

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



IMPACTO DA SECA EM VARIEDADES PORTUGUESAS DE FEIJÃO-FRADE

Rita Isabel Vieira Moreira

ORIENTADOR(A):  
Doutora Paula Scotti Lorenzini Borges  
Campos

COORIENTADOR(A):  
Doutora Magda Alexandra Nobre Martins  
Aguiar de Andrade Fontes

2022

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



IMPACTO DA SECA EM VARIEDADES PORTUGUESAS DE FEIJÃO-FRADE

Rita Isabel Vieira Moreira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

VOGAIS:

Doutora Paula Cristina Bento Batista dos Santos

Doutora Paula Scotti Lorenzini Borges Campos

ORIENTADOR(A):

Doutora Paula Scotti Lorenzini Borges Campos

COORIENTADOR(A):

Doutora Magda Alexandra Nobre Martins Aguiar de Andrade Fontes

2022

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Rita Isabel Vieira Moreira

Título da Tese ou Dissertação: Impacto da seca em variedades portuguesas de feijão-frade

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2022

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado em Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 08 de novembro de 2022

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Rita Isabel Vieira Moreira*

## Agradecimentos

Apesar do grande trabalho e empenho individual associado a uma dissertação de mestrado, muito dos objetivos alcançados, técnicas aprendidas, conhecimento adquirido e estratégias desenvolvidas só são possíveis com o contributo de todos aqueles que direta ou indiretamente se cruzam no nosso caminho nestes 2 anos de aprendizagem. Logo, é com enorme reconhecimento que manifesto os meus agradecimentos:

À minha orientadora Doutora Paula Scotti (INIAV), responsável pela orientação deste trabalho, que me proporcionou a integração num projeto envolvente e essencial no contexto atual, pela competência profissional e rigor científico que me transmitiu assim como pela leitura cuidadosa e pelas sugestões de melhoria e apoio neste trabalho;

À minha coorientadora Professor Doutora Magda Fontes (FMV), pela pronta disponibilidade, incentivo e apoio;

À FMV e ao corpo docente e não docente pelo mestrado desenvolvido e todos os esforços realizados num contexto pandémico;

À Mestre Isabel Pais (INIAV) pela competência profissional e rigor científico que me transmitiu bem como a partilha de conhecimento, sugestões e apoio que foi dando ao longo do tempo, que se traduziram em valiosos contributos e ensinamentos para o meu trabalho e para mim, enquanto pessoa, assim como todo apoio e motivação para abraçar este projeto;

À Doutora Cátia Nunes (INIAV), à qual reconheço a generosidade e disponibilidade para o meu acompanhamento e integração no projeto da qual é responsável, agradeço o apoio nas diversas fases deste projeto, caminhamos juntas numa pequena parte, resultando em frutos e compensando todo o trabalho e dedicação;

Ao Doutor José Semedo (INIAV) pela dádiva de conhecimentos e preciosa ajuda na determinação das trocas gasosas, motivação e palavras de incentivo pela manhã;

À colega Alexandrina Loureiro (INIAV) pela preciosa ajuda durante todo o trabalho e no controlo das regas na estufa, mesmo sob belas temperaturas;

Aos colegas da Fisiologia Vegetal do INIAV, Eng.º Mário Santos e Técnica Paula Vasilenko, assim como todos os colegas do grupo da Biologia Molecular pelo ânimo, partilha e apoio que deram, num ano particularmente difícil para todos, com mudanças de laboratórios, obras e muitos outros contratemplos que não se ultrapassavam sem a ajuda de todos;

Às colegas do INIAV- Elvas, Doutor José Moreira, Doutora Ana Sofia Bagulho e Doutora Graça Pereira, pela enorme ajuda e colaboração nas determinações de proteína bruta, e a toda a Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Biotecnologia e Recursos Genéticos, nomeadamente ao seu coordenador Doutor Benvindo Maçãs.

Aos colegas do 13º Mestrado em Segurança Alimentar da FMV, que apesar de atravessarmos este caminho sob grandes constrangimentos, máscaras, aulas online,

distanciamento físico, conseguimos sempre partilhar conhecimentos, vivências e concluir mais uma etapa das nossas vidas;

Amigos e família, destacando o Diogo Madeira e a Rita Loureiro pelo grande apoio sempre que foi necessário ficar com a minha filha, a grande Martinha, para poder ir às aulas. Mas especialmente e com tremenda gratidão aos grandes amigos Leonor Santos, Marta Barros e Fábio Santos por nunca terem faltado, por toda a ajuda e incentivo que me deram, pelas vezes que foram buscar a Marta à escola e lhe proporcionaram momentos felizes, nunca permitindo que a minha falta fosse sentida;

Ao meu amigo e marido Ricardo Madeira, pela equipa que montamos ao longo destes 19 anos lado a lado, construindo o caminho um do outro, que sempre me incentivou e não me deixou vencer pelo cansaço, mesmo quando parecia impossível conciliar a vida académica, profissional e pessoal. Agradeço a paciência para me ouvir nos momentos em que a ansiedade tomava conta de mim e a tranquilidade e o conforto que me proporcionou nos momentos em que mais precisava.

Mas especialmente à minha Martinha, filha linda, maravilhosa, inteligente e fofinha, que sempre esteve ao meu lado, que desenhou e pintou todos os meus apontamentos, que partilhou a secretária comigo vezes sem conta e me encheu de orgulho a cada dia, garantindo que da mesma forma, estarei ao lado dela na secretária a partir de hoje, que inicia ela a sua vida escolar, com todo o entusiasmo de quem quer aprender a ler, escrever e ser feliz. Porque juntos chegamos longe e felizes.

Por último, agradeço a todos os que, embora não claramente referidos, mas sem dúvida importantes, ajudaram e contribuíram para esta etapa ser concluída com dedicação e orgulho.

*Se não houver frutos, valeu a beleza das flores;  
se não houver flores, valeu a sombra das folhas;  
se não houver folhas, valeu a intenção da semente.  
Henfil*

# Impacto da seca em variedades portuguesas de feijão-frade

## Resumo

A par com o aumento da população, as alterações climáticas globais representam uma ameaça crítica à produção agrícola e sustentabilidade das culturas, comprometendo o objetivo de segurança alimentar e nutricional para todos. Sendo a região Mediterrânica apontada como uma das mais vulneráveis às alterações climáticas, e onde se prevê a ocorrência de secas mais frequentes e prolongadas, urge criar sistemas agroalimentares sustentáveis e resilientes, capazes de alimentar o mundo sem debilitar o planeta, de forma a mantê-lo vivo e saudável para as gerações futuras.

As leguminosas são referidas pela FAO como poderoso superalimento, sendo das culturas mais nutritivas e com elevados benefícios para a saúde. Consideradas de baixo custo, conseguem produzir em terras áridas e apresentam uma longa vida útil. O seu cultivo ajuda na redução de GEE e aumenta o sequestro de carbono, melhora a fertilidade dos solos e nutre as culturas do lado e as seguintes. O feijão-frade é particularmente tolerante à seca, apresentando uma vasta diversidade de variedades locais, adaptadas a diversos ambientes. Tendo em conta a importância de conhecer e valorizar a variabilidade genética desta espécie em Portugal, neste estudo avaliou-se o impacto da seca em quatro variedades locais de feijão-frade (L1 a L4) de diferentes regiões do país e uma variedade comercial (CV) como referência. Procedeu-se à monitorização do desenvolvimento e avaliação de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em resposta à seca terminal (imposta durante a fase reprodutiva) e seus efeitos na produção e qualidade do grão produzido.

Sob seca as variedades L1 e L2 apresentaram maturação precoce como estratégia para evitar o défice hídrico, tendo sido notória a alteração morfológica da parte aérea das plantas em todas as variedades, com diminuição rápida do número de folhas e redução do número de flores e vagens entre 44 e 72 %. Em termos fisiológicos a resistência à seca das variedades resultou da manutenção da turgescência foliar e de um controlo estomático eficiente. A capacidade de manter um teor hídrico relativo (RWC) elevado sob défice hídrico (ca. 80 %) poderá ter evitado danos mais fortes ao nível membranar (<14 %). Todas as variedades evitaram a desidratação através da diminuição da condutância estomática e da transpiração. A diminuição da fotossíntese é resultado desta estratégia, assim como de ligeiras perturbações na atividade fotoquímica de PSII indicadas pela fluorescência da clorofila a, com exceção de L1. L1 e L3 apresentaram melhor eficiência instantânea do uso da água (iWUE) quando submetidas a défice hídrico. CV e L4 não alteraram os teores relativos de clorofila (SPAD) sob seca, com CV a manter a cor verde durante toda a fase reprodutiva. O aumento do teor de carotenóides em plena floração sugere a existência de mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos em todas as variedades. Apesar das modificações fisiológicas e bioquímicas de resposta ao stresse, o rendimento em grão sofreu fortes reduções (63 % a 73 %). Os parâmetros de qualidade do grão, cor, proteína e açúcares solúveis, não variaram significativamente em função dos regimes hídricos impostos, com exceção dos açúcares da família da rafinose que estão associados aos mecanismos adaptativos das plantas à seca.

O desempenho das variedades locais de feijão-frade reflete a adaptação adquirida no passado pela exposição a condições de aridez, entre outras, realçando o inestimável recurso agronómico e genético existente na espécie, ainda pouco explorado e valorizado, e que poderá contribuir para as estratégias de adaptação agronómica à seca tendo em vista a produção, o valor nutricional e a segurança alimentar.

**Palavras-chave:** Alterações climáticas; feijão-frade; leguminosas; seca; variedades locais.

# Impact of Drought on cowpea portuguese

## Abstract

Along with population growth, global climate change poses a critical threat to agricultural production and crop sustainability, undermining the goal of food and nutrition security for all. The Mediterranean region is identified as one of the most vulnerable to climate change, being prone to more frequent and prolonged droughts. It is urgent to create sustainable and resilient agri-food systems, capable of feeding the world without malnourishing the planet, in order to maintain it alive and healthy for future generations.

Legumes are identified by the FAO as a powerful superfood, and one of the most nutritious crops, with high health benefits. Considered low-cost crops, they can produce in arid lands and have a long useful life. Their cultivation helps to reduce GHG and increases carbon sequestration, improving soil fertility and nourishing crops next to and beyond. Cowpea is particularly drought tolerant, presenting a wide diversity of local varieties, adapted to different environments. Considering the importance of knowing and preserving this genetic variability of this species in Portugal, this study evaluated the impact of drought on four local cowpea varieties (L1 to L4) from different regions of the country and a commercial variety (CV) as reference. The development was monitored, and morphological, physiological and biochemical characteristics were evaluated in response to terminal drought (imposed during the reproductive phase) and its effects on the production and quality of the grain produced.

Under drought, varieties L1 and L2 presented early maturation as a strategy to avoid water deficit, with the morphological alteration of the aerial part of the plant being notorious in all varieties, with a rapid decrease in the number of leaves and a reduction in the number of flowers and pods between 44 and 72 %. In physiological terms, the drought resistance of the varieties resulted from the maintenance of leaf turgidity and an efficient stomatal control. The ability to maintain a high relative water content (RWC) under water deficit (ca. 80 %) may have prevented more severe damage at the membrane level (<14 %). All varieties avoided dehydration by decreasing stomatal conductance and transpiration. Decreased photosynthesis is a result of this strategy, as well as slight disturbances in PSII photochemical activity indicated by chlorophyll *a* fluorescence, with the exception of L1. L1 and L3 showed better instantaneous water use efficiency (iWUE) when submitted to water deficit. CV and L4 did not change the relative chlorophyll contents (SPAD) under drought, with CV maintaining the green color throughout the reproductive phase. The increase in carotenoid content in full bloom suggests the existence of non-enzymatic antioxidant defense mechanisms in all varieties. Despite physiological and biochemical changes in response to stress, grain yield suffered strong reductions (63 % to 73 %). The parameters of grain quality, color, protein and soluble sugars did not vary significantly as a function of the imposed water regimes, with the exception of sugars from the raffinose family, which are associated with the adaptive mechanisms of plants to drought.

The performance of local cowpea varieties reflects the adaptation acquired in the past by exposure to arid conditions, among others, highlighting the invaluable agronomic and genetic resource existing in the species, still little explored and valued, and which may contribute to the strategies of agronomic adaptation to drought for production, nutritional value and food security.

**Key-words:** Climate changes; cowpea; drought; landraces; pulses.

## Índice

### Conteúdo

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos .....  | iii  |
| Resumo.....   | v    |
| Abstract.....   | vi   |
| Índice .....  | vii  |
| Índice de figuras.....  | x    |
| Índice de tabelas .....   | xi   |
| Índice de gráficos .....  | xii  |
| Lista de abreviaturas, símbolos, siglas e acrónimos.....                            | xiii |
| Capítulo 1 – Introdução .....   | 1    |
| 1.1 Relevância do tema.....   | 1    |
| 1.2 Enquadramento e objetivos.....  | 2    |
| 1.3 Estrutura da dissertação .....  | 3    |
| Capítulo 2 – Revisão bibliográfica .....  | 5    |
| 2.1 Abordagem geral.....  | 5    |
| 2.2 Segurança alimentar e sustentabilidade – Leguminosas.....                       | 7    |
| 2.2.1 Segurança alimentar .....   | 7    |
| 2.2.2 Sustentabilidade agroalimentar .....  | 9    |
| 2.3 Alterações climáticas e biodiversidade .....                                    | 12   |
| 2.3.1 Biodiversidade.....   | 12   |
| 2.3.2 Alterações climáticas.....  | 13   |
| 2.4 A Seca .....  | 15   |
| 2.4.1 As plantas e a seca.....  | 17   |
| 2.5 Caracterização da espécie em estudo .....                                       | 21   |
| 2.5.1 Leguminosas.....  | 21   |
| 2.5.2 Feijão-frade – <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.....                        | 21   |
| 2.5.3 Qualidade nutricional e de saúde .....  | 24   |
| Capítulo 3 – Metodologia geral (Material e Métodos) .....                           | 28   |
| 3.1 Material vegetal.....   | 28   |
| 3.2 Condições de crescimento .....  | 29   |
| 3.3 Procedimento experimental.....  | 30   |
| 3.3.1 Capacidade campo (CC).....  | 30   |
| 3.3.2 Indução stresse hídrico .....   | 31   |
| 3.4 Monitorização do desenvolvimento e características morfológicas da planta ..... | 31   |
| 3.4.1 Conteúdo hídrico do solo - capacidade de campo.....                           | 31   |
| 3.4.2 Desenvolvimento fenológico.....   | 32   |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 3.4.3                                     | Floração e desenvolvimento de vagens .....  | 32 |
| 3.5                                       | Parâmetros de desempenho fisiológico e bioquímico – determinações na planta ..                      | 33 |
| 3.5.1                                     | Potencial hídrico ( $\Psi_w$ ).....   | 33 |
| 3.5.2                                     | Teor hídrico relativo (Relative water content - RWC).....   | 34 |
| 3.5.3                                     | Fuga de eletrólitos.....  | 34 |
| 3.5.4                                     | Trocas gasosas foliares .....   | 34 |
| 3.5.5                                     | Eficiência Fotossintética - Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....                               | 35 |
| 3.5.6                                     | Pigmentos fotossintéticos - Clorofilas e carotenóides totais .....                                  | 36 |
| 3.5.7                                     | Açúcares solúveis foliares.....   | 38 |
| 3.6                                       | Parâmetros agronômicos – Indicadores de produção.....   | 39 |
| 3.6.1                                     | Número de vagens por planta (NVP).....  | 39 |
| 3.6.2                                     | Número de grãos por vagem e planta (NGV; NGP).....  | 39 |
| 3.6.3                                     | Peso dos grãos por planta (PGP).....  | 39 |
| 3.6.4                                     | Peso das vagens por planta (PVP).....   | 39 |
| 3.6.5                                     | Peso de 100 grãos (P100G).....  | 40 |
| 3.7                                       | Parâmetros qualidade - Análise colorimétrica e composição do grão.....                              | 40 |
| 3.7.1                                     | Análise colorimétrica do grão .....   | 40 |
| 3.7.2                                     | Açúcares solúveis no grão .....   | 42 |
| 3.7.3                                     | Proteína bruta no grão .....  | 43 |
| 3.8                                       | Análise estatística .....   | 43 |
| Capítulo 4 – Resultados e Discussão ..... |   | 44 |
| 4.1                                       | Desenvolvimento fenológico e características morfológicas na resposta à seca ....                   | 44 |
| 4.1.1                                     | Crescimento e desenvolvimento fenológico .....  | 44 |
| 4.1.2                                     | Floração e desenvolvimento das vagens.....  | 46 |
| 4.2                                       | Desempenho fisiológico das plantas em resposta à seca .....   | 48 |
| 4.2.1                                     | Potencial hídrico.....  | 49 |
| 4.2.2                                     | Teor hídrico relativo - RWC.....  | 50 |
| 4.2.3                                     | Permeabilidade membranas – fuga de eletrólitos .....  | 51 |
| 4.2.4                                     | Trocas gasosas foliares .....   | 52 |
| 4.2.5                                     | Eficiência Fotossintética ( $F_v/F_m$ ; $F_v'/F_m'$ ).....  | 55 |
| 4.3                                       | Indicadores bioquímicos de resposta à seca.....   | 57 |
| 4.3.1                                     | Pigmentos Fotossintéticos .....   | 57 |
| 4.3.2                                     | Açúcares solúveis foliares.....   | 61 |
| 4.4                                       | Impacto da seca nos parâmetros agronômicos – indicadores da produção.....                           | 62 |
| 4.5                                       | Impacto da seca na qualidade do grão de feijão-frade (Cor, Açúcares solúveis e Proteína bruta)..... | 66 |
| 4.5.1                                     | Cor do grão.....  | 66 |
| 4.5.2                                     | Açúcares solúveis no grão .....   | 70 |

