo de capacidade de dissipação de energia, e consequentemente um menor fluxo de energia de transporte de eletrões, resulta numa acumulação de potencial redox na célula. O que, por sua vez, leva à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), nomeadamente ao nível do cloroplasto (Mittler, 2016). Como anteriormente referido, um aumento da concentração celular de ROS tem como possível consequência danos nas camadas lipídicas, ao nível proteico e do DNA (Cross, 1987). Alguns dos mecanismos que previnem os danos potencialmente gerados pelos ROS, decorrem da utilização de compostos secundários com capacidade antioxidante, em que se incluem os compostos fenólicos e flavonoides, osmossolutos ou compostos pigmentares (Acosta-Motos *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2014; Parida *et al.*, 2016; Parihar *et al.*, 2015). Em condições de stresse osmótico, as plantas recorrem a estes compostos quer de forma a reduzir os efeitos nefastos dos ROS, quer no sentido de dissipar o excesso de energia e potenciais fenómenos de fotoinibição que, inevitavelmente, afetam a produção de ATP e de outros compostos imprescindíveis ao normal funcionamento celular (Acosta-Motos *et al.*, 2017).

As plantas da variedade HW expostas a 0 mM NaCl apresentaram uma maior concentração de compostos fenólicos e de betacianinas, superior aos observados nas variedades WF e RG nas mesmas condições de cultivo (Figura 15 e Figura 12). Contudo, os indivíduos da variedade HW sujeitos a 50 mM NaCl apresentaram um decréscimo de 9% na concentração dos fenóis e de 37% na concentração de flavonoides (Figura 15 A e B), sendo este decréscimo inferior ao observado nas plantas das variedades WF e RG. Este facto poderá indicar que, embora os indivíduos da variedade HW apresentem uma maior concentração destes compostos, esta estratégia não deverá ser o ponto diferenciador do mecanismo de resposta observado nesta variedade. No que respeita ao perfil pigmentar, as variedades apresentaram uma diminuição na concentração tanto de antocianinas como de betacianinas quando expostas a 50 mM de NaCl, ainda que nos indivíduos pertencentes à variedade HW, esta diminuição não tenha sido tão acentuada (Figura 12). A diminuição no teor de antocianinas e de betacianinas poderá ser uma consequência da utilização destes compostos na metabolização de ROS (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014). Também a concentração de carotenoides totais sofreu uma diminuição com o aumento da concentração para 50 mM de NaCl (Figura 11 A), especialmente na variedade WF. Esta diminuição poderá estar associada a sinais de stresse (Duarte *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014) e ao uso destes pigmentos no ciclo das xantófilas, mas também à sua utilização direta como compostos antioxidantes. O ciclo das xantófilas realiza a conversão enzimática ativada por flutuações de pH do estroma tendo como objetivo a libertação de energia em excesso por de-epoxidação da Violaxantina em Antheraxantina e Zeaxantina (Demmig-Adams e Adams III, 1992; Duarte *et al.*, 2013). Nas variedades WF e HW poderá ter ocorrido uma ativação deste ciclo, levando à diminuição da concentração dos carotenoides que nele estão envolvidos (violaxantina, antheraxantina e zeaxantina –

Tabela 2), e ao aumento do índice do estado de de-epoxidação (DES, Figura 11 D), concomitante com a ativação do ciclo das xantófilas no sentido das reações de de-epoxidação (Duarte *et al.*, 2013).

Com o aumento da concentração para 50 mM NaCl, todas as variedades em estudo sofreram um decréscimo na concentração de prolina e de carboidratos solúveis totais (Figura 13 A), indicando que nestas condições estes compostos não estarão a ser utilizados para ajuste osmótico (D'Souza e Devaraj, 2010; Duarte *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2000; Munns e Tester, 2008) de forma a manter a turgescência celular, evitando desidratação e mantendo o influxo/efluxo da água (Parida *et al.*, 2016). Adicionalmente, uma redução da eficiência fotossintética poderá também contribuir para esta menor acumulação de hidratos de carbono através do abrandamento do ciclo de Calvin (Taiz e Zeiger, 2003).

### ***Resposta fisiológica da Lablab ao aumento da concentração de 50 mM NaCl para 100 mM NaCl***

Com o aumento da concentração de NaCl exógeno para 100 mM, algumas das respostas observadas a 50 mM NaCl sofreram alterações. Tal como observado nas plantas sujeitas a 50 mM NaCl, ocorreu uma acumulação de Na e Cl que continuou a fazer-se no sentido da parte aérea das plantas, concomitante com um mecanismo de sinalização de stresse. Este mecanismo é despoletado enquanto resposta de defesa, uma vez que esta acumulação de Na nas folhas pode ser utilizada como um mecanismo de compartimentação através da acumulação de Na no vacúolo, evitando deste modo perdas de K por antiporte nos canais Na/K e ainda, atuar como mecanismo de regulação osmótica contra o excesso iónico que se gera ao nível da raiz (Munns *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2009). Ainda assim, esta resposta levou à diminuição da concentração de K que em resposta ao aumento de Na, foi excretado através dos canais iónicos em antiporte com o Na (elemento que se encontra em maior concentração). Esta ação poderá gerar várias respostas a nível celular, como a ativação de proteases e endonucleases que servem de sinal para uma eventual morte celular programada (Duarte *et al.*, 2013). Com a exposição a 100 mM NaCl, esta saída de K foi observável em todas as variedades e em todos os órgãos estudados das mesmas. O aumento de Na na região foliar foi acompanhado com um aumento da concentração de Cl nas folhas das três variedades, uma vez que a sua entrada se dá termodinamicamente acoplada à do Na (Sun *et al.*, 2009). Tavakkoli *et al.* (2011) verificou que o aumento do Cl na região foliar provoca um aumento na degradação da clorofila, e conseqüente perda de capacidade fotossintética (Tavakkoli *et al.*, 2011), tal como observado nas plantas das variedades WF e HW (Figura 5 E).