|   |  |     |
|---|--|-----|
| 4.5.3   | Proteína bruta no grão .....   | 74  |
| 4.5.4   | Relações entre parâmetros agronômicos, físicos e de qualidade estudados... | 76  |
| Capítulo 5 – Conclusão .....                  |  | 79  |
| Capítulo 6 – Referências Bibliográficas ..... |  | 82  |
| Anexos .....                                  |  | 101 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Potencial modelo de sustentabilidade dos sistemas agroalimentares de leguminosas, tendo por base a segurança alimentar e as alterações climáticas .....   | 6  |
| <b>Figura 2</b> - Dados da Balança Alimentar Portuguesa nos anos de 2016 e 2020 em comparação com o recomendado .....   | 9  |
| <b>Figura 3</b> - Estratégia Europeia “Farm to Fork” (Do Prado ao Prato) e estratégia mundial “ODS 2030” da FAO .....   | 10 |
| <b>Figura 4</b> - Pegada ecológica de alguns alimentos.....   | 11 |
| <b>Figura 5</b> - Impacto das alterações climáticas na região do mediterrâneo .....   | 14 |
| <b>Figura 6</b> - Percentagem do território de Portugal Continental por classe do índice PDSI em situações de seca anteriores em março .....  | 16 |
| <b>Figura 7</b> - Possíveis efeitos da seca nas plantas e suas respostas ao défice hídrico.....   | 19 |
| <b>Figura 8</b> - Principais países e regiões produtoras de feijão-frade .....  | 22 |
| <b>Figura 9</b> - Variabilidade morfológica de diferentes variedades de feijão-frade - planta, flores, vagens e sementes .....  | 23 |
| <b>Figura 10</b> - Importância das leguminosas no ciclo de vida e desenvolvimento humano.....   | 24 |
| <b>Figura 11</b> - Grão e flores das variedades em estudo .....   | 29 |
| <b>Figura 12</b> - Determinações com o analisador portátil de gases (CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O) por infravermelho - IRGA – Infra Red Gas Analyser - Li-Cor 6400. ....   | 35 |
| <b>Figura 13</b> - Determinação e leitura do teor relativo de SPAD com o equipamento SPAD-502 Plus, Konica-Minolta.....   | 37 |
| <b>Figura 14</b> - Termos para descrever as diferenças de Cromo (C*) e Luminosidade (L*). .....   | 41 |
| <b>Figura 15</b> - Características e alterações morfológicas das plantas, vagens e grãos produzidos na variedade comercial (CV) e nas variedades locais (L1, L2, L3 e L4) no tratamento hídrico de controlo (WW) e de défice hídrico (WD). .... | 46 |
| <b>Figura 16</b> - Relação entre os grupos de cores encontrados para as variedades em estudo, de acordo com as diferenças de Cromo (C*) e Luminosidade (L*). .....  | 69 |
| <b>Figura 17</b> - Variação fenotípica observada na variedade L4 .....  | 70 |

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Área agrícola (ha) e produção (ton) de feijão-frade no mundo .....  | 21 |
| <b>Tabela 2</b> - Composição nutricional do feijão-frade seco e cozido (demolhado) .....  | 25 |
| <b>Tabela 3</b> - Designação e origem das variedades de feijão-frade em estudo .....  | 28 |
| <b>Tabela 4</b> - Estágios de crescimento da planta de feijão-frade avaliados de acordo com a escala BBCH.....  | 32 |
| <b>Tabela 5</b> - Tabela com os valores da Correlação de Pearson e significância do tratamento, variedade e sua interação para os resultados das trocas gasosas foliares..... | 53 |
| <b>Tabela 6</b> - Teores de açúcares solúveis foliares nas plantas de feijão-frade em WW e WD expresso em função do seu peso seco .....                                       | 61 |
| <b>Tabela 7</b> - Valores da correlação de Pearson e nível de significância do tratamento, variedade e sua interação nos parâmetros agronômicos avaliados.....                | 65 |
| <b>Tabela 8</b> - Valores da diferença total de cor ( $\Delta E$ ) das amostras em déficit hídrico face ao controlo .....   | 70 |
| <b>Tabela 9</b> - Teores de açúcares solúveis no grão de feijão-frade em WW e WD.....   | 72 |
| <b>Tabela 10</b> - Valores da correlação de Pearson e nível de significância do tratamento, variedade e sua interação nos parâmetros de qualidade do grão.....                | 77 |

## Índice de gráficos

|   |    |
|---|----|
| <b>Gráfico 1</b> - Valores médios de temperatura e humidade relativa máximas e mínimas observadas na estufa no período do ensaio. ....                              | 29 |
| <b>Gráfico 2</b> - Conteúdo hídrico do solo expresso em capacidade de campo (CC) ao longo do ensaio e desenvolvimento fenológico de cada variedade/tratamento. .... | 45 |
| <b>Gráfico 3</b> - Desenvolvimento da floração durante a imposição do défice hídrico nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....                                   | 47 |
| <b>Gráfico 4</b> - Desenvolvimento de vagens durante a imposição do défice hídrico nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....                                     | 48 |
| <b>Gráfico 5</b> - Potencial hídrico nas plantas ( $\Psi_{PD}$ e $\Psi_{MD}$ ) de feijão-frade em WW e WD. ....   | 49 |
| <b>Gráfico 6</b> - Teor hídrico relativo (RWC) foliar nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....  | 50 |
| <b>Gráfico 7</b> - Índice de dano membranar (I%) nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....   | 51 |
| <b>Gráfico 8</b> - Trocas gasosas foliares – Pn, gs, E, Ci, nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....  | 52 |
| <b>Gráfico 9</b> - Eficiência instantânea do uso da água (iWUE) nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....  | 54 |
| <b>Gráfico 10</b> - Fluorescência da clorofila a ( $Fv/Fm$ e $Fv'/Fm'$ ) nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....   | 56 |
| <b>Gráfico 11</b> - Teor relativo de clorofila (SPAD) nas plantas de feijão-frade em WW e WD ao longo da fase reprodutiva. ....                                     | 58 |
| <b>Gráfico 12</b> - Teores de clorofila e carotenóides e suas razões nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....   | 59 |
| <b>Gráfico 13</b> - Número de vagens e grãos por planta e número de grãos por vagem obtidos nas plantas de feijão-frade em WW e WD. ....                            | 63 |
| <b>Gráfico 14</b> - Peso dos grãos e das vagens por planta e peso de 100 grãos obtidos das plantas de feijão-frade em WW e WD. ....                                 | 64 |
| <b>Gráfico 15</b> - Análise colorimétrica dos grãos de feijão-frade obtidos em WW e WD pelo sistema CIE L*C*h e CIE L*a*b*. ....                                    | 67 |
| <b>Gráfico 16</b> - Perfil de açúcares analisados em cada variedade sob controlo (WW) e sob défice hídrico (WD). ....   | 71 |
| <b>Gráfico 17</b> - Teores de proteína bruta (%) no grão de feijão-frade em WW e WD. ....   | 75 |

## Lista de abreviaturas, símbolos, siglas e acrónimos

|                  |  |
|------------------|--|
| %                | Porcentagem  |
| <                | Menor  |
| >                | Maior  |
| AEA              | Agência Europeia do Ambiente   |
| ANOVA            | Análise de variâncias  |
| APA              | Agência Portuguesa do Ambiente   |
| APX              | Ascorbato peroxidase   |
| BAP              | Balança Alimentar Portuguesa   |
| B BCH            | “Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie” (Centro Federal de Investigação Biológica, Instituto Federal das Variedades Vegetais e Indústria Química)   |
| BPGV             | Banco Português de Germoplasma Vegetal   |
| C                | Cromaticidade  |
| ca.              | cerca  |
| CC               | Capacidade de campo  |
| Ci               | Concentração interna de CO <sub>2</sub>  |
| CIE Lab          | Comission Internationale de Éclairage, espaço de cor L*a*b*  |
| CO <sub>2</sub>  | Dióxido de carbono   |
| CoHeSus          | Cowpea ( <i>Vigna unguiculata</i> ) genetic diversity for a Sustainable Healthy diet (Estudo da diversidade genética de feijão-frade para uma dieta mais saudável e sustentável) |
| Covid-19         | Pandemia do Coronavírus  |
| E                | Transpiração   |
| FAN              | Fatores anti nutricionais  |
| FAO              | Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)   |
| FAOSTAT          | Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division   |
| Fv/Fm            | Eficiência fotoquímica potencial máxima do PSII  |
| Fv'/Fm'          | Eficiência real do PSII  |
| g                | grama  |
| GEE              | Gases com efeito de estufa   |
| GR               | Glutathione reductase  |
| gs               | Condutância estomática   |
| H                | Hora   |
| h°               | Ângulo hue   |
| H <sub>2</sub> O | Água   |
| ha               | hectare  |
| HPLC             | High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)   |
| HR               | Humidade relativa  |
| I%               | Índice de dano membranar em %  |
| INE              | Instituto Nacional de Estatística  |
| INIAV            | Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária   |
| INSA             | Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge   |
| IPCC             | Intergovernmental Panel on Climate Change (Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas)  |
| IPMA             | Instituto Português do Mar e da Atmosfera  |
| IRGA             | Infra red gas analyser (Analisador de gases por infravermelhos)  |
| iWUE             | Instantaneous water use efficiency (Eficiência instantânea do uso da água)   |

|                |   |
|----------------|---|
| kg             | Quilograma  |
| L              | Litro   |
| LED            | Díodo emissor de luz  |
| m              | metro   |
| min            | Minuto  |
| mL             | Mililitro   |
| mm             | Milímetro   |
| mS             | Milisiemens   |
| N              | Nitrogénio  |
| NaOH           | Hidróxido de Sódio  |
| NGP            | Número de grãos por planta  |
| NGV            | Número de grãos por vagem   |
| nm             | nanometro   |
| Nº             | Número  |
| NP             | Norma portuguesa  |
| NVP            | Número de vagens por planta   |
| O <sub>2</sub> | Oxigénio  |
| °C             | Graus Celsius   |
| ODS            | Objetivos do desenvolvimento sustentável  |
| OECD           | Organisation for Economic Co-operation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico)    |
| ONU            | Organização das Nações Unidas   |
| P100G          | Peso de 100 grãos   |
| PDSI           | Palmer Drought Severity Index (Índice de severidade da seca de Palmer)  |
| PF             | Peso fresco   |
| PGP            | Peso dos grãos por planta   |
| Pn             | Taxa fotossintética líquida   |
| PNPOT          | Programa Nacional da Política do Ordenamento do Território  |
| ppm            | Partes por milhão   |
| PS             | Peso seco   |
| PSII           | Photosystem II (Fotossistema II)  |
| PT             | Peso túrgido  |
| PVP            | Peso das vagens por planta  |
| ROS            | Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigénio)   |
| rpm            | Rotações por minuto   |
| RWC            | Relative Water Content (Teor de água relativo)  |
| SE             | Standard Error (Erro padrão)  |
| SOD            | Superóxido dismutase  |
| SOFI 2021      | The State of Food Security and Nutrition in the World 2021 (O Estado da Segurança Alimentar e Nutrição no Mundo 2021) |
| SPAD           | Soil Plant Analysis Development (Teor relativo de clorofila)  |
| T              | Temperatura em °C   |
| t              | tonelada  |
| UE             | União Europeia  |
| WD             | Défice hídrico  |
| WW             | Conforto hídrico  |
| ΔE             | Diferença total de cor  |
| μL             | Microlitro  |
| Ψ              | Potencial hídrico   |

## **Capítulo 1 – Introdução**

### **1.1 Relevância do tema**

Alinhados com todos os povos, enquanto cidadãos, estudantes e/ou profissionais, temos o dever e a obrigação de cuidar do planeta pelo qual somos responsáveis. Urge alterar e transformar positivamente os nossos hábitos, preservando o mundo para as gerações presentes e futuras.

Neste sentido, o tema desta dissertação enquadra-se na resolução da Organização das Nações Unidas intitulada “Transformar o mundo: Agenda 2030 de Desenvolvimento Sustentável”, mais concretamente no que respeita aos seguintes Objetivos:

Objetivo 2 - Erradicar a fome (Erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promover a agricultura sustentável) que visa garantir acesso a alimentação de qualidade, nutritiva e suficiente, usando sistemas sustentáveis de produção com a implementação de práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, com amplificação das capacidades de adaptação às alterações climáticas e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo, mantendo também a diversidade genética de sementes e plantas cultivadas;

Objetivo 12 - Produção e consumo sustentáveis (Garantir padrões de consumo e de produção sustentáveis) para alcançar a gestão sustentável e o uso eficiente dos solos;

Objetivo 13 - Ação climática (Adotar medidas urgentes para combater as alterações climáticas e os seus impactos) reforçando a resiliência e a capacidade de adaptação a riscos relacionados com o clima;

Objetivo 15 - Proteger a vida terrestre (Proteger, restaurar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, travar e reverter a degradação dos solos e travar a perda de biodiversidade) assegurando a conservação, recuperação e uso sustentável de ecossistemas terrestres e de água doce interior, assim como restaurar a terra e solo degradados e lutar para alcançar um mundo neutro em termos de degradação do solo.

O tema deste trabalho enquadra-se ainda na estratégia Europeia “Farm to Fork” e na estratégia Nacional, a “Agenda de Inovação para a Agricultura 20/30 – Terra Futura”, uma vez que incide no estudo da seca na cultura do feijão-frade, uma leguminosa com relevância agronómica, ambiental e económica, pouco valorizada em Portugal. As variedades locais de feijão-frade existentes em Portugal encerram em si um importante património genético, património esse que é necessário conhecer, estudar e conservar, com vista à conservação e valorização dos recursos genéticos vegetais existentes, assegurando a sua possível utilização no melhoramento genético da cultura.

## 1.2 Enquadramento e objetivos

O aumento exponencial da população mundial, a diminuição de terreno arável devido às alterações climáticas e à poluição dos solos tornam a segurança alimentar um desafio crescente na produção de alimentos. A segurança alimentar promove o acesso físico e económico das populações a alimentos seguros e nutritivos, e em quantidades que satisfaçam as necessidades nutricionais para uma vida ativa e saudável, o que na atualidade se torna uma tarefa cada vez mais difícil e exigente.

Face aos objetivos da segurança alimentar e do desenvolvimento sustentável das populações e das culturas, urge criar recursos que minimizem o impacto negativo das transformações decorrentes da produção agrícola mais intensiva e outras atividades ligadas ao bem-estar e crescimento das populações. Por outro lado, a existência de consumidores cada vez mais informados e mais atentos a questões ambientais, de sustentabilidade e manutenção da biodiversidade tendem a levar a mudanças no consumo e nos hábitos alimentares.

O feijão-frade (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é referido pela FAO (COWPEA: Post-Harvest Operations, 2004)(Gómez 2004) como “a cultura Africana mais versátil: alimenta as pessoas, o gado e a cultura seguinte”, estando inserida no grupo das leguminosas, que de acordo com a roda dos alimentos deveria representar 4 % da alimentação diária. As leguminosas são alimentos ricos nutricionalmente e que proporcionam elevados benefícios para a saúde dos consumidores, sendo uma excelente fonte de proteínas (20-25 % do seu peso total), hidratos de carbono (sobretudo complexos) e fibras. Sem colesterol na sua composição, são também atrativas pelo seu perfil vitamínico e mineral assim como pela presença de substâncias bioativas, como compostos fenólicos e outros antioxidantes.

O feijão-frade apresenta uma grande tolerância ao stresse hídrico, o que lhe confere vantagem na sua adaptação às alterações climáticas conjeturadas. A aptidão para estabelecer relações simbióticas com bactérias do género *Rhizobium* permite a fixação de nitrogénio atmosférico, nitrogénio esse transferido posteriormente para o solo. Esta relação favorece a qualidade do solo e leva à diminuição da necessidade do uso de fertilizantes. Esta característica permite-lhe também aumentar a produtividade de outras culturas, como os cereais, quando em consociação ou em rotação de culturas. Todos estes atributos levam a que seja uma cultura relevante para estudo, uma vez que por um lado são necessárias variedades cada vez mais adaptadas aos novos desafios climáticos, mas que por outro apresentem fatores benéficos do ponto de vista nutricional, económico e ambiental.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os impactos e respostas de cinco variedades portuguesas de feijão-frade à seca terminal (imposta durante a fase reprodutiva), sendo quatro variedades locais de *Vigna unguiculata* de diferentes zonas do país,

previamente selecionadas pela sua riqueza em compostos bioativos, e uma variedade comercial obtida através do Programa de Melhoramento de Leguminosas do INIAV (Elvas) como referência. Para tal, serão focados os seguintes aspetos:

- a. Respostas das plantas ao défice hídrico, ao nível do desenvolvimento, características morfológicas e indicadores fisiológicos e bioquímicos;
- b. Impacto da seca nos parâmetros agronómicos – indicadores da produção, e
- c. Impacto da seca na qualidade do grão (cor, açúcares solúveis e proteína bruta).

Este trabalho está inserido nos objetivos da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos – Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV-I.P.). Realiza-se no âmbito de um projeto conjunto liderado pelo INIAV, intitulado CoHeSus<sup>1</sup> – Cowpea (*Vigna unguiculata*) Genetic Diversity for a Sustainable Healthy Diet.

Com este estudo pretende-se identificar variedades locais com maior resistência ao stresse hídrico e com características nutricionais relevantes, e contribuir para o conhecimento e preservação dos recursos genéticos existentes, assim como para a difusão e/ou para o desenvolvimento de novas variedades mais resilientes às alterações climáticas.

### 1.3 Estrutura da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em seis capítulos, estruturados e descritos de seguida:

No **Capítulo 1**, é destacada a relevância do tema em estudo, assim como o enquadramento e objetivos deste trabalho.

No **Capítulo 2**, encontra-se uma revisão bibliográfica tendo em conta o enquadramento do presente trabalho, abordando de forma geral os temas da segurança alimentar face ao crescimento da população e das alterações climáticas (seca), assim como a necessidade de privilegiar culturas mais sustentáveis, mantendo a biodiversidade e evitando a perda de recursos genéticos. Neste contexto, é destacada a importância das leguminosas, em particular do feijão-frade, descrevendo-se algumas das características da espécie *Vigna unguiculata* e das suas interações com alguns fatores abióticos, nomeadamente no que respeita a estratégias de resposta das plantas face ao stresse hídrico (seca).

---

<sup>1</sup> CoHeSus – Cowpea (*Vigna unguiculata*) Genetic Diversity for a Sustainable Healthy Diet, projeto ALT20-03-0145-FEDER-029867, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e FEDER.

No **Capítulo 3**, descreve-se a metodologia geral utilizada, apresentando-se os materiais e métodos para a execução do trabalho experimental, determinações e análises efetuadas.

No **Capítulo 4**, apresentam-se os resultados obtidos nas diferentes determinações e análises efetuadas e discutem-se as respostas e impactos da seca nas plantas, nomeadamente, efeitos no desenvolvimento e adaptação morfológica, respostas fisiológicas e bioquímicas da planta, assim como impactos ao nível agronómico e de qualidade do grão obtido neste estudo.

Por fim, no **Capítulo 5**, destacam-se as principais conclusões desta dissertação.

## Capítulo 2 – Revisão bibliográfica

### 2.1 Abordagem geral

Numa sociedade e ecossistema em constante mudança e crescimento, em grande parte de forma negativa, urge criar, estudar, desenvolver e implementar estratégias que nos ajudem a melhorar ou pelo menos conservar o mundo no qual vivemos e ao qual devemos respeito e retribuição pela nossa existência.

Os grandes desafios para a humanidade e com consequências para todos foram identificados pela “Food and Agriculture Organization” (FAO) e encontram-se expressos na Agenda 2030 - Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU 2030 (European Commission 2015), aprovada em 2015 pelos líderes mundiais. Os objetivos da “Agenda 2030” têm como intuito primário garantir segurança alimentar e nutricional para todos, de forma sustentável, tanto económica como ambiental e socialmente, não comprometendo as gerações futuras (FAO 2018a).

Várias contrariedades estão expostas e colocam em causa a concretização dos ODS 2030 da FAO. O alcance da segurança alimentar, saúde e nutrição para todos está ameaçado pela perda de biodiversidade, de recursos naturais, como a saturação e poluição dos solos, ou a perda de recursos hídricos, recurso este finito e ameaçado pela utilização intensiva, salinização e poluição, assim como pela emissão de gases com efeito de estufa (GEE) ou pela aplicação massiva de fertilizantes.

Por tudo isto, é prioritário adotar e privilegiar sistemas agroalimentares que contemplem a necessidade de alimentar o aumento crescente da população, mas recorrendo a culturas sustentáveis, nutritivas e adaptadas às mudanças climáticas já observadas e previstas para o curto, médio e longo prazo.

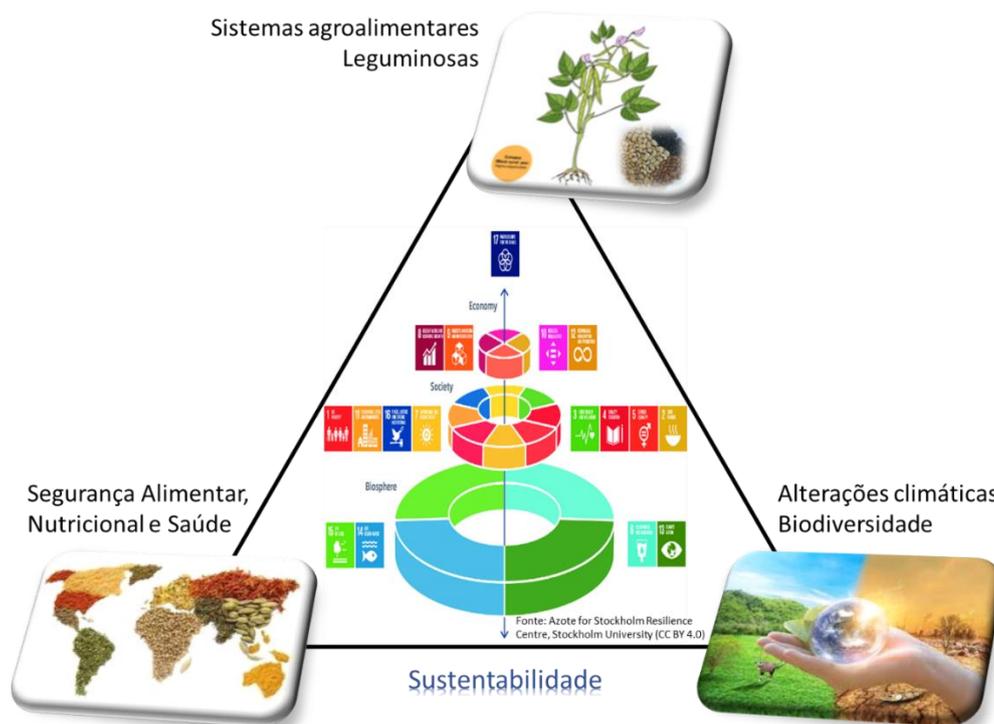
A 18 junho de 2021, tendo em conta os impactos da pandemia COVID-19 que vieram acentuar os desequilíbrios e a insegurança alimentar, foi aprovado pela FAO o Quadro Estratégico 2022-2031 (Strategic framework 2022-31) que apoia a Agenda 2030 na busca de “sistemas alimentares mais eficientes, inclusivos, resilientes e sustentáveis para **uma melhor produção, melhor nutrição, um ambiente melhor e uma vida melhor**, não deixando ninguém para trás” (FAO 2021a). Contudo, para alcançar este enorme desafio, produtores, consumidores e comunidades científicas devem estar alinhados e empenhados na transição para padrões de consumo mais sustentáveis (Berners-Lee et al. 2018).

A luta pela sustentabilidade e segurança alimentar tem-se relacionado muitas vezes com a necessidade de adotar dietas à base de plantas (Willett et al. 2019) como alternativa a dietas ricas em alimentos de origem animal. Tudo isto realça a importância das leguminosas como uma das mais relevantes opções para atingir esses objetivos, uma vez que reúnem de

forma clara características dos 3 pilares do desenvolvimento sustentável, pelos benefícios sociais, económicos e ambientais que podem fornecer (Stagnari et al. 2017).

Neste sentido, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. é uma das leguminosas destacadas e referida nos últimos anos por diversos autores como estratégica (Singh 2014; Carvalho, Lino-Neto, et al. 2017; Carneiro da Silva et al. 2019; Vasconcelos et al. 2020; Ferreira et al. 2021), não só pela sua capacidade de alimentar com elevada riqueza nutricional o homem, os animais e outras culturas (por consociação ou rotação, “alimentando os solos” para a cultura seguinte), como também pela sua capacidade produtiva em solos pobres e com baixa disponibilidade de água, o que a torna numa cultura a estudar e melhorar, tendo por base o contexto de alterações climáticas que atravessamos (FAO 2016a; FAO 2016b).

Numa visão global, as leguminosas contribuem de forma significativa em 5 aspetos estratégicos e relevantes para a humanidade e futuro do planeta: Segurança Alimentar, Nutrição, Saúde, Alterações Climáticas e Biodiversidade (Figura 1) (FAO 2016a).



**Figura 1 - Potencial modelo de sustentabilidade dos sistemas agroalimentares de leguminosas, tendo por base a segurança alimentar e as alterações climáticas (Fonte: Azote for Stockholm Resilience Centre, Stockholm University (CC BY 4.0) (2016))**

Como representado na figura 1, cada vez mais os sistemas agroalimentares devem caminhar para a adoção de culturas resilientes e sustentáveis. Culturas que apresentem por um lado a capacidade de contribuir para a segurança alimentar global, de forma nutritiva, segura e suficiente, mas que, por outro, possuam a resiliência, capacidade de adaptação e mitigação das alterações climáticas, com uma baixa pegada ecológica e garantindo a biodiversidade, melhoria dos solos e dos recursos naturais. Para tal, os sistemas agroalimentares devem atingir estes dois grandes objetivos pela adoção e implementação dos

17 ODS. Os ODS estão representados no centro da figura 1 pela forma proposta em 2016 no “Stockholm EAT Food Forum” – “Bolo de casamento dos ODS” – onde J. Rockström e P. Sukhdev (ex-diretor do Stockholm Resilience Centre e o membro do concelho, respetivamente) sugeriram esta nova visão, com o argumento que todos os ODS estão direta ou indiretamente ligados aos sistemas agroalimentares e conseqüentemente a alimentos sustentáveis e saudáveis, dependentes e assentes numa base fundamental, mas que se tem revelado frágil – a biosfera (Figura 1) (Obrecht et al. 2021).

## **2.2 Segurança alimentar e sustentabilidade – Leguminosas**

### **2.2.1 Segurança alimentar**

A segurança alimentar é considerada como a base para o desenvolvimento e saúde humana. Contudo, apesar de ser um direito universal nem sempre é acessível a todos (Ferreira et al. 2021). O relatório “SOFI 2021” (FAO 2021b) refere que entre 720 e 811 milhões de pessoas no mundo enfrentaram a fome em 2020, mais 118 milhões que em 2019, sendo que uma em cada três pessoas no mundo, incluindo crianças, não tiveram acesso adequado a alimentação em 2020.

Na histórica reunião de 1996, na Cimeira Mundial da Alimentação, a FAO descreveu a segurança alimentar como o acesso de todas as pessoas, em todas as alturas, a alimentos suficientes, seguros, nutritivos e economicamente acessíveis, e que atendam às necessidades e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável (FAO 1996). A FAO tem assim como objetivos promover ações que contribuam para acabar com a fome não descuidando a proteção do meio ambiente, do planeta e seus habitantes, referindo as leguminosas como cruciais para dietas saudáveis, produções sustentáveis e sobretudo para a segurança alimentar (FAO 2016a; FAO 2016c).

Contudo, a procura crescente por alimentos em resultado do aumento da população e tendo em conta a necessidade de manter a biodiversidade e outros recursos naturais, representam um grande desafio para a agricultura, em conjunto com as fragilidades resultantes das alterações climáticas.

O conhecimento e investigação sobre as leguminosas mostra-se assim um importante contributo para proporcionar segurança alimentar e nutricional à população global em expansão, que se espera ultrapassar os 9 mil milhões até 2050, face aos cerca de 7 mil milhões atuais (United Nations 2019). Neste sentido as culturas de leguminosas, como o feijão-frade, podem contribuir para ajudar no alcance da segurança alimentar, uma vez que, como refere Carneiro da Silva et al. (2019), culturas estratégicas para a segurança alimentar, para além de nutritivas e seguras, devem ter boa produtividade, estabilidade de produção,

tolerância a stresses ambientais (como a seca), viabilidade económica, assim como baixo impacto ambiental e que contribuam para a manutenção dos recursos naturais e sustentabilidade dos sistemas agroalimentares. Outra das grandes vantagens deste tipo de leguminosas secas é o facto de poderem ser armazenadas por longos períodos sem necessidades de refrigeração, sem perder o seu valor nutricional, permitindo assim flexibilidade no seu consumo e transporte, e aumento da disponibilidade de alimento entre colheitas. Porém, privilegiar determinadas culturas pelos agricultores também está dependente das políticas de produção agrícola de cada país, tendo em conta tecnologias de produção e financiamentos.

A segurança alimentar está assim dependente e ameaçada por inúmeros fatores, como as alterações climáticas, embora com impactos imprevisíveis a longo prazo, assim como a degradação dos recursos naturais, poluição, dificuldades de armazenamento e transporte ou a mão-de-obra. Porém, os sistemas agroalimentares também são fragilizados por ameaças súbitas e inesperadas, como a pandemia da Covid-19 ou a Guerra da Ucrânia, que vêm salientar ainda mais as fragilidades existentes e dificultar o acesso a alimentos. Estas ameaças afetam a disponibilidade, segurança e qualidade dos alimentos, assim como o seu valor produtivo e comercial, limitando recursos e troca de produtos.

Assim, a transição para sistemas agroalimentares mais sustentáveis, que forneçam alimentos nutritivos de forma equitativa, ética e de qualidade é urgente, contudo apresenta-se uma tarefa já à partida comprometida por todas as contrariedades existentes e já referidas (van Ginkel and Biradar 2021).

### ***2.2.1.1 Aspetos da produção e consumo de leguminosas***

A disponibilidade alimentar de cada país é função do equilíbrio entre os alimentos produzidos, importações e exportações, redução do desperdício e destino dos bens alimentares (Perez-Escamilla 2017).

Em Portugal a área agrícola destinada à cultura de leguminosas secas encontra-se nos 7958 ha, com uma produção de 6480 toneladas em 2021 (INE - PORDATA 2022). No período de 2020/2021 o consumo Nacional de leguminosas secas per capita foi de 4,3 kg/hab, com o feijão a apresentar-se como a espécie mais consumida (2,6 kg/hab) seguido do grão-de-bico (1,7 kg/hab), valores ligeiramente abaixo dos registados entre 2016-2020 (INE 2022a), resultando num consumo total de 45 mil toneladas de leguminosas secas, correspondendo 18 mil toneladas a grão-de-bico e 27 mil toneladas a feijão.

Por outro lado, em Portugal o grau de autoaprovisionamento está muito aquém do desejado, suprimindo apenas 18,6 % dos consumos registados (2020/2021), neste caso, valores ligeiramente superiores aos registados entre 2016-2020 (INE 2022b), dependendo por

isso da importação de milhares de toneladas por ano, quando poderia ser autossuficiente.

Com 12,7 g/hab/dia de leguminosas secas disponíveis entre 2016-2020, o consumo aparente registou um aumento de cerca de 21 % (INE 2021) face à avaliação anterior (2012-2015), representando 0,7 % na Balança Alimentar Portuguesa (BAP) em 2020, valor ainda afastado dos 4 % recomendados pela Roda dos Alimentos (Figura 2).



**Figura 2 - Dados da Balança Alimentar Portuguesa nos anos de 2016 e 2020 em comparação com o recomendado (Adaptado Balança Alimentar portuguesa 2021, (INE 2021))**

Por outro lado, o consumo de carne, pescado e ovos aumentou face ao período anterior, representando em 2020 um consumo três vezes superior ao recomendado.

Segundo os dados reportados na BAP 2020, o aumento de 22,6 % verificado em 2020 relativo às disponibilidades para consumo de “Leguminosas secas” face a 2016 não se revelou suficiente na correção dos desequilíbrios das disponibilidades face ao recomendado na Roda dos Alimentos. Apesar do menor contributo dado pelas Leguminosas para a disponibilidade proteica diárias (g/hab/dia), situado nos 2,1 %, registou-se entre 2016-2020 uma evolução positiva de 21,7 % face ao período anterior, contribuindo apenas com 1,1 % para o aporte calórico diário per capita em 2020 (INE 2021). Estes números ajudam a confirmar a urgência de reverter e incentivar o cultivo e o consumo de leguminosas.