Como anteriormente referido, a regulação osmótica pode ser feita com recurso a osmossolutos, embora com custos energéticos para a célula. Assim sendo, o aumento de alguns iões ao nível foliar poderá também estar relacionado com a necessidade de manutenção de equilíbrio osmótico e manutenção da turgescência celular (Munns *et al.*, 2016). Ainda que todas as variedades em estudo tenham sofrido uma diminuição na concentração de Ca, e que esta resposta possa estar associada ao aumento da permeabilidade membranas (Greenway e Munns, 1980), apenas as plantas da variedade HW demonstraram um aumento da concentração de MDA a 100 mM NaCl, sugerindo um maior dano ao

nível membranar derivado da acumulação de ROS, derivado de um desequilíbrio osmótico, tal como havido sido proposto inicialmente. O MDA pode, portanto, revelar-se um bom indicador de situações de stresse nas plantas, ainda que este possa variar com a idade, espécie ou estado reprodutivo das plantas (Sergio *et al.*, 2012). As plantas das variedades WF e RG expostas a 100 mM NaCl sofreram uma diminuição da produção de MDA mesmo com aumento da concentração de NaCl, sugerindo uma possível ação de enzimas antioxidantes (Ruiz *et al.*, 2005; Sergio *et al.*, 2012) e/ou de mecanismos de fotoproteção mais eficientes (por exemplo, ação direta dos carotenoides na estabilização dos aparelhos fotoquímicos ou por ativação do ciclo das xantófilas) (Ahmad *et al.*, 2010; Yazici *et al.*, 2007).

O índice de duplas ligações de membrana (DBI) contribuiu para a clarificação dos dados obtidos através dos perfis de ácidos gordos. A diminuição deste índice, nos indivíduos das três variedades, poderá demonstrar uma diminuição da fluidez membranar (Duarte *et al.*, 2017a) que poderá ter permitido diminuir a permeabilidade membranar ao Na, e por sua vez, reduzir a concentração deste ião nos cloroplastos (Duarte *et al.*, 2015b). Esta resposta, no sentido de aumentar o grau de saturação e diminuir o grau de insaturação (diminuição do rácio PUFA/SFA) favorece e demonstra mais uma vez a diminuição da fluidez membranar, que atua como mecanismo contra vários stresses, como por exemplo a salinidade e temperatura (Dodson *et al.*, 2014). Esta diminuição de PUFAs (Figura 19) é visível através da diminuição do ácido linolénico (C18:3, Figura 18) que provoca a diminuição do rácio C18:2/C18:3 (Figura 20) nos indivíduos das três variedades expostos a 100 mM de NaCl. A diminuição do ácido linolénico poderá também estar associada a uma interação entre ROS e as duplas ligações presentes nos ácidos gordos (Duarte *et al.*, 2017), conduzindo a inevitáveis danos ao nível membranar (Upchurch, 2008). Também o aumento da concentração relativa de ácido palmítico (C16:0) e a diminuição do valor do índice DBI nas variedades, com o aumento da salinidade para 100 mM NaCl, poderá surgir enquanto resposta ao stresse (Duarte *et al.*, 2020, 2017b).

O funcionamento do aparelho fotossintético é também bastante afetado com a salinidade, uma vez que o aumento da produção de ROS pode provocar danos ao nível dos componentes proteicos e das membranas do PSII, levando ao mal funcionamento do mesmo (Nishiyama *et al.*, 2011; Taiz and Zeiger, 2003). Esta incapacidade no processamento da energia que chega continuamente à folha por parte do PSII, leva a um aumento das condições de stresse oxidativo e à eventual diminuição na produção de energia – ATP (Yang *et al.*, 2020). As plantas da variedade HW foram as que evidenciaram um maior decréscimo na eficiência fotossintética, tendo ocorrido uma diminuição significativa do seu valor nas plantas expostas a 50 mM NaCl. Estes resultados parecem demonstrar que os indivíduos da variedade HW poderão ser os que apresentam menor capacidade de tolerância perante o aumento de salinidade no meio, quando comparada com as plantas das variedades WF e RG. As curvas de Kautsky relativas aos indivíduos das variedades HW e WF, demonstraram, no entanto, uma diminuição da fluorescência máxima (fase P) que provoca o fecho de todos os CR, contrariamente ao que ocorre em RG, onde a curva relativa às plantas expostas a 100 mM de NaCl se sobrepõe à curva gerada pelos indivíduos expostos a 50 mM de NaCl, em especial na fase P da curva (Figura 6). Apesar de as curvas de Kautsky

correspondentes aos indivíduos expostos a 100 mM e a 50 mM NaCl serem semelhantes em todas as variedades, as curvas de Kautsky da variedade RG apresentam uma fase K, que surge aos 300 ms e que sugere danos no lado dador do PSII, ou seja, nos OECs (Duarte *et al.*, 2014; Srivastava *et al.*, 1997; Strasser e Stirbet, 2001).