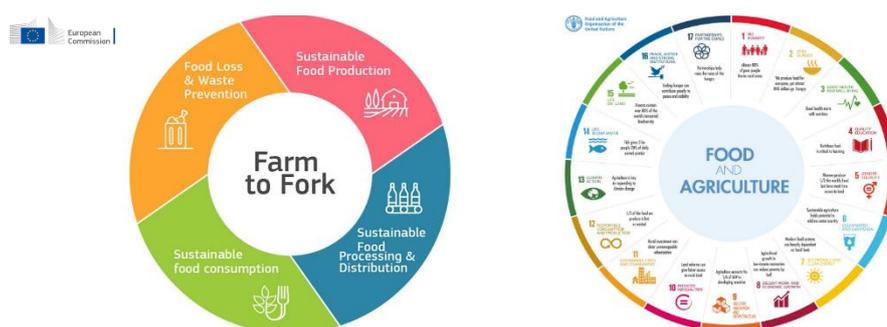
## 2.2.2 Sustentabilidade agroalimentar

A pressão sobre recursos naturais fundamentais como o solo e a água é cada vez maior, não só pelo crescente aumento da população, como também pelo aumento do consumo face à riqueza crescente e alteração de hábitos alimentares, comprometendo assim a capacidade de suportar a procura solicitada. Neste sentido, a agricultura e a produção de alimentos devem caminhar para a sustentabilidade, inseridas num mundo que enfrenta uma população mundial crescente e com maior poder de compra, mudanças climáticas e degradação ambiental.

Em Portugal, o cultivo de leguminosas pode ser, ou deverá, ser prioritário, como forma de alcançar as metas estratégicas do programa “Do Prado ao Prato” (Estratégia – “Farm to Fork - Pacto Ecológico Europeu”) (Commission 2020), rumo a um sistema alimentar da UE mais saudável e sustentável, uma pedra angular do Pacto Ecológico Europeu. Revelando-se como possível contributo para a concretização desta estratégia, que visa acelerar a transição para sistemas alimentares sustentáveis, nomeadamente pela potencial contribuição na redução proposta de 20 % no uso de fertilizantes e em 50 % na perda de nutrientes.

O acordo verde da Comissão Europeia (“The European Green Deal”) (European Commission 2019) no contexto da estratégia “Do Prado ao Prato” realça que a UE necessita desenvolver métodos inovadores para reduzir a dependência de pesticidas e fertilizantes e de reverter a perda de biodiversidade, mesmo quando atende à necessidade de produzir alimentos suficientes, nutritivos, sustentáveis e acessíveis.

Assim, esta estratégia, vem confirmar e salientar a importância central da alimentação e da agricultura na prossecução dos 17 objetivos do desenvolvimento sustentável das Nações Unidas (Figura 3).



**Figura 3 - Estratégia Europeia “Farm to Fork” (Do Prado ao Prato) e estratégia mundial “ODS 2030” da FAO (Fonte: Comissão Europeia e FAO)**

Tendo em conta as estratégias referidas, a redução dos impactos negativos dos sistemas agroalimentares, na qualidade dos solos, qualidade da água, biodiversidade e emissão de gases de efeito de estufa (GEE), podem ser atingidos com o incentivo à utilização de culturas que aliem a produção de alimentos nutritivos e de elevada qualidade, com a saúde ambiental, e que integrem as flutuações climáticas, económicas e energéticas observadas.

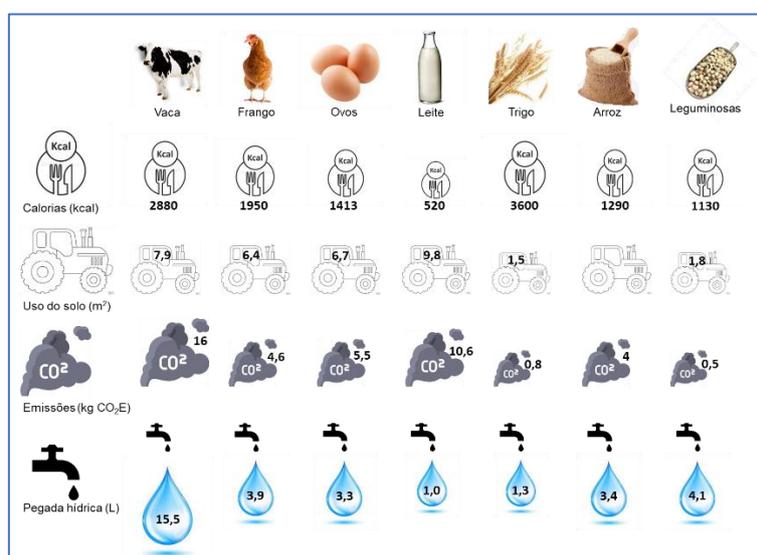
A intensificação das práticas agrícolas está a resultar na degradação insustentável dos solos e recursos hídricos, diminuindo a capacidade de fornecer recursos e de responder a outros stresses ambientais, causando danos ambientais evidentes.

As leguminosas grão, como o feijão-frade, apresentam vantagens ao nível agronómico, ambiental e socioeconómico, sendo consideradas culturas sustentáveis e potencialmente estratégicas para a segurança alimentar e nutricional do homem, animais e para o equilíbrio dos ecossistemas.

Diversos efeitos benéficos são associados ao aumento do consumo de leguminosas, revelando-se como potencial contributo para a sustentabilidade de todo o sistema agroalimentar. Estas culturas requerem menos fertilizantes em relação a outras culturas, podendo ser utilizadas nos sistemas de rotação de culturas e contribuir para a manutenção da fertilidade dos solos (Abberton 2010; Stagnari et al. 2017). O impacto positivo nos solos também é resultado da capacidade de fixar N atmosférico no solo, pela relação simbiótica com bactérias *Rhizobium* (Liu et al. 2011; Sá et al. 2017). Constituem uma importante cultura para a produtividade agrícola, com o seu cultivo a produzir anualmente cerca de 20 a 22 milhões de toneladas de nitrogénio (Xing et al. 2017). A obtenção de alimentos está intrinsecamente ligada ao solo, estimando-se que 98,8 % das calorias diárias consumidas resultem dele e apenas 1,2 % de fontes aquáticas (FAO 2018b; Kopittke et al. 2019).

Para além dos benefícios para o solo e favorecimento de outras culturas, a cultura de leguminosas apresenta um papel protetor contra insetos e doenças causadas por fungos e bactérias, com melhor estabilidade do solo (Wang et al. 2013).

As leguminosas apresentam-se também como excelente fonte proteica com baixo impacto ambiental, tanto no que respeita às emissões de carbono, como no gasto de água (Figura 4). Para a produção de 1 kg de leguminosas são necessários 4,1 litros de água, contrastando com os 15,5 litros gastos na produção de 1 kg de carne de vaca. Quanto às emissões de CO<sub>2</sub>, 1 kg de leguminosas emite cerca de 19 vezes menos equivalentes de CO<sub>2</sub> que a produção da mesma quantidade de carne (ICRISAT 2016).



**Figura 4 - Pegada ecológica de alguns alimentos (Fonte: (Bailey et al. 2011; ICRISAT 2016; PortFIR - INSA 2022))**

As nações unidas referem que a agricultura consome 70 % da água global na produção de alimentos e 30 % do consumo global de energia (Fao 2014; IRENA and FAO 2021).

Contudo, disponibilidade, qualidade, acesso e estabilidade, os quatro componentes da segurança alimentar, assim como alguns aspetos da sustentabilidade alimentar, são afetados

por stresses não climáticos (crescimento população, aumento poder de compra, procura de bens alimentares), como também, em larga escala por diversos fenómenos climáticos, nomeadamente a seca (IPCC 2019). A seca pode traduzir-se na redução da produção agrícola e animal com potenciais repercussões na qualidade dos produtos obtidos (Farooq et al. 2018; van Ginkel and Biradar 2021).

## **2.3 Alterações climáticas e biodiversidade**

### **2.3.1 Biodiversidade**

A biodiversidade é um fator interligado de formas opostas com os fenómenos climáticos. Por um lado, perdas de biodiversidade são decorrentes destes fenómenos, mas por outro, o aumento da biodiversidade e diversificação de culturas pode proteger os ecossistemas dos impactos negativos de stresses bióticos e abióticos, como a seca. A biodiversidade está assim associada a uma maior resiliência a stresses ambientais (Wagg et al. 2017).

A diversidade de espécies agrícolas cultivadas revela-se fundamental, tanto para o alcance da segurança alimentar, como para uma nutrição saudável e variada. O uso de diversas espécies e variedades potencia a resiliência às alterações climáticas, a resistência a pragas e doenças, com efeito direto sobre o rendimento produtivo e económico. Na tentativa de corresponder à necessidade de aumento da produção, sacrifica-se a diversidade biológica, mesmo antes de a conhecer. É por isso fundamental descobrir a diversidade biológica existente, as variações genéticas entre variedades da mesma espécie, conhecendo o modo de produção, reprodução e sua genética, bem como a preservação do germoplasma que represente a variabilidade existente (Spehar and Costa 2012).

O conhecimento e preservação de variedades desenvolvidas e utilizadas localmente é fundamental, uma vez que representam uma grande riqueza para a resiliência dos sistemas agroalimentares face às alterações climáticas e ao objetivo da sustentabilidade e segurança alimentar para todos. A capacidade da produção agrícola lidar com alterações ambientais ou socioeconómicas pode, assim, ser sustentada pelos recursos genéticos vegetais existentes, apresentando-se fulcrais na intensificação sustentável das produções.

Em relação às leguminosas, a sua introdução e continuidade na agricultura atual promove a conservação da heterogeneidade dos habitats, garantindo a continuidade de espécies consideradas críticas para a conservação da natureza, como artrópodes, populações de aves e pequenos mamíferos (Peoples et al. 2018). Estas culturas também fornecem recursos florais vitais para a comunidade de polinizadores, com a devolução dos

benefícios recebidos na produção de alimentos e criação de plantas (Marzinzig et al. 2018; Ferreira et al. 2021).

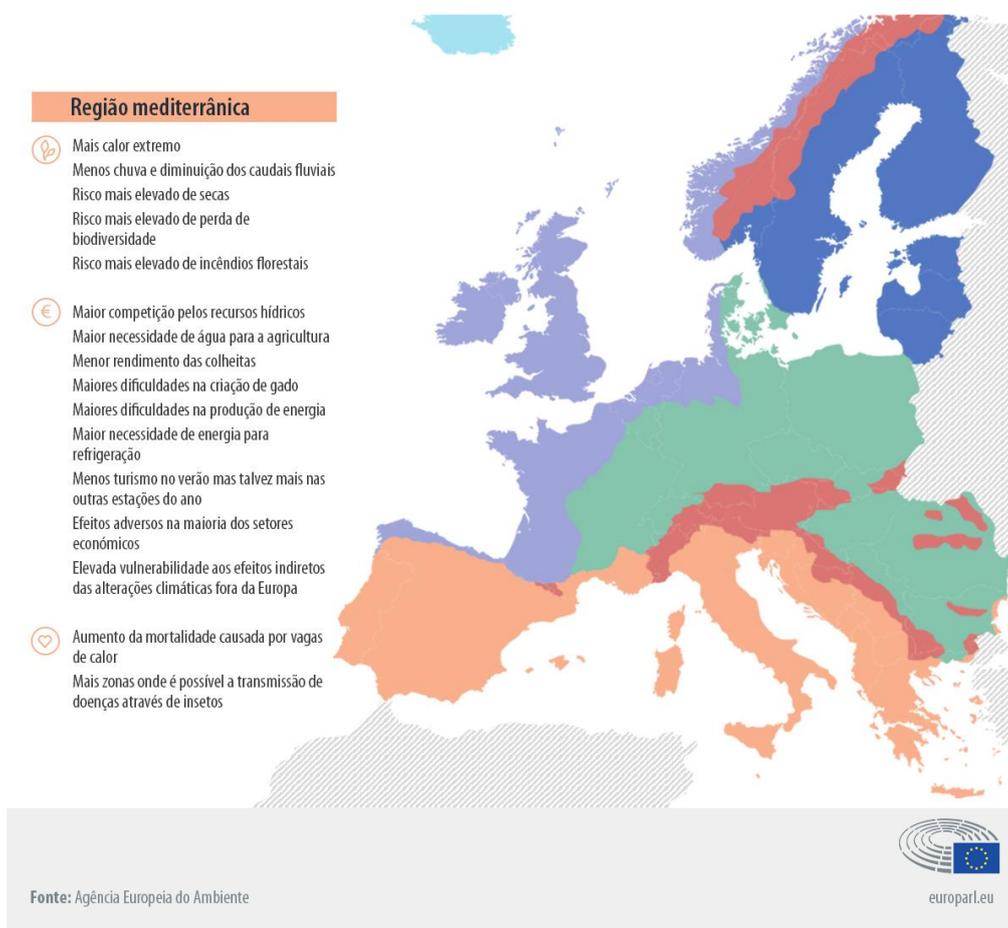
### **2.3.2 Alterações climáticas**

O mundo atravessa constantes mudanças climáticas que se revelam críticas para os ecossistemas naturais e agrícolas. Estas mudanças devem-se à emissão de GEE, às más e erráticas práticas do uso do solo, à saturação e poluição dos recursos naturais, entre outras, que fundamentalmente, refletem a desmedida atividade humana ao longo de décadas (Santos and Forbes 2001).

As alterações climáticas apresentam-se assim como um conjunto de mudanças que potenciam a prevalência de fenómenos climáticos mais intensos e frequentes. O IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) define as alterações climáticas como “modificações no estado do clima que podem ser identificadas por variações na média e/ou variabilidade das suas propriedades e que persistem por um período extenso” (IPCC 2014), resultantes de fatores naturais ou antropogénicos. Estas alterações são uma ameaça capital à segurança alimentar, ao desenvolvimento sustentável e à biodiversidade, com impacto na produtividade agrícola, estabilidade e rendimento em muitas partes do mundo, exacerbando a insegurança alimentar já existente em alguns locais. Novos desafios são impostos para a gestão dos recursos genéticos existentes para a alimentação e agricultura face às alterações climáticas, mas também realça a sua importância, uma vez que sustentam a capacidade dos sistemas agroalimentares resistirem e se adaptarem a condições adversas.

O IPCC refere o sul da Europa e a Península Ibérica como as regiões da Europa mais afetada pelas alterações climáticas e destaca o Mediterrâneo como uma das regiões mais vulneráveis do mundo às alterações climáticas, com tendência para a diminuição da precipitação anual e maior exposição a eventos meteorológicos extremos, como ondas de calor, conjugadas com secas e redução da humidade, assim como a subida do nível do mar (Figura 5) (AEA 2016; IPCC 2022).

A Agência Europeia do Ambiente (AEA) enfatiza estas previsões, apresentando os principais impactos das alterações climáticas na região mediterrânica no relatório “Alterações climáticas, impactos e vulnerabilidade na Europa em 2016” apresentados na figura 5, numa adaptação do Parlamento Europeu (AEA 2016; Parlamento Europeu 2018).



**Figura 5 - Impacto das alterações climáticas na região do mediterrâneo (Fonte: Adaptado pelo Parlamento Europeu com os dados do relatório “Alterações climáticas, impactos e vulnerabilidade na Europa em 2016” da Agência Europeia do Ambiente)**

Diferentes cenários preveem um aumento da temperatura média em todas as regiões de Portugal, com aumentos da temperatura máxima no verão entre 0,5 °C na zona costeira e 2 °C no interior até 2040, valores que podem chegar aos 3 °C e 7 °C em 2100, respetivamente. Em relação à precipitação, a incerteza do clima é maior, mas no geral prevê-se a redução da precipitação durante a primavera, verão e outono, redução essa entre 20 % a 40 % da precipitação anual atual, principalmente devido à redução da duração da estação chuvosa. Mundialmente o nível médio das águas do mar tem subido mais rapidamente nos últimos anos que nas décadas anteriores (PNPOT 2018). Tudo isto pode traduzir-se em períodos de seca mais frequentes e intensos, em alterações na distribuição geográfica e condições de desenvolvimentos de espécies vegetais e animais, assim como na disponibilidade e na qualidade da água e qualidade do solo. O relatório “Estratégia e Modelo Territorial” (PNPOT 2018), refere que em 2030, a gestão da escassez de água e de alimentos (agrícolas e pesca) será um grande desafio.

Vários indicadores sugerem as atividades antrópicas, nomeadamente as ligadas à exploração e uso de recursos naturais, como tendo um papel determinante nas alterações

climáticas observadas atualmente, com vários relatórios a correlacionarem o aumento da concentração de GEE com atividades como a queima de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural), a exploração e criação intensiva de animais, entre outras.