Através das curvas rápidas de luz foi ainda possível observar nas três variedades um aumento generalizado da taxa de fecho dos centros de reação do PSII. Simultaneamente foi possível ainda verificar um aumento da energia absorvida e aprisionada, mas também da energia dissipada, o que indica uma diminuição da energia transferida para o transporte eletrónico por parte dos fotossistemas, e consequente diminuição da produção de ATP. Também a diminuição do ET/CS demonstra que, apesar do fluxo de elétrons aprisionado aumentar em relação às plantas expostas a 50 mM NaCl, este está a ser dissipado e não redirecionado para o transporte eletrónico, continuando a ser menor do que o que ocorreu nas plantas a 0 mM NaCl. As plantas das variedades WF e RG, sofreram ainda uma diminuição no número de OECs ativos, contrariamente ao sucedido na variedade HW, onde ocorreu aumento do número de OECs ativos com o aumento da salinidade para 100 mM de NaCl. Este tipo de resposta por parte da variedade HW poderá estar relacionado com uma melhor capacidade de dissipação de energia através do calor, ou com a capacidade de amortecer o excesso de potencial redox da CTE através de compostos antioxidantes (pigmentos, osmossolutos, etc), prevenindo desta forma danos ao nível do lado dador do PSII. Ainda assim, todas as variedades sofreram perda da conectividade das antenas fotossintéticas (PG, Figura 8 F). Este parâmetro descreve a conectividade energética que ocorre entre as antenas do PSII (Panda *et al.*, 2006), e o seu aumento demonstra a perda de capacidade de transporte de energia que provoca implicações no potencial eletrónico (Duarte *et al.*, 2017b).

Apesar dos danos no sistema fotossintético, as três variedades demonstraram um aumento do conteúdo hídrico ao nível foliar, na presença de NaCl, o que poderá ser um fator determinante na manutenção do equilíbrio osmótico, uma vez que este aumento de suculência ao nível foliar permite a redução de salinidade apoplástica e a manutenção da turgescência celular (Duarte *et al.*, 2013). De modo a manter um conteúdo hídrico favorável à manutenção do funcionamento fisiológico, a diminuição de área foliar é utilizada muitas vezes para auxiliar esse processo (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2000), como se verificou nas variedades WF e HW (Figura 4). As plantas da variedade WF quando expostas a 100 mM NaCl sofreram um aumento significativo da temperatura foliar, resultante do fecho estomático e portanto de uma estratégia de manutenção do conteúdo hídrico foliar (Sperry *et al.*, 2016), através da redução das taxas de transpiração (Waisel, 1972). Este resultado corrobora o já observado anteriormente em que se verificou que as plantas da variedade WF tendencialmente dissipam energia em excesso sob a forma de calor, como forma de prevenção de danos no sistema fotossintético (García-Caparrós *et al.*, 2016; Parida *et al.*, 2016). Posto isto, e face aos resultados obtidos, em que se verificou o aumento do conteúdo hídrico foliar nas três variedades, e um aumento de temperatura foliar comparativamente com as plantas cultivadas na ausência de NaCl, é plausível que tenha ocorrido fecho estomático como medida de retenção de água, promovendo a manutenção do equilíbrio osmótico (Duarte *et al.*, 2013), o que por sua

vez também impediu o arrefecimento foliar (Ballester *et al.*, 2013; Zandalinas *et al.*, 2018). Ainda que o aumento do conteúdo hídrico tenha ocorrido nas três variedades ao nível foliar, apenas as plantas da variedade RG apresentaram também uma resposta semelhante ao nível do caule. Este aumento corrobora uma vez mais uma vez a hipótese de que esta variedade poderá conseguir ativar mecanismos ao nível da raiz ou do caule reguladores do transporte iónico para as folhas.

Para além dos métodos de dissipação de energia, dissolução e compartimentação de iões, e modificações nas camadas lipídicas, os pigmentos fotossintéticos também desempenharam um papel preponderante na defesa das plantas contra o stresse osmótico. Com o aumento para 100 mM NaCl, o conteúdo em clorofilas diminuiu em todas as variedades o que poderá estar associado ao aumento da produção de clorofilase (enzima de degradação da clorofila), à inibição da síntese de clorofila ou ainda devido à diminuição de *uptake* de Mg, mineral essencial na estrutura da clorofila e consequente geração do principal produto de degradação clorofila, a feofitina (Ahmad *et al.*, 2018; Taïbi *et al.*, 2016; Turan *et al.*, 2007). Resultados semelhantes ocorreram no conteúdo em carotenoides que resultaram num aumento do rácio Car/Clo. Esta resposta corrobora o que foi descrito anteriormente, uma vez que em resposta ao aumento de ROS, provocado pelo stresse causado pelo aumento de NaCl, ocorre um aumento de produção de pigmentos antioxidantes – carotenoides (Duarte *et al.*, 2013). A diminuição da DES observada nas plantas das variedades WF e RG a 100 mM NaCl, sugere que estas variedades, contrariamente aos indivíduos da variedade HW, poderão não recorrer ao ciclo das xantófilas para dissipar o excesso de energia acumulado devido ao aumento da concentração de NaCl (Figura 11 D) (Demmig-Adams e Adams III, 1992; Duarte *et al.*, 2013). Por outro lado, a presença de auroxantina – uma xantofila análoga à violoxantina – aumentou nas plantas pertencentes às variedades WF e RG, o que pode sugerir a utilização deste carotenoide por parte destas variedades, ao invés de recorrer ao ciclo das xantófilas (Wentworth *et al.*, 2000) como se verificou ocorrer nos indivíduos da variedade HW. Os indivíduos das três variedades demonstraram também uma diminuição da concentração em zeaxantina, que tem um papel importante na membrana dos tilacoides, atuando como antioxidante e prevenindo a peroxidação lipídica (Müller *et al.*, 2001).