Estima-se que a alimentação represente entre 21 % a 37 % de todas as emissões de GEE a nível mundial (IPCC 2019), sendo a agricultura e a silvicultura responsáveis pelo consumo de cerca de 70 % da água doce do planeta (IPCC 2019).

Neste sentido e como já referido anteriormente, as leguminosas são uma importante cultura para a sustentabilidade agroalimentar, e todas as características referidas para essa sustentabilidade são também potenciadoras e importantes na mitigação das alterações climáticas previstas, nomeadamente e em grande parte pela redução da dependência de fertilizantes sintéticos. Considerados um dos mais dispendiosos consumos na agricultura moderna, os fertilizantes sintéticos nitrogenados são responsáveis pelo consumo de 1,3 % de toda a energia produzida. Neste sentido, culturas como a do feijão-frade, que necessitam de pouco fertilizante, devem ser promovidas para limitar o seu uso e diminuir a energia gasta na agricultura (Magrini et al. 2016). Referem-se também uns importantes 57 % a 65 % de responsabilidade do uso de fertilizantes na pegada de carbono e na emissão de GEE (APN et al. 2016), com os 190 milhões de hectares de leguminosas no mundo a contribuírem para fixar 5 a 7 milhões de toneladas de N no solo (FAO 2016b).

## **2.4 A Seca**

As alterações climáticas têm um grande impacto na disponibilidade de recursos hídricos. A quantidade e qualidade destes recursos são extremamente afetados, aumentando assim os riscos associados à sua utilização e às atividades que deles dependem (APA 2013)

Vários modelos e estudos sobre as alterações climáticas, preveem que os episódios de seca aumentarão em ocorrência, intensidade, duração e propagação, com incidência também na área agrícola. Por tudo isto, ações oportunas e proactivas poderão ajudar na redução dos impactos na população, no meio ambiente e nos sistemas agroalimentares, de forma a não comprometer severamente a segurança alimentar e nutricional global (Ginkel and Biradar 2021).

A resiliência a stresses ambientais e fenómenos climáticos (como a seca), é uma das quatro metas para aperfeiçoar nos sistemas agroalimentares (GLOPAN 2020).

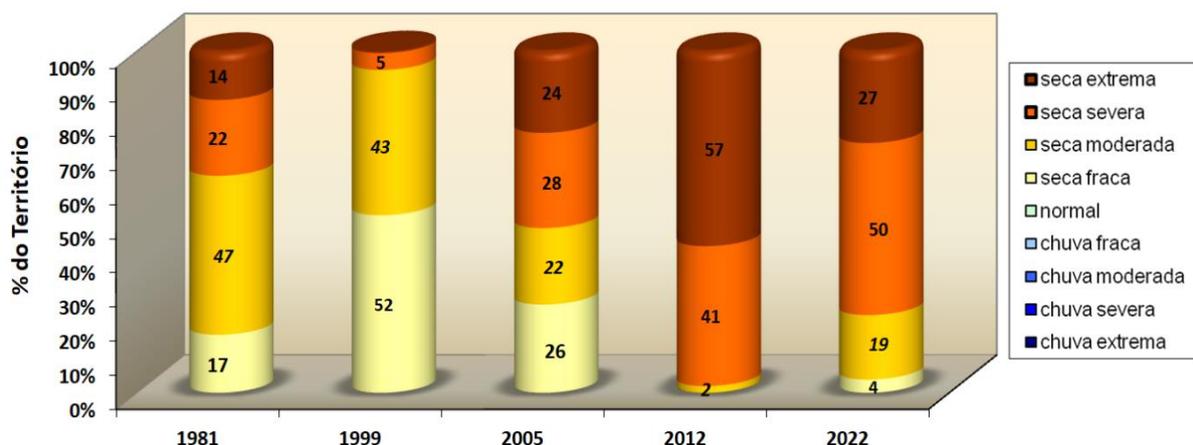
A seca avança pela fase de redução das chuvas, escassez de água, menor produção de alimento, conseqüente aumento dos preços das matérias-primas, diminuição da segurança alimentar, aumento da migração e fome. A seca que resulta em fome é, sem dúvida, o pior desastre ambiental (Ginkel and Biradar 2021). Além de reduzir a quantidade de água

disponível, a seca também afeta a qualidade da água, que por sua vez afeta negativamente os ecossistemas, recursos naturais e biodiversidade (Gerber and Mirzabaev 2017).

O Mediterrâneo foi uma das regiões mais propensas à seca do mundo entre 1981 e 2010, e as projeções apontam que de igual forma, ou de intensidade superior sejam também afetadas nas próximas décadas (Vogt et al. 2018; IPCC 2019).

Na Europa, em média 20 % do território e 30 % da população é afetada todos os anos pelo stress hídrico, com as secas a causarem prejuízos económicos avultados (2 a 9 mil milhões de Euros por ano) e danos não quantificáveis nos ecossistemas e seus serviços (EEA 2020; EEA 2021).

Em Portugal e de acordo com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), tem-se verificado nos últimos anos um aumento da frequência e intensidade das situações de seca. O IPMA tem implementado e calibrado para Portugal continental o índice PDSI (Palmer Drought Severity Index) desenvolvido por Palmer em 1965, com o objetivo de monitorizar situações de seca. Este índice baseia-se no conceito do balanço da água tendo em conta os dados da quantidade de precipitação, temperatura do ar e capacidade de água disponível no solo e permite detetar a ocorrência de períodos de seca classificando-os em termos de intensidade (fraca, moderada, severa e extrema). De acordo com este índice e em comparação com igual período em situações de seca anteriores (1981, 1999, 2005, 2012 com 2022), considerando o total da percentagem de território nas classes de seca mais graves (severa e extrema) em março, a situação atual (2022) é a segunda com maior percentagem (77 %) só ultrapassada pela seca de 2012 em que 98 % do território continental esteve em seca severa e extrema, como representado na figura 6 (IPMA 2022).



**Figura 6 - Percentagem do território de Portugal Continental por classe do índice PDSI em situações de seca anteriores em março (2022 até dia 15 março) (Fonte: Boletim Seca Meteorológica – 15 março 2022)**

De forma diversificada, a seca provoca impactos e respostas distintas no desenvolvimento, características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas, assim como na qualidade dos produtos obtidos. A redução contínua da disponibilidade de água, reflete-se de forma crítica na produtividade agrícola (Jaleel et al. 2009; Ansari et al. 2018). As perdas resultantes do déficit hídrico são muito superiores aos efeitos de outros fatores abióticos (Sánchez-Rodríguez et al. 2010), e neste sentido, a procura de variedade/culturas tolerantes à seca está a aumentar, tornando-se prioritária na conjuntura atual de alterações climáticas.

#### **2.4.1 As plantas e a seca**

As plantas apresentam um papel central para a manutenção da vida na Terra, mas encontram-se à mercê de todas as alterações ambientais e impactos antropogénicos. A grande variedade de plantas existente garante oxigénio, alimento, medicamentos, desenvolvimento tecnológico e equilíbrio ambiental e ecológico. Sendo já uma evidência o efeito das alterações climáticas nos sistemas agroalimentares, em particular nas culturas agrícolas, é de extrema importância compreender o que estas alterações irão provocar nas plantas que nos alimentam e nos proporcionam grande parte da segurança alimentar.

O estudo e compreensão das estratégias de adaptação e tolerância das plantas locais a stresses ambientais é assim essencial, não só para a perpetuação dos recursos genéticos existentes como também para a sua possível utilização em programas de melhoramento. Esta compreensão é fundamental na tentativa de reduzir os impactos de stresses como a seca na produção alimentar, assim como na obtenção de culturas resilientes e com capacidade de superar as alterações climáticas já observadas e previstas.

O papel da água na vida e crescimento das plantas é decisivo, estando envolvida em todos os processos metabólicos e representando 80 a 95 % da massa dos tecidos em crescimento (Taiz and Zeiger 2002). A água é reagente e/ou produto de muitas reações metabólicas, apresenta a capacidade de absorver calor, sendo por isso fundamental na tolerância a flutuações da temperatura ambiente. É solvente no transporte de nutrientes da raiz para a planta e fundamental na manutenção da turgescência. Em suma é responsável pelo vigoroso e saudável crescimento das plantas (Taiz and Zeiger 2002). A água é o recurso mais abundante e necessário à planta, porém, ao mesmo tempo revela-se o mais limitante para a produtividade agrícola.

Por tudo isto, e tendo em conta a procura mundial por alimentos, em oposição com a diminuição de recursos hídricos disponíveis para a agricultura, exalta-se a necessidade de conhecer, privilegiar e desenvolver plantas capazes de se adaptar, tolerar e manter níveis de

produtividade e qualidade aceitáveis em terras com baixa disponibilidade hídrica (Bruce et al. 2002; Blum 2011).

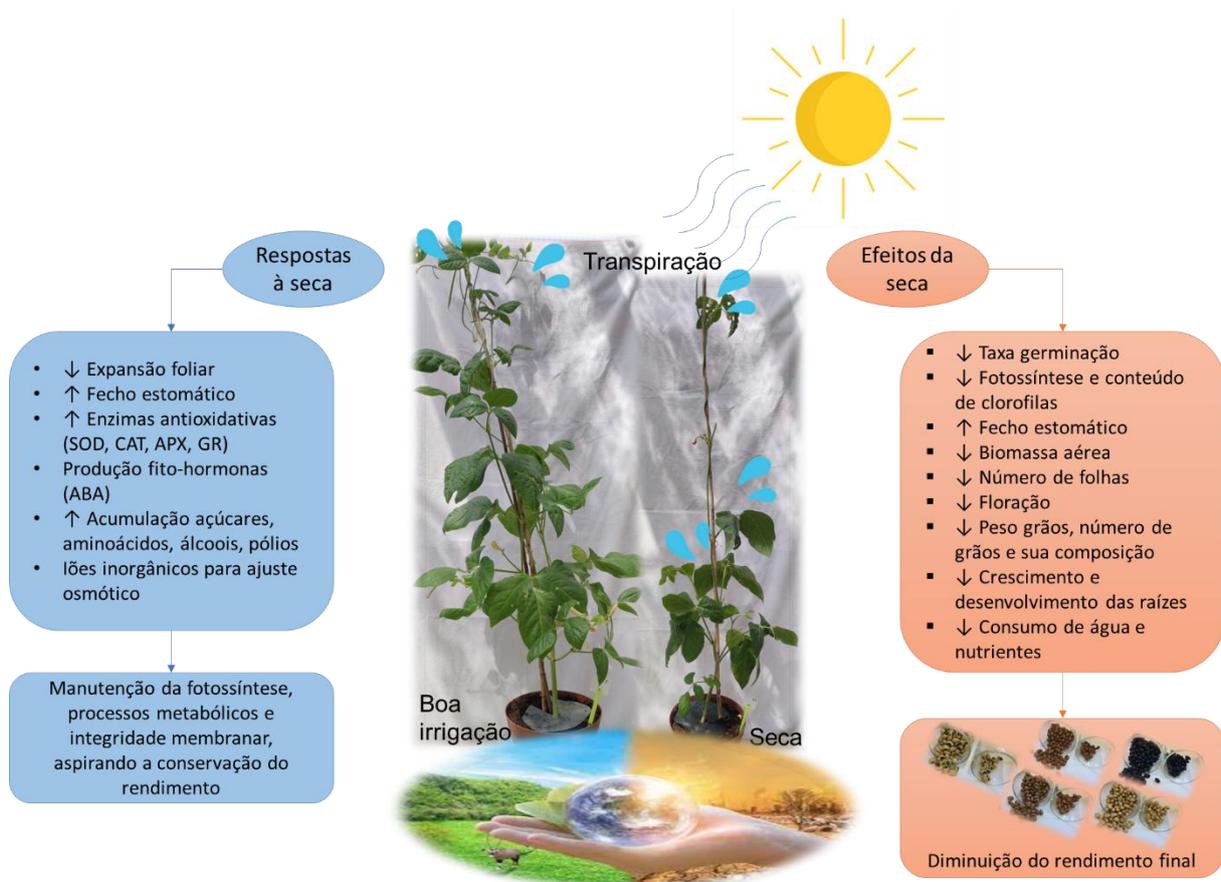
A exposição ao déficit hídrico desencadeia estratégias e mecanismos de resposta ao stresse, que se dividem em 3 grupos: mecanismos de fuga ao stresse, mecanismos para evitar a desidratação e mecanismos de tolerância à seca. Na grande maioria dos casos, estas respostas são combinadas, atuando de forma integrada e complementar (Chaves et al. 2003; Ansari et al. 2017) para assegurar o crescimento, a floração e a produção, e com isso apresentar rendimento económico mesmo com disponibilidade hídrica abaixo do ideal (Farooq et al. 2009).

Os mecanismos de fuga são formas de a planta escapar à falta de água, e possível desidratação, encurtando o seu ciclo de crescimento evitando a ocorrência do déficit hídrico (Chaves and Oliveira 2004). Envolve alteração no desenvolvimento fenológico (floração e maturidade precoce) e plasticidade do desenvolvimento (variação na duração do ciclo de crescimento dependendo da extensão do déficit hídrico), sendo o tempo de floração uma característica importante e relacionada com esta capacidade de fuga à seca (Araus et al. 2002).

As estratégias de evasão apresentam-se como mecanismos desenvolvidos pela planta com o intuito de evitar ou prevenir a desidratação, potenciando a entrada de água e/ou minimizando as perdas de água, recorrendo ao controlo estomático e condutividade hidráulica. Esta estratégia resulta de alterações morfológicas na planta, como por exemplo desenvolvendo um sistema radicular mais eficiente, redução da absorção da radiação ou redução da superfície foliar (Mittra 2001). Neste sentido, evitar a seca é a capacidade de manter elevado o conteúdo hídrico do tecido exposto à escassez de água (Reddy et al. 2004).

Por fim, a tolerância à seca resulta do desenvolvimento de mecanismos de aclimação, com possíveis mudanças nas características fisiológicas e bioquímicas. Concretamente, pode definir-se como a capacidade da planta suportar as suas funções normais de crescimento e desenvolvimento, preservando assim o seu metabolismo em condições de desidratação dos tecidos (baixo teor hídrico relativo e potenciais hídricos) (Reddy et al. 2004).

No entanto todos estes mecanismos de adaptação e/ou aclimação revelam desvantagens em relação ao potencial de produção, havendo consequências negativas em todas as estratégias de resistência à seca. Diferentes mecanismos de fuga, evasão ou prevenção e de tolerância à seca foram descritos em plantas de feijão-frade expostas à seca (Agbicodo et al. 2009).



**Figura 7 - Possíveis efeitos da seca nas plantas e suas respostas ao déficit hídrico (Adaptado de Nadeem et al. (2019) e fotografias do autor)**

As diferentes estratégias apresentadas pelas plantas como forma de resiliência à seca refletem alterações ou adaptações (representadas na figura 7) que podem ser observadas a vários níveis:

- I. Morfológico e Fenológico: Diminuição do número e da área foliar, alteração da estrutura da planta, teor de ceras na superfície foliar, alteração do sistema radicular, alterações do sistema fenológico, duração da floração, entre outras;
- II. Fisiológico: Fotossíntese, redução da transpiração, eficiência do uso da água, fecho estomático, ajuste osmótico e integridade membranar;
- III. Bioquímico: Acumulação de compostos orgânicos, alteração na atividade enzimática, armazenamento de hidratos de carbono, alteração na concentração de pigmentos fotossintéticos e de antioxidantes não enzimáticos;
- IV. Agronômico: Diminuição do rendimento, taxa de germinação, peso e número de grãos;
- V. Qualidade: Alterações na composição nutricional, características físicas e organolépticas (Ansari et al. 2019).

Todas estas características podem estar, de forma individual ou combinada, subjacentes à maior ou menor tolerância à seca, determinando a capacidade da planta sobreviver e produzir sob déficit hídrico. Sekhon et al. (2010), referem que é a interação entre as características fenológicas/morfológicas da planta com as estratégias para a eficiência do uso da água que permitem a sua adaptação ao déficit hídrico. Por sua vez, o rendimento é o desfecho complexo que resulta do genótipo, do ambiente e da interação entre ambos (Sail et al. 2007).

Diversos autores, assim como Iwuagwu et al. (2017) relataram que os efeitos da seca variam e dependem da intensidade, duração do stresse, estratégia de desenvolvimento e da capacidade adaptativa que a planta possui para tolerar esse stresse.

A sobrevivência das plantas ao stresse hídrico depende grandemente da sua capacidade em captar os estímulos, gerar e transmitir sinais e desencadear alterações fisiológicas e bioquímicas (Costa et al. 2012). Os processos fisiológicos são, então, desencadeados e adaptados com o intuito de manter a água no solo, economizando para necessidades futuras, de forma a garantir a sobrevivência e perpetuação da espécie. São identificadas por Taiz e Zeiger (2010) as respostas mais relevantes da planta ao déficit hídrico, nomeando a redução da área foliar, o fecho estomático, a antecipação da senescência e a abscisão foliar. Mesmo recorrendo a diversas estratégias de resposta à seca é inevitável o impacto negativo no rendimento das plantas, sendo o déficit hídrico também responsável por possíveis alterações na qualidade e composição do grão, nomeadamente em leguminosas (Behboudian et al. 2001; Farooq et al. 2018; Valentine et al. 2018). Alguns atributos de qualidade, como o teor de proteína, gordura ou hidratos de carbonos podem sofrer alterações (Mansourifar et al. 2011; Mohammadzadeh et al. 2011).