Para além da diminuição no conteúdo de clorofilas e carotenoides, também foi observado uma diminuição da concentração em betacianinas e antocianinas a 100 mM NaCl em todas as variedades, sugerindo que estas variedades não dão preferência à produção destes pigmentos enquanto mecanismos de defesa contra os ROS, podendo eleger vias de dissipação de energia ao nível fotossintético, de acumulação de osmossolutos, de ativação de enzimas antioxidantes como a APX, CAT ou GR como mecanismos preferenciais (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004). Qualquer uma destas hipóteses requer estudos complementares, tais como estudos enzimáticos de forma a obter uma visão mais abrangente do sistema antioxidante.

Para além de todos os mecanismos mencionados, o uso da prolina enquanto osmorregulador é também bastante discutido entre os vários autores. Vários descrevem que a prolina pode não estar associada enquanto mediadora da tolerância ao stresse, mas como consequência do mesmo, uma vez

que a redução da turgescência celular aparenta ser um sinal intermédio para a sua acumulação (Liu e Zhu, 1997). Assim sendo, e uma vez que as variedades não demonstraram turgescência celular como uma consequência à salinidade, esta poderá ser uma das razões para a qual com o aumento da salinidade para 100 mM de NaCl, o conteúdo em prolina diminuiu em todas as variedades.

## 6. Conclusão

As alterações climáticas e as práticas agrícolas inadequadas estão a mudar a composição dos solos, o que exigirá culturas mais resistentes a vários stresses, como o caso da salinidade, seca, entre outros. Torna-se por isso crucial estudar espécies que possam oferecer alguma tolerância a estas situações, como o caso da Lablab, que já havia demonstrado elevada capacidade de adaptação a períodos de limitação hídrica. Esta capacidade serviu de base para tentar compreender se existiam, e quais seriam, os mecanismos presentes nesta espécie que lhe possam conferir tolerância à salinidade.

Os resultados demonstraram que as variedades, apesar de pertencerem todas à mesma espécie, têm adaptações basais diversas e respondem de forma diferente ao stresse salino. Enquanto que os indivíduos da variedade WF demonstraram uma melhor capacidade de dissipação de energia através do aparelho fotossintético, as plantas da variedade RG remetem para a existência de mecanismos de seleção iónica ao nível da raiz ou caule que poderão ser a causa para uma melhor tolerância a maiores níveis de sais. Por outro lado, a variedade HW demonstrou diversas limitações fotoquímicas, mas, uma melhor capacidade de utilização de compostos antioxidantes - como por exemplo os pigmentos, através do ciclo das xantófilas.

Apesar destas diferenças, todas as variedades responderam de forma semelhante face ao aumento de Na e de Cl, assim como todas demonstraram um aumento de temperatura foliar - possivelmente devido ao fecho estomático - e uma diminuição da concentração de MDA e DBI - fatores determinantes da resposta à salinidade, ao nível membranar.

Assim, foi possível compreender que estas variedades apresentaram alguns indícios de tolerância à salinidade, principalmente a 50 mM NaCl. Posto isto, e não descurando a necessidade de testar mais níveis intermédios de tolerância entre os 50 mM e os 100 mM, assim como testes enzimáticos, é possível sugerir que esta espécie, em particular estas variedades, poderão ser um bom instrumento de recuperação de solos ou como culturas de rotação que poderão permitir manter a produtividade dos solos (através dos seus diferentes usos) salinizados e/ou desgastados.

## 7. Bibliografia

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* 11, 36–41. <https://doi.org/10.1201/9781420005615.ax4>
- Abreu, M.M., Monteiro, F., Vidigal, P., 2020. A green solution for the rehabilitation marginal lands: the case of *Lablab purpureus* (L.) Sweet, in: EGU General Assembly 2020. p. 5637. <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu2020-5637>
- Acosta-Motos, J.R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M.J., Hernandez, J.A., 2017. Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy* 7, 1–38. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
- Ahmad, P., Alyemeni, M.N., Ahanger, M.A., Egamberdieva, D., Wijaya, L., Alam, P., 2018. Salicylic Acid (SA) Induced Alterations in Growth, Biochemical Attributes and Antioxidant Enzyme Activity in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Seedlings under NaCl Toxicity. *Russ. J. Plant Physiol.* 65, 104–114. <https://doi.org/10.1134/S1021443718010132>
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Sharma, S., 2010. Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline-metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 57, 509–517. <https://doi.org/10.1134/S1021443710040084>
- Almeida, A.M., Silva, A.B., Araújo, S.S., Cardoso, L.A., Santos, D.M., Torné, J.M., Silva, J.M., Paul, M.J., Fevereiro, P.S., 2007. Responses to water withdrawal of tobacco plants genetically engineered with the *AtTPS1* gene: A special reference to photosynthetic parameters. *Euphytica* 154, 113–126. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9277-2>
- Arrabaça, M.C.M.N.C., 1981. The effect of Temperature on Photosynthetic and Photorespiratory Metabolism.
- Ballester, C., Jiménez-Bello, M.A., Castel, J.R., Intrigliolo, D.S., 2013. Usefulness of thermography for plant water stress detection in citrus and persimmon trees. *Agric. For. Meteorol.* 168, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.08.005>
- Bartzas, G., Tinivella, F., Medini, L., Zaharaki, D., Komnitsas, K., 2015. Assessment of groundwater contamination risk in an agricultural area in north Italy. *Inf. Process. Agric.* 2, 109–129. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2015.06.004>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies 207, 205–207.
- Bose, J., Shabala, L., Pottosin, I., Zeng, F., Velarde-Buendía, A.M., Massart, A., Poschenrieder, C.,

- Hariadi, Y., Shabala, S., 2014. Kinetics of xylem loading, membrane potential maintenance, and sensitivity of K<sup>+</sup>-permeable channels to reactive oxygen species: Physiological traits that differentiate salinity tolerance between pea and barley. *Plant, Cell Environ.* 37, 589–600. <https://doi.org/10.1111/pce.12180>
- Butcher, K., Wick, A.F., DeSutter, T., Chatterjee, A., Harmon, J., 2016. Soil salinity: A threat to global food security. *Agron. J.* 108, 2189–2200. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.06.0368>
- Cabrera, M.T., Duarte, B., Gameiro, C., Godinho, R.M., Caçador, I., 2017. Photochemical features and trace element substituted chlorophylls as early detection biomarkers of metal exposure in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Ecol. Indic.* 95, 1038–1052. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.057>
- Cha-Um, S., Charoenpanich, A., Roytrakul, S., Kirdmanee, C., 2009. Sugar accumulation, photosynthesis and growth of two indica rice varieties in response to salt stress. *Acta Physiol. Plant.* 31, 477–486. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0256-1>
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chutipajit, S., Cha-um, S., Sompornpailin, K., 2011. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 1191–1198.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>
- Cotelle, N., 2001. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 569–590. <https://doi.org/10.2174/1568026013394750>
- Cramer, G.R., Läuchli, A., Polito, V.S., 1985. Displacement of Ca<sup>2+</sup> by Na<sup>+</sup> from the Plasmalemma of Root Cells. *Plant Physiol.* 79, 207–211. <https://doi.org/10.1104/pp.79.1.207>
- Cross, C.E., 1987. Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann. Intern. Med.* 107, 526. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-107-4-526>
- D'Souza, M.R., Devaraj, V.R., 2010. Biochemical responses of Hyacinth bean (*Lablab purpureus*) to salinity stress. *Acta Physiol. Plant.* 32, 341–353. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0412-2>
- de Moraes, M.B., Barbosa-Neto, A.G., Willadino, L., Ulisses, C., Calsa Junior, T., 2018. Salt Stress Induces Increase in Starch Accumulation in Duckweed (*Lemna aequinoctialis*, Lemnaceae): Biochemical and Physiological Aspects. *J. Plant Growth Regul.* 38, 683–700. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9882-z>

- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 599–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.003123>
- Dodson, V.J., Mouget, J.L., Dahmen, J.L., Leblond, J.D., 2014. The long and short of it: temperature-dependent modifications of fatty acid chain length and unsaturation in the galactolipid profiles of the diatoms *Haslea ostrearia* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Hydrobiologia* 727, 95–107. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1790-4>
- Duarte, B., Cabrita, M.T., Gameiro, C., Matos, A.R., Godinho, R., Marques, J.C., Caçador, I., 2017a. Disentangling the photochemical salinity tolerance in *Aster tripolium* L.: connecting biophysical traits with changes in fatty acid composition. *Plant Biol.* 19, 239–248. <https://doi.org/10.1111/plb.12517>
- Duarte, B., Goessling, J.W., Marques, J.C., Caçador, I., 2015a. Ecophysiological constraints of *Aster tripolium* under extreme thermal events impacts: Merging biophysical, biochemical and genetic insights. *Plant Physiol. Biochem.* 97, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.015>
- Duarte, B., Matos, A.R., Caçador, I., 2020. Photobiological and lipidic responses reveal the drought tolerance of *Aster tripolium* cultivated under severe and moderate drought: Perspectives for arid agriculture in the mediterranean. *Plant Physiol. Biochem.* 154, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.019>
- Duarte, B., Pedro, S., Marques, J.C., Adão, H., Caçador, I., 2017b. *Zostera noltii* development probing using chlorophyll a transient analysis (JIP-test) under field conditions: Integrating physiological insights into a photochemical stress index. *Ecol. Indic.* 76, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.023>
- Duarte, B., Prata, D., Matos, A.R., Cabrita, M.T., Caçador, I., Marques, J.C., Cabral, H.N., Reis-Santos, P., Fonseca, V.F., 2019. Ecotoxicity of the lipid-lowering drug bezafibrate on the bioenergetics and lipid metabolism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Sci. Total Environ.* 650, 2085–2094. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.354>
- Duarte, B., Santos, D., Marques, J.C., Caçador, I., 2015b. Ecophysiological constraints of two invasive plant species under a saline gradient: halophytes versus glycophytes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 167, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.04.007>
- Duarte, B., Santos, D., Marques, J.C., Caçador, I., 2013. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: Photosynthesis, PS II photochemistry and anti-oxidant feedback - Implications for resilience in climate change. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.004>