Particularmente nas leguminosas, a composição proteica está muito dependente da sua composição genética. Contudo fatores ambientais, particularmente a seca, podem influenciar os teores de proteína presentes no grão. Estudos relatam que dependendo das leguminosas, o teor de proteína pode diminuir (Mansourifar et al. 2011) ou aumentar com o agravamento do déficit hídrico (Bayat et al. 2010; Mohammadzadeh et al. 2011).

No geral o déficit hídrico traduz-se numa redução do crescimento da planta e folhas, alteração na absorção de nutrientes, em resultado da baixa disponibilidade hídrica do solo, aumento da resistência estomática e diminuição das trocas gasosas entre o ambiente e a planta, com conseqüente diminuição do rendimento (Boukar et al. 2019). Olajide et al. (2017) referem a seca como uma das restrições abióticas mais importantes na ameaça à segurança alimentar e nutricional global.

## 2.5 Caracterização da espécie em estudo

### 2.5.1 Leguminosas

As leguminosas são parte integrante da alimentação humana e animal, sendo hoje uma importante cultura no combate à desnutrição, à pobreza e melhoria da saúde, mas também na manutenção e melhoria dos ecossistemas, como cultura sustentável que se apresenta (Akibode and Maredia 2011).

Entre as vantagens das leguminosas, destacam-se a sua ampla distribuição geográfica, alto valor nutricional, baixa necessidade de água, capacidade de autofertilização (adicionando N necessário para as terras agrícolas e melhorando as culturas seguintes) e a sua longa vida útil, assim como comprovados benefícios para a saúde humana e ambiental (FAO 2016a; FAO 2016c; FAO 2016d; FAO 2016b).

### 2.5.2 Feijão-frade – *Vigna unguiculata* (L.) Walp

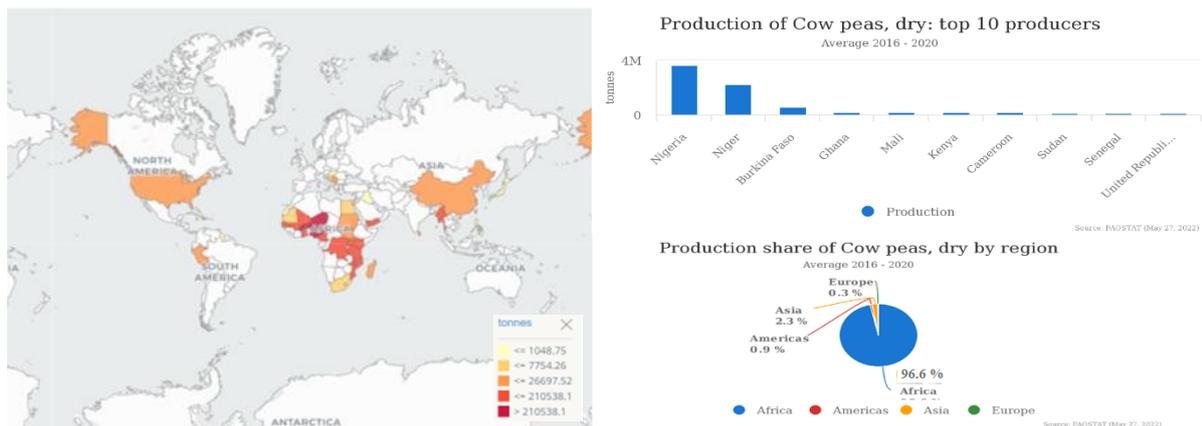
O feijão-frade (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), pertence ao género *Vigna* e à família Fabaceae (ou Leguminosae), a terceira maior do planeta, com cerca de 800 géneros e 18000 a 19000 espécies (Morel et al. 2012). É uma leguminosa herbácea anual, nativa de África e amplamente distribuída por todo o mundo. Pode crescer em solos pobres e ácidos, com baixa disponibilidade de água e altas temperaturas (Santos et al. 2008; Bejarano et al. 2014).

Perto de nove milhões de toneladas de grão são produzidas por ano, resultantes da cultura de 15 milhões hectares de terra pelo mundo, dados de 2020 (FAOSTAT 2022). Porém, apesar da sua ampla distribuição geográfica, mais de 98 % da área total cultivada no mundo situa-se em África, com a Europa a registar a menor área e produção (Tabela 1).

**Tabela 1 - Área agrícola (ha) e produção (ton) de feijão-frade no mundo (Fonte: FAOSTAT (2022)).**

| 2020    | Área agrícola de feijão-frade (ha) | Produção de feijão-frade (ton) |
|---------|------------------------------------|--------------------------------|
| África  | 14 818 944                         | 8 616 095                      |
| Ásia    | 168 775                            | 195 816                        |
| América | 61 826                             | 65 880                         |
| Europa  | 6 890                              | 23 853                         |
| Mundo   | 15 056 435                         | 8 901 644                      |

Entre 2016 e 2020 os principais produtores mundiais foram a Nigéria, o Níger e Burquina Faso (figura 8), com a Espanha a apresentar-se como o maior produtor europeu, sendo 96,6 % da produção obtida em África (FAOSTAT 2022).



**Figura 8 - Principais países e regiões produtoras de feijão-frade (Fonte: FAOSTAT (2022))**

Para além da alimentação humana, o feijão-frade é utilizado na alimentação animal, como forragem, servindo também como adubo verde (resíduos da colheita, raiz e caule fornecem matéria orgânica e nutrientes ao solo) e de cobertura do solo (Júnior 2002), suprimindo o crescimento de ervas daninhas, proporcionando proteção contra a erosão do solo e reduzindo a temperatura do solo.

O ciclo fenológico do feijão-frade varia entre 60 a 150 dias (Timko et al. 2007), dependendo das condições climáticas e período de maturação. A planta de feijão-frade está adaptada a temperaturas entre 20-35 °C (Lima et al. 2006), sendo as melhores sementes produzidas quando sujeita a variações de temperatura dentro do ideal (Ngalamu et al. 2014). A necessidade de água desta cultura é variável em função do seu estágio de crescimento (Lima et al. 2006). Apresenta uma menor necessidade de água na germinação, que aumenta e se torna mais crítica na fase da floração e formação de vagens, com decréscimo posterior a partir do início da maturação (Bastos et al. 2008). É considerada globalmente como tolerante à maioria dos stresses ambientais (Tankari et al. 2021) incluindo a seca, contudo a produção da cultura é prejudicada pela exposição a esse stress (Osakabe et al. 2014; Ravelombola et al. 2018; Gomes et al. 2019; Gomes et al. 2020).

Todas as partes da planta do feijão-frade podem ser usadas na alimentação, sendo consumidas em muitos países, tanto as folhas verdes, como as flores, vagens imaturas e os grãos secos, todos estes bastante nutritivos. Em Portugal o grão seco representa o consumo habitual em resultado da produção desta leguminosa. Apresenta-se como uma excelente fonte de micro e macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono, vitaminas e minerais) (Ngalamu et al. 2014; Carvalho et al. 2019; ElMasry et al. 2021; Silva et al. 2021), que pode suprir a necessidade de aminoácidos essenciais, quando combinado com cereais (Iqbal et al. 2006).

Nas condições ideais de cultivo, o feijão-frade fixa cerca de 160 kg ha<sup>-1</sup> N em 60 dias, o que é suficiente para suprimir as suas necessidades e ainda para contribuir em cerca de 40 kg ha<sup>-1</sup> N para o solo e culturas seguintes (Singh 2014), pela relação simbiótica com

bactérias do gênero *Rhizobium* presentes no solo (Martins et al. 2003). Neste sentido, quando cultivado em consociação com cereais (milho, sorgo e milheto), o rendimento dessas culturas é melhorado e quando cultivada em rotação com arroz, repõe a fertilidade do solo para a colheita seguinte (Ngalamu et al. 2014).

Apresenta hábitos de crescimento diversos, dependendo principalmente da variedade, podendo apresentar-se ereto, semi-ereto, prostrado ou trepador (Timko et al. 2007). As folhas são compostas por três folíolos e o pecíolo apresenta entre 15 a 25 cm de comprimento.

As flores apresentam coloração variada, desde branco puro, passando pelo branco-amarelado e rosado, até ao violeta puro. Os frutos apresentam-se como vagens alongadas, habitualmente com 8 a 30 cm e ocorrem geralmente aos pares, porém sob condições edafoclimáticas favoráveis, podem ocorrer três ou mais vagens por pedúnculo (Figura 9). A vagem madura apresenta cor castanho-claro, com 8 a 30 grãos no seu interior.

O feijão-frade é bastante diversificado no que toca à aparência dos grãos, incluindo a cor do tegumento e tamanho e cor do olho do grão (Figura 9) (Gerrano et al. 2017).



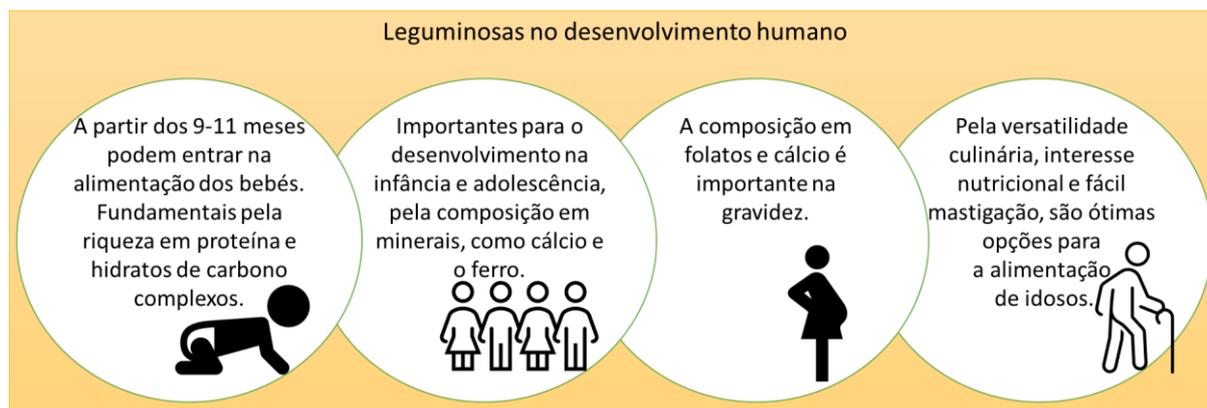
**Figura 9 - Variabilidade morfológica de diferentes variedades de feijão-frade - planta, flores, vagens e sementes (Fotografias do autor)**

O tegumento pode ser liso ou enrugado, ter coloração uniforme ou em padrão, com as cores mais comuns a serem o preto, castanho, rosa e branco. O hilo está coberto por um tecido branco e rodeado por uma faixa escura. O peso de mil grãos também é variado, com valores rondando os 100 g (Timko et al. 2007; OECD 2015; OECD 2019).

### 2.5.3 Qualidade nutricional e de saúde

As leguminosas, como o feijão-frade, fazem parte de um conjunto de alimentos representados na Roda dos Alimentos e na Pirâmide Alimentar e que representam um papel essencial na nutrição humana e animal (FAO 2016a).

A riqueza nutricional das leguminosas proporciona comprovados benefícios para a saúde de quem os consome (Rebello et al. 2014; Singh 2017; Singh et al. 2017), sendo indicado o seu consumo durante todas as fases da vida do ser humano (Figura 10).



**Figura 10 - Importância das leguminosas no ciclo de vida e desenvolvimento humano (Adaptado da Associação Portuguesa de Nutricionistas, 2016 (APN 2016))**

A FAO considera as leguminosas como “superalimento” que foram nutrindo as pessoas desde os registos pré-históricos, definindo como objetivo o de ter leguminosas enriquecendo a terra e sustentando as populações (FAO 2016a).

Como já referido, o feijão-frade é morfologicamente variável e adaptado a diversos ambientes, o que resulta numa vasta gama de variedades locais (OECD 2015), sendo que a composição nutricional do grão é resultado das características genéticas, local de produção, stresses bióticos e abióticos, clima e fatores ambientais, tipo de solo em que são cultivadas, conservação e pós-colheita (Murdock et al. 2003; Rebello et al. 2014; Fabbri and Crosby 2016; Gonçalves et al. 2016). Contudo, e mesmo dependente de todos estes fatores, o feijão-frade é altamente nutritivo e apresenta potenciais benefícios para a saúde, pelo seu elevado conteúdo em proteína, teor em fibra e baixo índice glicémico (Xu and Chang 2012; Aguilera et al. 2013; Xiong et al. 2013). Na tabela 2 está representada a composição nutricional geral do feijão-frade seco e após demolha (PortFIR - INSA 2022), uma vez que, como já referido as técnicas de processamento alteram os teores dos compostos presentes.

**Tabela 2 - Composição nutricional do feijão-frade seco e cozido (demolhado) (Fonte: PortFIR - INSA (2022))**

| <i>Valores por 100 g de grão</i>  | <b>Feijão-frade cozido<br/>(demolhado)</b> | <b>Feijão-frade seco</b> |
|-----------------------------------|--|--------------------------|
| <b>Energia [kcal]</b>             | <b>123</b>                                 | <b>342</b>               |
| Energia [kJ]                      | 521  | 1450                     |
| <b>Lípidos [g]</b>                | <b>0,7</b>                                 | <b>1,3</b>               |
| Ácidos gordos saturados [g]       | 0,2  | 0,6                      |
| Ácidos gordos monoinsaturados [g] | 0,1  | 0,1                      |
| Ácidos gordos polinsaturados [g]  | 0,3  | 0,9                      |
| Ácido linoleico [g]               | 0,3  | 0,9                      |
| Ácidos gordos trans [g]           | 0  | 0                        |
| <b>Hidratos de carbono [g]</b>    | <b>18,1</b>                                | <b>55,3</b>              |
| <b>Açúcares [g]</b>               | <b>1</b>                                   | <b>3,1</b>               |
| <b>Oligossacáridos [g]</b>        | <b>0,7</b>                                 | <b>3,9</b>               |
| <b>Amido [g]</b>                  | <b>16,4</b>                                | <b>48,3</b>              |
| <b>Fibra [g]</b>                  | <b>4,7</b>                                 | <b>9,4</b>               |
| <b>Proteínas [g]</b>              | <b>8,8</b>                                 | <b>22,6</b>              |
| Sal [g]                           | 0,6  | 0                        |
| Álcool [g]                        | 0  | 0                        |
| <b>Água [g]</b>                   | <b>66,2</b>                                | <b>8,2</b>               |
| Ácidos orgânicos [g]              | 0  | 0                        |
| Colesterol [mg]                   | 0  | 0                        |
| Vitamina A [µg]                   | 2  | 5                        |
| Caroteno [µg]                     | 13   | 30                       |
| Vitamina D [µg]                   | 0  | 0                        |
| alfa-tocoferol [mg]               | 0,2  | 0,3                      |
| <b>Tiamina [mg]</b>               | <b>0,19</b>                                | <b>0,54</b>              |
| <b>Riboflavina [mg]</b>           | <b>0,05</b>                                | <b>0,18</b>              |
| <b>Niacina [mg]</b>               | <b>0,5</b>                                 | <b>2,1</b>               |
| Equivalentes de niacina [mg]      | 2,4  | 6,9                      |
| Triptofano/60 [mg]                | 1,9  | 4,8                      |
| Vitamina B6 [mg]                  | 0,1  | 0,37                     |
| Vitamina B12 [µg]                 | 0  | 0                        |
| Vitamina C [mg]                   | 0  | 1                        |
| <b>Folatos [µg]</b>               | <b>210</b>                                 | <b>630</b>               |
| Cinza [g]                         | 1,4  | 3,2                      |
| Sódio [mg]                        | 250  | 18                       |
| <b>Potássio [mg]</b>              | <b>320</b>                                 | <b>1100</b>              |
| <b>Cálcio [mg]</b>                | <b>21</b>                                  | <b>81</b>                |
| <b>Fósforo [mg]</b>               | <b>140</b>                                 | <b>410</b>               |
| <b>Magnésio [mg]</b>              | <b>47</b>                                  | <b>130</b>               |
| Ferro [mg]                        | 1,9  | 5,2                      |
| Zinco [mg]                        | 1,1  | 3,5                      |

A maioria dos dados da composição nutricional dos grãos de feijão-frade é relativa aos grãos integrais, e estes incluem o tegumento que representa 6 % da matéria seca do grão (Aremu 1990).