- Duarte, B., Sleimi, N., Caçador, I., 2014. Biophysical and biochemical constraints imposed by salt stress: Learning from halophytes. *Front. Plant Sci.* 5, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00746>
- Feijão, E., Gameiro, C., Franzitta, M., Duarte, B., Caçador, I., Cabrita, M.T., Matos, A.R., 2017. Heat wave impacts on the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Searching for photochemical and fatty acid biomarkers of thermal stress. *Ecol. Indic.* 95, 1026–1037. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.058>
- Flowers, T.J., 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55, 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>
- Flowers, T.J., Colmer, T.D., 2015. Plant salt tolerance: Adaptations in halophytes. *Ann. Bot.* 115, 327–331. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu267>
- Flowers, T.J., Colmer, T.D., 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.* 179, 945–963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>
- García-Caparrós, P., Llanderal, A., Pestana, M., Correia, P.J., Lao, M.T., 2016. Tolerance mechanisms of three potted ornamental plants grown under moderate salinity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 201, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.031>
- Gibbons, J.D., Chakraborti, S., 2006. Nonparametric Statistical Inference, Fundamentals of Biostatistics. [https://doi.org/10.5005/jp/books/10313\\_14](https://doi.org/10.5005/jp/books/10313_14)
- Greenway, H., Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes, in: *Plant Physiology*. pp. 149–90.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J., 2000. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 463–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
- Hayakawa, K., Agarie, S., 2010. Physiological roles of betacyanin in a halophyte, *Suaeda japonica* Makino. *Plant Prod. Sci.* 13, 351–359. <https://doi.org/10.1626/pps.13.351>
- Haynes, R.J., 1980. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: Their role in ion accumulation by plants, in: *The Botanical Review*. pp. 75–99. <https://doi.org/10.1007/BF02860867>
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F., 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell Environ.* 23,

853–862. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00602.x>

- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. Preparing the nutrient solution. *Water-Culture Method Grow. Plants without Soil* 347, 29–31. <https://doi.org/citeulike-article-id:9455435>
- Ishikawa, T., Shabala, S., 2019. Control of xylem Na<sup>+</sup> loading and transport to the shoot in rice and barley as a determinant of differential salinity stress tolerance. *Physiol. Plant.* 165, 619–631. <https://doi.org/10.1111/ppl.12758>
- Jia, J., Liang, Y., Gou, T., Hu, Y., Zhu, Y., Huo, H., Guo, J., Gong, H., 2020. The expression response of plasma membrane aquaporins to salt stress in tomato plants. *Environ. Exp. Bot.* 178, 104190. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104190>
- Karley, A.J., Leigh, R.A., Sanders, D., 2000. Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends Plant Sci.* 5, 465–470. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01758-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01758-1)
- Kokila, S., D, M.R., Devaraj, V.R., 2014. Response of *Lablab purpureus* (Hyacinth bean) cultivars to drought stress. *Pelagia Res. Libr. Asian J. Plant Sci. Res.* 4, 48–55.
- Küpper, H., Seibert, S., Parameswaran, A., 2007. Fast Sensitive and Inexpensive Alternative to analytical pigment HPLC-quantification of chlorophylls and carotenoids. *Anal. Chem.* 79, 7611–7627. <https://doi.org/10.1021/ac070236m>
- Leigh, R.A., Jones, R.G.W., 1994. A Hypothesis Relating critical K Concentration for Growth to the Distribution and Functions of this Ions in Plant Cell. *New Phytol.*
- Li, L., Aro, E.M., Millar, A.H., 2018. Mechanisms of Photodamage and Protein Turnover in Photoinhibition. *Trends Plant Sci.* 23, 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.004>
- Liu, C., Li, C., Liang, D., Wei, Z., Zhou, S., Wang, R., Ma, F., 2012. Differential expression of ion transporters and aquaporins in leaves may contribute to different salt tolerance in *Malus* species. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.06.019>
- Liu, J., Zhu, J.K., 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114, 591–596. <https://doi.org/10.1104/pp.114.2.591>
- Maass, B., 2016. Domestication, origin and global dispersal of *Lablab purpureus* (L.) Sweet (Fabaceae): current understanding.
- Maass, B.L., Knox, M.R., Venkatesha, S.C., Angessa, T.T., Ramme, S., Pengelly, B.C., 2010. *Lablab purpureus*-A Crop Lost for Africa? *Trop. Plant Biol.* 3, 123–135. <https://doi.org/10.1007/s12042-010-9046-1>

- Matos, A.R., Hourton-Cabassa, C., Çiçek, D., Rezé, N., Arrabaça, J.D., Zachowski, A., Moreau, F., 2007. Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana fad2* and *FAD3+* cell suspensions altered in membrane lipid composition. *Plant Cell Physiol.* 48, 856–865. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm061>
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T., Santoni, V., 2008. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 595–624. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734>
- Mittler, R., 2016. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Munns, A.R., James, R.A., Gilliham, M., Flowers, T.J., Colmer, T.D., 2016. Tissue tolerance : an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Funct. Plant Biol.* 43, 1103–1113.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environ.* 25, 239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nandwa, S.M., Bationo, A., Obanyi, S.N., Rao, I.M., Sanginga, N., 2011. Fighting Poverty in Sub-Saharan Africa: The Multiple Roles of Legumes in Integrated Soil Fertility Management, in: *Inter and Intra-Specific Variation of Legumes and Mechanisms to Access and Adapt to Less Available Soil Phosphorus and Rock Phosphate.* pp. 47–66. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1536-3>
- NAS, 1979. Lablab bean, in: *Tropical Legumes: Resources for the Future.* pp. 59–67.
- Nepomuceno, D.D., Almeida, J.C.C., Galzerano, L., Pereira, T.P., Ribeiro, E.T., Faria, M.A.G., Mendonça, D.C., 2013. Medidas lineares na estimativa da área foliar de leguminosas forrageiras tropicais. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., 2011. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol. Plant.* 142, 35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x>
- Öquist, G., Chow, W.S., Anderson, J.M., 1992. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta* 186, 450–460. <https://doi.org/10.1007/BF00195327>
- Panda, D., Rao, D.N., Sharma, S.G., Strasser, R.J., Sarkar, R.K., 2006. Submergence effects on rice