O feijão-frade contém uma alta proporção de hidratos de carbono, representando a maior parte do peso seco do grão. Foi relatada a presença de oito hidratos de carbono simples, sacarose, glucose, frutose, galactose e maltose e três oligossacarídeos, considerados antinutrientes, a estaquiase, verbascose e a rafinose (Gonçalves et al. 2016). O teor de fibra alimentar (polissacáridos, oligossacáridos, lenhina e substâncias vegetais associadas) varia normalmente entre 16 % e 21 % (Gonçalves et al. 2016).

Como já referido, caracteriza-se por ser uma excelente fonte proteica, com o grão inteiro a conter entre 16 a 31 %, sendo 12 % respeitantes ao tegumento (Aremu 1990). Rico em aminoácidos como lisina, leucina, arginina e outros aminoácidos essenciais. Apesar de

pobre em aminoácidos de enxofre (metionina e cisteína), quando equilibrado com cereais atende aos requisitos essenciais para a dieta humana (Iqbal et al. 2006; Gonçalves et al. 2016). Estudos recentes mostram que o consumo simultâneo de proteínas vegetais de grãos de leguminosas e cereais reproduz o padrão de aminoácidos essenciais contidos em produtos de origem animal (Chardigny and Walrand 2016; Laleg et al. 2016; Laleg et al. 2017).

O teor de lípidos do grão varia entre 0,5 e 3,9 % (OECD 2019), e são fonte de minerais essenciais como cálcio, magnésio, potássio, ferro, zinco e fósforo, sendo que os níveis de fosforo, potássio e manganês variam amplamente com as condições agroclimáticas (Adebooye and Singh 2007). Como suporte vitamínico, destacam-se as do complexo B, sendo fonte de tiamina (B1) e niacina (B3) e também contém quantidades razoáveis riboflavina (B2).

Efeitos benéficos para a saúde estão assim associados a diversas características nutricionais dos grãos de leguminosas. Exemplos disso são o facto de apresentarem um teor lipídico reduzido e serem isentas de colesterol (Sridhar and Seena 2006). Os hidratos de carbono presentes são essencialmente de digestão lenta, diminuindo o índice glicémico (FAO 2016d). Um aumento da saciedade é obtido pelo consumo de leguminosas, devido à elevada quantidade de fibra (Rebello et al. 2014), podendo ajudar na redução do risco de doenças cardiovasculares e cancro (Sílvia 2011; Mudryj et al. 2014; Fabbri and Crosby 2016). A combinação do baixo índice glicémico e alto teor em fibra, ajudam na manutenção de níveis saudáveis de glicémia e insulina (Mudryj et al. 2014), assim como na manutenção da saúde intestinal, obstipação e no combate ao cancro do cólon (Gebrelibanos et al. 2013).

São ainda excelente fonte de ácido fólico, nutriente necessário e essencial para a saúde gestante, pré-natal e infantil, assim como ferramenta importante no combate à desnutrição infantil (Bevis 2015; Smith and Haddad 2015).

Quando consumidas em combinação com alimentos ricos em vitamina C, potenciam a absorção de ferro, tornando-se alimentos importantes na prevenção de anemia ferropriva (FAO 2016c).

A presença de compostos bioativos (compostos fenólicos, taninos, flavonoides) também fornecem importantes benefícios dietéticos, uma vez que estes compostos são conhecidos pelo seu potencial antioxidante e outros efeitos protetores associados (Singh et al. 2017).

Portugal, assim como outros países como Itália, Espanha, Marrocos, Grécia, Croácia e Chipre recomendam a adoção da Dieta Mediterrânica, que contempla o consumo de leguminosas (superior a 2 porções por semana), não só como alimento saudável e nutritivo, como também como forma de minimizar o risco de doença cardiovascular, prevenção do cancro e doenças associadas ao envelhecimento (Gupta et al. 2017).

### **2.5.3.1 Fatores anti-nutricionais (FAN)**

Por outro lado, as leguminosas também apresentam na sua composição compostos designados anti-nutricionais (FAN), que podem ter efeitos contrários na nutrição ideal. Estes compostos podem por exemplo, dificultar a absorção de determinados compostos ou desencadear reações adversas no organismo, como a flatulência (Gebrelibanos et al. 2013).

Contudo, estes fatores anti-nutricionais podem ser reduzidos ou eliminados e a biodisponibilidade melhorada pelas técnicas de processamento, como a demolha, germinação e tratamento térmico (Pinheiro et al. 2020), melhorando assim a qualidade nutricional e a apetência dos consumidores para o seu consumo (Akande and Fabiyi 2010). Outra técnica usada para a eliminação de FAN é a junção na cozedura de alga Kombu, característica da cozinha macrobiótica (Wells et al. 2017).

Os FAN mais encontrados nas leguminosas são os inibidores enzimáticos (das proteases e das amilases), compostos fenólicos, fitatos, oligossacáridos (rafinose, estaquiose e verbascose) e saponinas (Aguilera et al. 2013). Porém, apesar de serem conotadas como fatores anti-nutricionais, em doses baixas estes compostos podem também apresentar benefícios para a saúde (Laleg et al. 2016). São exemplos disso a atividade antioxidante e propriedades anticancerígenas dos taninos (Hayat et al. 2014), as propriedades antioxidantes dos fitatos, que protegem as células do dano celular (Derbyshire 2011) ou o poder de atuar como pré-biótico dos oligossacarídeos como componente da fibra dietética (estaquiose e rafinose) (Muzquiz et al. 2012).

Contudo, está descrito na literatura que o valor nutricional global das leguminosas está intimamente relacionado com diversos fatores, como características genéticas, condições agroclimáticas, gestão pós-colheita e processamento, fatores esses que de formas diferentes resultam num alimento saudável e equilibrado.

### Capítulo 3 – Metodologia geral (Material e Métodos)

O trabalho experimental foi dividido em 3 fases. Na fase I, compreendida entre os meses de maio e setembro de 2021, teve lugar a instalação e manutenção do ensaio experimental em estufa, com o crescimento de plantas em conforto hídrico durante todo o ciclo de crescimento da planta, em comparação com outras plantas em déficit hídrico durante toda a fase reprodutiva (diminuição de irrigação na prefloração).

A fase II contemplou determinações diretas na planta e/ou em laboratório (referentes à planta), em períodos pré-estabelecidos do desenvolvimento fenológico das plantas, determinações essas com o objetivo de avaliar o seu desenvolvimento e as respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas à seca terminal (imposta na fase reprodutiva), assim como o rendimento e componentes de produção.

Por último, a fase III compreendeu a realização de determinações para avaliar o impacto da seca na qualidade do grão obtido, recorrendo à análise colorimétrica e à determinação de açúcares solúveis e proteína bruta.

#### 3.1 Material vegetal

O ensaio experimental contemplou o estudo de 4 variedades locais de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. de diferentes regiões portuguesas (L1, L2, L3, L4) e uma variedade comercial (CV) desenvolvida em Portugal, através do Programa de Melhoramento de Leguminosas no INIAV-Elvas (Tabela 3 e Figura 11). As variedades em estudo foram selecionadas de um grupo de 22 variedades, de acordo com os teores mais elevados em compostos fenólicos, observados em resultado do trabalho desenvolvido no projeto CoHeSus.

**Tabela 3 - Designação e origem das variedades de feijão-frade em estudo**

| Designação | Variedade            | Origem                    | Região                               | Principais características  |
|------------|----------------------|---------------------------|--------------------------------------|---|
| CV         | Comercial – “Fradel” | INIAV-Elvas               | -----                                | Cor de grão creme com olho preto à volta do hilo, e flor branca   |
| L1         | Portuguesa           | BPGV*13100                | Guarda, Beira Litoral                | Grão castanho com um pequeno olho negro à volta do hilo, e flor violeta                                       |
| L2         | Portuguesa           | Diretamente do agricultor | Sátão, Beira Alta                    | Cor do grão castanho-claro, e pequeno olho castanho-esverdeado à volta do hilo, e flor violeta                |
| L3         | Portuguesa           | Diretamente do agricultor | Lardosa, Castelo Branco, Beira Baixa | Grão é mais redondo que os demais acessos, coloração creme e olho verde-claro ao redor do hilo, e flor branca |
| L4         | Portuguesa           | Diretamente do agricultor | Vila Maior, Douro Litoral            | Grão preto e olho negro ao redor do hilo, e flor violeta  |

\*BPGV – Banco Português de Germoplasma Vegetal; CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais portuguesas

As variedades em estudo estão descritas na tabela 3, referindo-se a variedade L1 (BPGV13100) que foi gentilmente cedida pelo Banco Português de Germoplasma Vegetal em Braga, banco este sob tutela do INIAV e que assume um papel central no domínio da promoção e da conservação dos recursos genéticos nacionais.



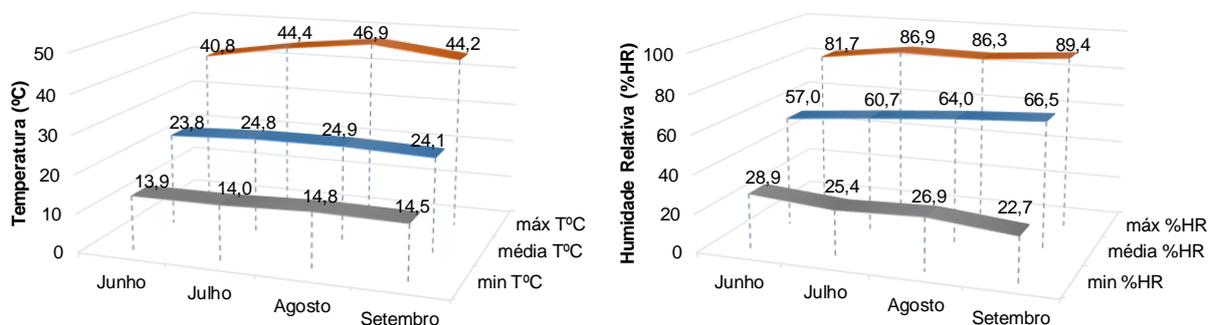
Figura 11 - Grão e flores das variedades em estudo (fotografias do autor).

### 3.2 Condições de crescimento

O ensaio decorreu entre o final de maio e outubro de 2021 nas estufas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (Oeiras), em ambiente semi-controlado.

As condições ambientais da estufa foram monitorizadas com recurso a um registador contínuo de temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ) e humidade relativa (%HR), o EasyLog USB Data Loggers (EL-SIE-2+, Lascar Electronics, EUA), tendo-se observado temperaturas entre 13,9 e 46,9  $^{\circ}\text{C}$  (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Valores médios de temperatura e humidade relativa máximas e mínimas observadas na estufa no período do ensaio.



Foram utilizados vasos de 3 L, contendo 1300 g de turfa (Arber Horticulture), com regimes hídricos estabelecidos após obtenção da capacidade de campo. Semanalmente todas as plantas foram adubadas com solução nutritiva com 12 % N, 4 % P e 6 % K (COMPLESAL, Bayer).

### 3.3 Procedimento experimental

No ensaio experimental foram considerados entre 5 a 10 vasos por variedades (CV, L1, L2, L3 e L4) e 2 regimes hídricos, i.e. um controlo em que as plantas foram mantidas em conforto hídrico (WW, “*well watered*”) e um regime de défice hídrico (WD, “*water deficit*”), segundo um delineamento casualizado, com os vasos identificados numericamente.

Após determinação da capacidade de campo (CC) de acordo com 3.3.1, procedeu-se à sementeira (28 de maio de 2021). Para cada variedade foram semeadas 2 sementes por vaso, sendo retirada a planta que apresentava menor vigor 2 semanas após a sementeira.

A irrigação dos 2 tratamentos foi controlada por pesagem dos vasos e a rega realizada de acordo com a água gasta, mantendo os regimes hídricos estabelecidos, face à capacidade de campo calculada. Os tratamentos foram mantidos até ao final do ciclo de crescimento das plantas, para avaliação da produtividade e composição do grão.

Ao longo do ciclo observou-se o desenvolvimento das plantas, sendo registados alguns parâmetros fenológicos como o início da floração e o desenvolvimento das vagens. Durante e após a imposição do défice hídrico e com uma periodicidade semanal, foram realizadas as leituras de SPAD (teor relativo de clorofila). Na fase de floração (garantindo que 50 % das plantas em cada variedade/tratamento estava em plena floração), ca. oito semanas após a sementeira, foram realizadas as determinações para avaliação da resposta fisiológica à seca, através de análises *in vivo* na planta (não destrutivas) e em laboratório (destrutivas), em folhas jovens e totalmente expandidas de plantas controlo (WW) e em seca (WD).

No final do ciclo fenológico da cada planta, após a completa maturação das vagens, foi avaliado o impacto da seca na produtividade através da contagem e pesagem das vagens e grãos produzidos por planta. Procedeu-se ainda à avaliação do impacto da seca na composição do grão com recurso a alguns parâmetros nutricionais e à análise colorimétrica.

#### 3.3.1 Capacidade campo (CC)

A CC foi calculada utilizando o método gravimétrico. Inicialmente, os vasos foram pesados vazios seguindo-se a adição da mesma quantidade de turfa (1300 g). Os vasos contendo a turfa foram posteriormente colocados em pratos, para retenção da água de escoamento, e regados até à sua saturação, para eliminar todo o ar existente. De forma a garantir a saturação por capilaridade, após 12 h de escoamento foi retirado o prato para completa drenagem. Decorridas 24 h foi realizada nova pesagem dos vasos, obtendo-se o valor para 100 % de CC após ser retirada a tara do respetivo vaso (Dumroese et al. 2015). Em função dos pesos obtidos para 100 % de CC, foram efetuados os cálculos para

manutenção das plantas bem irrigadas (80 % de CC) no tratamento de controlo (WW) e para a indução da seca (35 % da CC) no tratamento de défice hídrico (WD).

### **3.3.2 Indução stresse hídrico**

Após determinação do peso dos vasos que correspondem às percentagens de capacidade de campo pretendidas, de acordo com 3.3.1, a irrigação dos 2 tratamentos em estudo foi controlada por pesagem dos vasos 2 a 3 vezes por semana. As plantas foram mantidas bem irrigadas para 80 % da CC até ao aparecimento dos primórdios do botão floral (início da fase reprodutiva), ocorrida ca. 5 semanas da sementeira (02 de julho 2021). Nesse momento a irrigação foi suprimida em metade das plantas de cada variedade de forma a atingir 35 % da CC (WD). Na outra metade das plantas a irrigação foi mantida a 80 % da CC (WW).

O ensaio contemplou assim um tratamento de controlo, onde metade das plantas foram mantidas em conforto hídrico (WW), com regas para 80 % da capacidade de campo (CC) durante todo o ciclo de fenológico da planta, em comparação com um tratamento em défice hídrico terminal (WD) onde a irrigação foi suprimida na prefloração, 5 semanas após a sementeira, até atingir os 35 % da CC e mantidas nessas condições até ao final do ciclo, compreendendo toda a fase reprodutiva da planta.

## **3.4 Monitorização do desenvolvimento e características morfológicas da planta**

### **3.4.1 Conteúdo hídrico do solo - capacidade de campo**

O controlo do peso dos vasos e conseqüentemente da água contida nos mesmos é de extrema importância, de modo a garantir que os objetivos do ensaio são alcançados, assegurando assim que o tratamento controlo permanece bem irrigado durante todo o ciclo e que o tratamento para avaliar o impacto da seca, permanece realmente em défice hídrico na fase reprodutiva.

Todos os vasos foram pesados entre 2 a 3 vezes por semana, com registo da massa antes e após a rega de forma a perfazer o peso estabelecido para a capacidade de campo de cada tratamento, com obtenção da capacidade de campo média ao qual cada tratamento esteve sujeito.

### 3.4.2 Desenvolvimento fenológico

Ao longo do ensaio foi avaliado o estágio fenológico de cada planta de acordo com a escala da BBCH (Biologische Bundesantalt Bundessortenamt und CHemische Industrie), escala universal que resulta do trabalho de uma equipa de cientistas, e que utiliza um código decimal uniforme, dividido em estágios de crescimento principal e secundário, para a descrição de estágios de crescimento fenologicamente semelhantes de todas as espécies de plantas mono e dicotiledóneas (Meier et al. 2009), estando descritos na tabela 4 os principais estágios identificados neste trabalho.

**Tabela 4 - Estágios de crescimento da planta de feijão-frade avaliados de acordo com a escala BBCH**

| <b>Fases do crescimento</b> | <b>Código BBCH</b> | <b>Descrição dos estágios de crescimento</b>  |
|-----------------------------|--------------------|---|
| <b>Vegetativo</b>           | 05                 | Emergência do hipocótilo                      |
|                             | 20                 | Formação dos ramos secundários                |
|                             | 50                 | Emergência da inflorescência                  |
| <b>Reprodutivo</b>          | 60                 | Primeiras flores abertas                      |
|                             | 80                 | Início do amadurecimento de frutos e sementes |
|                             | 88                 | 80 % das vagens maduras                       |

A observação e identificação dos estágios de crescimento permitiram estabelecer as datas para a imposição do défice hídrico e para a realização das determinações. Semanalmente foi avaliada e registada a fase do ciclo fenológico em que cada planta se encontrava, para caracterização do ciclo de crescimento das diferentes variedades nos dois tratamentos.