- genotypes during seedling stage: Probing of submergence driven changes of photosystem 2 by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients. *Photosynthetica* 44, 69–75. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0200-1>
- Parida, A.K., Veerabathini, S.K., Kumari, A., Agarwal, P.K., 2016. Physiological, anatomical and metabolic implications of salt tolerance in the halophyte *Salvadora persica* under hydroponic culture condition. *Front. Plant Sci.* 7, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00351>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4056–4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>
- Peel, A.J., 2013. Transport of Nutrients in Plants.
- Pengelly, B.C., Maass, B.L., 2001. *Lablab purpureus* (L.) Sweet - Diversity, potential use and determination of a core collection of this multi-purpose tropical legume. *Genet. Resour. Crop Evol.* 48, 261–272. <https://doi.org/10.1023/A:1011286111384>
- Rengasamy, P., 2006. World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 57, 1017–1023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj108>
- Robin, A.H.K., Matthew, C., Uddin, M.J., Bayazid, K.N., 2016. Salinity-induced reduction in root surface area and changes in major root and shoot traits at the phytomer level in wheat. *J. Exp. Bot.* 67, 3719–3729. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw064>
- Robotham, O., Chapman, M., 2017. Population genetic analysis of hyacinth bean (*Lablab purpureus* (L.) Sweet, Leguminosae) indicates an East African origin and variation in drought tolerance. *Genet. Resour. Crop Evol.* 64, 139–148. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0339-y>
- Ruiz-Sánchez, M.C., Domingo, R., Torrecillas, A., Pérez-Pastor, A., 2000. Water stress preconditioning to improve drought resistance in young apricot plants. *Plant Sci.* 156, 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00262-4)
- Ruiz, J.M., Blasco, B., Rivero, R.M., Romero, L., 2005. Nicotine-free and salt-tolerant tobacco plants obtained by grafting to salinity-resistant rootstocks of tomato. *Physiol. Plant.* 124, 465–475. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00532.x>
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F., 2002. Calcium at the Crossroads of Signaling Calcium Signals: A Central Paradigm in Plant Cell 401–417. <https://doi.org/10.1105/tpc.002899.Calcium>
- Sebastianiana, M., da Silva, A.B., Matos, A.R., Alcântara, A., Silvestre, S., Malhó, R., 2018. Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* reduces stress induced by drought in cork

- oak. *Mycorrhiza* 28, 247–258. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0823-2>
- Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H., Rocha-Sosa, M., 2004. Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.08.003>
- Sergio, L., de Paola, A., Cantore, V., Pieralice, M., Cascarano, N.A., Bianco, V.V., Di Venere, D., 2012. Effect of salt stress on growth parameters, enzymatic antioxidant system, and lipid peroxidation in wild chicory (*Cichorium intybus* L.). *Acta Physiol. Plant.* 34, 2349–2358. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1038-3>
- Shahzad, A., Ahmad, M., Iqbal, M., Ahmed, I., Ali, G.M., 2012. Evaluation of wheat landrace genotypes for salinity tolerance at vegetative stage by using morphological and molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 11, 679–692. <https://doi.org/10.4238/2012.March.19.2>
- Shrivastava, P., Kumar, R., 2015. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Sperry, J.S., Wang, Y., Wolfe, B.T., Mackay, D.S., Anderegg, W.R.L., McDowell, N.G., Pockman, W.T., 2016. Pragmatic hydraulic theory predicts stomatal responses to climatic water deficits. *New Phytol.* 212, 577–589. <https://doi.org/10.1111/nph.14059>
- Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H., Strasser, R.J., 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1320, 95–106. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00017-0)
- Strasser, R.J., Stirbet, A.D., 2001. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P Fitting of experimental data to three different PS II models. *Math. Comput. Simul.* 56, 451–462. [https://doi.org/10.1016/s0378-4754\(01\)00314-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4754(01)00314-7)
- Sun, J., Chen, S.L., Dai, S.X., Wang, R.G., Li, N.Y., Shen, X., Zhou, X.Y., Lu, C.F., Zheng, X.J., Hu, Z.M., Zhang, Z.K., Song, J., Xu, Y., 2009. Ion flux profiles and plant ion homeostasis control under salt stress. *Plant Signal. Behav.* 4, 261–264. <https://doi.org/10.4161/psb.4.4.7918>
- Taïbi, K., Taïbi, F., Ait Abderrahim, L., Ennajah, A., Belkhodja, M., Mulet, J.M., 2016. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African J. Bot.* 105, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.011>
- Taiz, L., Zeiger, E., 2003. *Plant physiology.*, 3rd ed, Science progress. Sinauer Associates.

- Tavakkoli, E., Fatehi, F., Coventry, S., Rengasamy, P., McDonald, G.K., 2011. Additive effects of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions on barley growth under salinity stress. *J. Exp. Bot.* 62, 2189–2203. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq422>
- Turan, M.A., Katkat, V., Taban, S., 2007. Salinity-induced stomatal resistance, proline, chlorophyll and ion concentrations of bean. *Int. J. Agric. Res.* 2, 483–488. <https://doi.org/10.3923/ijar.2007.483.488>
- Upchurch, R.G., 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* 30, 967–977. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>
- Verdcourt, B., 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the “Flora of Tropical East Africa”: II, in: *Nature*. pp. 235–307. <https://doi.org/10.1038/144504a0>
- Vidigal, P., Duarte, B., Cavaco, A.R., Caçador, I., Figueiredo, A., Matos, A.R., Viegas, W., Monteiro, F., 2018. Preliminary diversity assessment of an undervalued tropical bean (*Lablab purpureus* (L.) Sweet) through fatty acid profiling. *Plant Physiol. Biochem.* 132, 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.001>
- Vidigal, P., Romeiras, M.M., Monteiro, F., 2019. Crops Diversification and the Role of Orphan Legumes to Improve the Sub-Saharan Africa Farming Systems. *Intech i*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Vidigal, P., Santos, E.S., Correia, A.M., Monteiro, F., Abreu, M.M., 2020. Perspective of the rehabilitation of marginal areas: the case of *Lablab purpureus* (L.) Sweet, in: *EGU General Assembly 2020*. p. 11421. <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu2020-11421>
- Waisel, Y., 1972. Biology of Halophytes, in: *Biology of Halophytes*.
- Wang, C.Q., Zhao, J.Q., Chen, M., Wang, B.S., 2006. Identification of betacyanin and effects of environmental factors on its accumulation in halophyte *Suaeda salsa*. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* 32, 195–201.
- Wentworth, M., Ruban, A. V., Horton, P., 2000. Chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complexes induced by zeaxanthin. *FEBS Lett.* 471, 71–74. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01369-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01369-7)
- Yang, Z., Li, J.L., Liu, L.N., Xie, Q., Sui, N., 2020. Photosynthetic Regulation Under Salt Stress and Salt-Tolerance Mechanism of Sweet Sorghum. *Front. Plant Sci.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01722>
- Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A.H., Demiral, T., 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and

proline accumulation. Environ. Exp. Bot. 61, 49–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.02.010>

- Zandalinas, S.I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol. Plant.* 162, 2–12.  
<https://doi.org/10.1111/ppl.12540>
- Zarei, M., Shabala, S., Zeng, F., Chen, X., Zhang, S., Azizi, M., Rahemi, M., Davarpanah, S., Yu, M., Shabala, L., 2019. Comparing Kinetics of Xylem Ion Loading and Its Regulation in Halophytes and Glycophytes. *Plant Cell Physiol.* 61, 403–415. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz205>
- Zhang, L., Ma, H., Chen, T., Pen, J., Yu, S., Zhao, X., 2014. Morphological and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants to salinity. *PLoS One* 9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112807>
- Zhu, J.-K., 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>
- Zhu, J.K., 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 441–445.  
[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00085-2)
- Zhu, X.G., Govindjee, Baker, N.R., DeSturler, E., Ort, D.R., Long, S.P., 2005. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II. *Planta* 223, 114–133.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-005-0064-4>

Tabela 3 Sumário dos parâmetros de análise da Fluorometria e a sua descrição sintetizada

<i>Eficiência do Fotossistema II</i>	
$F_0$	Fluorescência basal
$F_{max}$	Fluorescência máxima
<i>Curvas Rápidas de Luz (RLCs)</i>	
$rETR$	Taxa relativa de transporte eletrónico a cada intensidade de luz ( $rETR=QY \times PAR \times 0.5$ )
$ETR_{max}$	ETR máximo obtido da RLC após a qual, a fotoinibição é observada
$\alpha$	Eficiência fotossintética, obtida da parte inicial da RLC
<i>Variáveis derivadas da cadeia transportadora de eletrões (CTE)</i>	
<i>AOECs</i>	Complexos de oxigénio ativos
$M_o$	Taxa de turnover dos centros de reação
$N$	Taxa de fecho dos centros de reação
$S_m$	Turnover de redox múltiplo das quinonas
<i>Area</i>	Tamanho do pool de quinonas oxidadas disponíveis para redução (função da área abaixo da curva de Kautsky)
<i>Fluxos de energia</i>	
<i>ABS/CS</i>	Fluxo de energia absorvido
<i>TR/CS</i>	Fluxo de energia preso
<i>ET/CS</i>	Fluxo do transporte eletrónico de energia
<i>DI/CS</i>	Fluxo de energia dissipado
<i>RC/CS</i>	Número de centros de reação disponíveis por cada secção de folha
<i>Outras variáveis</i>	
<i>RC/ABS</i>	Densidade dos centros de reação (RC) nas antenas fotossintéticas
$RE_0/RC$	Contribuição do transporte eletrónico desde o plastoquinol até aos aceitadores de eletrões do PSI
$TR_0/DI_0$	Contribuição das reações à luz para a fotoquímica primária
$\psi_0/(1 - \psi_0)$	Contribuição das reações da fase escura entre a $Q_A$ e a plastoquinona
$\delta R_0/(1 - \delta R_0)$	Contribuição da redução dos aceitadores de eletrões do PSI
$\psi E_0/(1 - \psi E_0)$	Constante de equilíbrio redox entre o PSII e o PSI