### 3.4.3 Floração e desenvolvimento de vagens

Após o início da imposição do défice hídrico, na prefloração (T0), a contagem do número de flores abertas no caule principal e caules secundários foi realizada com uma periodicidade mínima semanal, avaliando as plantas na fase onde se estabeleceu o défice hídrico e os respetivos controlos. Da mesma forma, foi sendo registado o número de vagens verdes desenvolvidas ao longo da fase reprodutiva, sendo o resultado expresso como média cumulativa de flores e vagens por planta ao longo do ciclo de crescimento para cada variedade/tratamento.

Para além de T0 foram avaliados os resultados obtidos duas (T1), quatro (T2), cinco (T3) e seis (T4) semanas após o início do défice hídrico.

### 3.5 Parâmetros de desempenho fisiológico e bioquímico – determinações na planta

Para a avaliação do desempenho fisiológico fizeram-se determinações *in vivo* (não destrutivas) nas plantas (trocas gasosas foliares, fluorescência da clorofila e SPAD), havendo outras em que foi necessário colher amostras de folhas (potencial hídrico foliar, teor hídrico relativo, dano membranas e pigmentos fotossintéticos). As determinações de trocas gasosas foliares e potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) foram realizadas *in loco* em folhas jovens completamente expandidas, em pelo menos 4-5 plantas por variedade e tratamento, no momento da plena floração. Na mesma fase do ciclo e nas mesmas plantas, foi colhido material vegetal (2 a 6 folíolos) de onde se retiraram discos de 0,35 cm<sup>2</sup> de vários folíolos para a determinação da fuga de eletrólitos (I %), teor hídrico relativo foliar (RWC %) e pigmentos fotossintéticos (Clorofilas *a*, *b* e carotenóides), sendo o restante material pesado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em câmara de congelamento a -80 °C até processamento para determinação de açúcares solúveis. As determinações de SPAD e da fluorescência da clorofila foram realizadas em todas as plantas do ensaio, numa folha pré-marcada do terço-médio da planta. A fluorescência da clorofila foi realizada no final da floração, enquanto o SPAD foi controlado semanalmente ao longo de toda a fase de imposição do déficit hídrico, em todas as plantas do ensaio (WW e WD). Os parâmetros de rendimento e componentes de produção foram realizados a todas as plantas no final do ciclo fenológico.

#### 3.5.1 Potencial hídrico ( $\Psi_w$ )

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$  – Water potencial) foi determinado com recurso a uma câmara de pressão (Model 1000, PMS Instrument Co., Albany, OR, USA) de acordo com o método de Scholander et al. (1965). A medição foi realizada após corte preciso do pecíolo central de uma folha jovem completamente expandida, inserção da folha na câmara de pressão, e pressurização da câmara de forma crescente e gradual com nitrogênio industrial até visualização do retorno do soluto xilémico à superfície do corte. A pressão marcada no manómetro representa assim a pressão hidrostática negativa (tensão) que existe no xilema da folha, correspondendo ao  $\Psi$  da mesma.

As medições foram realizadas em 4 a 5 plantas de cada variedade/tratamento antes do amanhecer, obtendo-se o  $\Psi_{PD}$  (*pre-dawn water potencial*) quando a evapotranspiração é mínima, e ao meio-dia solar, obtendo-se o  $\Psi_{MD}$  (*mid-day water potencial*) quando o déficit de pressão de vapor é maior entre a superfície da folha e a atmosfera correspondendo a valores mais negativos devido a um aumento da perda de água por transpiração.

### 3.5.2 Teor hídrico relativo (Relative water content - RWC)

A determinação do teor hídrico relativo (RWC - '*relative water content*') tem por objetivo avaliar o estado de hidratação atual numa folha relativamente à sua hidratação máxima possível, representando assim um ótimo indicador do estado hídrico da planta (Boyer 1969).

Para a determinação do RWC as folhas foram destacadas, mantidas em sacos de plástico numa caixa refrigerada e rapidamente transportadas para o laboratório. Para cada amostra foram destacados 7 discos foliares de 0,35 cm<sup>2</sup> e, imediatamente pesados em balança analítica para registo da massa, que corresponde ao peso fresco (PF) da amostra. De seguida os discos foram colocados numa câmara húmida onde permaneceram durante a noite à temperatura ambiente e protegidos da luz, de forma a absorverem água até à saturação. Posteriormente os discos foram retirados cuidadosamente da câmara húmida, sendo removido o excesso de água da superfície dos discos e procedendo-se a nova pesagem para obtenção do peso turgido (PT). Os discos foram em seguida colocados em estufa a 80 °C durante 24 h obtendo-se o peso seco (PS) após pesagem como descrito em (Scotti-Campos et al. 2013).

O RWC foi calculado seguindo a fórmula  $RWC = ((PF-PS) / (PT-PS)) \times 100$  (Barrs 1968), e as determinações realizadas em 4 a 5 plantas de cada variedade/tratamento.

### 3.5.3 Fuga de eletrólitos

A determinação do índice de dano membranar (I %) foi realizado de acordo com (Scotti-Campos et al. 2015), pela avaliação da perda de eletrólitos pela célula. Para cada amostra foram cortados 12 discos foliares de 0,35 cm<sup>2</sup>, lavados 2 vezes com água desionizada e colocados a flutuar durante 22 h em frasco com 10 mL de água desionizada a 25 °C. Após 22 h foram lidos os valores de condutividade a 25 °C, resultantes dos eletrólitos libertados pelas células, com recurso a um condutímetro (Crison GLP 31, Crison Instruments, Espanha). De seguida as amostras foram expostas a 90 °C em estufa (Bicasa, Itália) durante 2 h para total permeabilização, e a condutividade total medida após arrefecimento (25 °C). As determinações foram realizadas em 4 a 5 plantas de cada variedade/tratamento e a fuga de eletrólitos de cada amostra expressa como percentagem da condutividade após 22 h de flutuação em relação à sua condutividade total.

### 3.5.4 Trocas gasosas foliares

As trocas gasosas foliares, concretamente a taxa fotossintética líquida (P<sub>n</sub>), condutância estomática (g<sub>s</sub>), concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) e transpiração (E) foram

determinadas numa folha jovem completamente expandida utilizando um analisador portátil de gases ( $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ ) por infravermelho (IRGA – Infra Red Gas Analyser - Li-Cor 6400, LiCor, Lincoln, NE, EUA) (Figura 12) como descrito em Semedo et al. (2021). As determinações no analisador são realizadas com fornecimento externo de  $\text{CO}_2$  de cerca de 370 ppm, câmara de medição controlada a 25 °C com sistema integral de irradiância artificial por lâmpada LED (ca.  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em circuito aberto, utilizando os valores  $\text{CO}_2$  e a  $\text{H}_2\text{O}$  do meio ambiente como valores de referência. Os parâmetros mencionados de trocas gasosas foram calculados de acordo com as equações de Caemmerer and Farquhar (1981), e a eficiência instantânea do uso da água (iWUE) foi calculada como a razão de  $\text{Pn}/\text{E}$ , representando as unidades de  $\text{CO}_2$  assimiladas por unidade de água perdida pela transpiração.

As medições foram realizadas pela manhã (entre as 10:00 h-12:00 h), em 4 a 5 plantas de cada variedade/tratamento com um mínimo de três medições por planta para cada parâmetro.



**Figura 12 - Determinações com o analisador portátil de gases ( $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ ) por infravermelho - IRGA – Infra Red Gas Analyser - Li-Cor 6400. (Fotografias do autor)**

### **3.5.5 Eficiência Fotossintética - Fluorescência da Clorofila a**

Como forma de avaliar a eficiência fotossintética e possíveis danos ocorridos, tendo por base que as moléculas de clorofila possuem a capacidade de reemitir, na forma de fluorescência, uma parte da luz absorvida que não é convertida em energia química, são determinados os parâmetros de fluorescência.

Parâmetros de fluorescência da clorofila a, nomeadamente a eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) e da eficiência real do PSII ( $F_v'/F_m'$ ) na conversão de energia sob exposição à luz, foram determinados usando uma FluorPen FP110/D (PSI, República Checa) e realizados nas mesmas folhas onde foram avaliados os teores relativos de clorofila (SPAD) em cada planta do ensaio. Estes parâmetros têm como princípio o facto de que modificações no estado funcional do aparelho fotossintético, induzidas por stresses abióticos, como a seca, se traduzem em alterações na fluorescência da clorofila, revelando por isso rápida e precocemente as respostas da planta ao stress.

A determinação de  $F_v/F_m$  foi realizada em folhas adaptadas ao escuro. Após colocação das pinças de medição do equipamento nas folhas, as mesmas são fechadas e as folhas sujeitas a 30 minutos de adaptação ao escuro, sendo as leituras realizadas após rápida abertura das pinças, obtendo-se assim a eficiência fotoquímica potencial máxima do fotossistema II. Para a determinação do parâmetro  $F_v'/F_m'$  (parâmetro de Genty (Genty et al. 1989)), que representa a eficiência real do PSII, a medição é realizada sob irradiação plena na folha, logo sem adaptação da mesma ao escuro.

As leituras foram realizadas em 5 a 10 plantas de cada variedade/tratamento e os resultados expressos pela média de  $F_v/F_m$  e  $F_v'/F_m'$  em unidades relativas.

### **3.5.6 Pigmentos fotossintéticos - Clorofilas e carotenóides totais**

Neste trabalho foram utilizados 2 métodos distintos para avaliação dos pigmentos fotossintéticos, cada um deles com objetivos diferentes. O teor relativo de clorofila (SPAD) teve como intuito avaliar de forma não destrutiva o nível de cor verde das folhas (avaliação da senescência) ao longo do tempo de imposição do déficit hídrico (Limantara et al. 2015) e assim verificar o comportamento e resposta de cada planta. Já o método espectrofotométrico foi realizado para a quantificação precisa da clorofila a, b e carotenóides e suas razões, avaliando alterações bioquímicas ao nível dos pigmentos fotossintéticos nas folhas numa determinada fase do desenvolvimento da planta.

#### **3.5.6.1 Teor relativo de clorofila (SPAD)**

A monitorização contemplou medições antes da imposição do déficit hídrico, na prefloração (T0 – BBCH50, 5 semanas após sementeira), no final da floração (T1 - BBCH69, 7 semanas após sementeira), no final do desenvolvimento dos frutos (T2 - BBCH79, 9 semanas após sementeira), no amadurecimento de cerca de 20 % frutos (T3 - BBCH82, 10 semanas após sementeira) e no amadurecimento de cerca de 80 % frutos (T4 - BBCH88, 11 semanas após sementeira), como identificado no gráfico 2 do ponto 4.1.1.

Foi utilizado um medidor de clorofila portátil, Soil Plant Analysis Development – SPAD (SPAD-502 Plus, Konica-Minolta, Japan) (Figura 13), que utiliza princípios óticos não destrutivos, baseados na absorvância e/ou transmitância de luz pelas folhas, de forma simples e rápida (Richardson et al. 2002). O equipamento possui díodos que emitem radiação a 650 nm (luz vermelha) e 940 nm (radiação infravermelha), que durante a medição passa pela folha e é recebida por um fotodiodo de silicone onde é convertida inicialmente em sinais elétricos e posteriormente em sinais digitais que permitem o cálculo interno no equipamento

em valores proporcionais aos do teor de clorofila presentes na folha e expressos em unidades relativas de SPAD (Minolta 1989).



**Figura 13 - Determinação e leitura do teor relativo de SPAD com o equipamento SPAD-502 Plus, Konica-Minolta. (Fotografia do autor)**

O sinal derivado da emissão em 650 nm serve de base para o cálculo do teor relativo de clorofila (SPAD), uma vez que a absorbância da clorofila é muito eficiente neste comprimento de onda, enquanto o sinal a 940 nm é usado como factor de correção pela absorbância a 650 nm por moléculas do tecido foliar desprovidas de clorofila (Zhu et al. 2012), sendo o resultado obtido em unidades relativas SPAD e proporcional à quantidade de clorofila presente na amostra (Uddling et al. 2007).

Os valores obtidos resultaram da leitura média de três pontos de cada folha na sua face adaxial, numa folha pré-marcada do terço médio de cada planta. Foram realizadas determinações em 5 a 10 plantas de cada interação variedade/tratamento.

### **3.5.6.2 Teor absoluto de clorofila e carotenóides**

Para a quantificação das clorofilas totais e carotenóides presentes na folha foi utilizado o método espectrofotométrico, após extração com metanol a 100 %. Para a extração dos pigmentos fotossintéticos foram destacados 4 discos foliares de 0,35 cm<sup>2</sup> de área de cada planta, submersos em 10 mL de metanol a 100 % em frascos de vidro com tampa de teflon ao abrigo da luz e refrigeração (4 °C) até completa extração (72 h), como descrito em (Scotti-Campos et al. 2015). A concentração de clorofilas e carotenóides presentes no extrato, foi determinada espectrofotometricamente (Shimadzu UV160A, Japão) pela leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 665,2 e 652,4 nm para as clorofilas *a* e *b*, respetivamente, e 470 nm para os carotenóides, contra um branco (metanol 100 %), de acordo com as equações de Lichtenthaler (1987) (1), (2), (3) e (4):

$$(1) \text{ Clorofila } a = 16,72 \times \text{Abs. } 665,2 - 9,16 \times \text{Abs. } 652,4$$

$$(2) \text{ Clorofila } b = 34,09 \times \text{Abs. } 652,4 - 9,16 \times \text{Abs. } 665,2$$

$$(3) \text{ Clorofila } a + b = 1,44 \times \text{Abs. } 665,2 + 24,93 \times \text{Abs. } 652,4$$

$$(4) \text{ Carotenóides} = \frac{(1000 \times \text{Abs.470} - 1,63 \times \text{Clorofila a} - 104,96 \times \text{Clorofila b})}{221}$$

As determinações foram realizadas em 4 a 5 plantas de cada variedade/tratamento e os pigmentos fotossintéticos quantificados em cada amostra foliar foram expressos em função do seu peso seco.

### 3.5.7 Açúcares solúveis foliares

Os açúcares solúveis foliares (sacarose, frutose, glucose, sorbitol e manitol) foram quantificados tendo por base o método de (Damesin and Lelarge 2003) com algumas modificações, como descrito em Ramalho et al. (2013). O método foi aplicado em amostras foliares com aproximadamente 400 mg de PF, amostras estas que se encontravam armazenadas a -80°C, após terem sido congeladas em nitrogénio líquido logo após a sua colheita. Inicialmente as amostras foram pulverizadas com nitrogénio líquido em almofariz e homogeneizadas em 4 mL de H<sub>2</sub>O fria ultrapura (Milli-Q, Tipo I) e 50 mg de polivinilpolipirrolidona (Sigma), seguindo-se 20 min em gelo e agitação a 100 rpm, de forma a melhorar a eficiência da extração. Após centrifugação (Centrifuga Biofuge 28 RS, Haraeus Sepatech) a 12000 g durante 5 min e a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido para tubos de centrífuga com tampa e submetidos a 100 °C (3 min) num banho termostaticado para desnaturação das proteínas, arrefecido em gelo (6 min) e centrifugado (12000 g, 15 min, 4 °C). A solução sobrenadante obtida foi filtrada (filtros nylon Millipore, 0,45 µm) para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) de alíquotas de 50 µL. Foi usado um sistema HPLC (Waters, EUA) equipado com detetor refratométrico (Waters 2414, EUA), uma coluna em fase reversa "Sugar-Pak I" (Waters 300 x 6,5 mm) e respetiva pré-coluna (SugarPak II inserts, Wat 015209) a 90 °C. Como eluente foi usada uma solução de 50 mg EDTA-Ca L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O ultrapura, num fluxo isocrático de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, durante 22 min.

Os açúcares presentes foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões conhecidos de sacarose (Sigma, USA), glucose (Merck), frutose (Merck) e sorbitol (Sigma, USA), manitol (Sigma, USA). A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo, com a realização de curvas de calibração com um mínimo de 5 pontos, de soluções padrão de concentração conhecida do analito ([sacarose]: 51 a 505 µg mL<sup>-1</sup>; [glucose]: 27 a 268 µg mL<sup>-1</sup>; [frutose]: 27 a 273 µg mL<sup>-1</sup>; [sorbitol]: 27 a 270 µg mL<sup>-1</sup>; [manitol]: 25 a 250 µg mL<sup>-1</sup>) dentro da gama de trabalho pretendida. Estas soluções padrão de calibração foram injetadas aquando e nas mesmas condições que as amostras a analisar, incluindo o volume de injeção, procedendo-se à quantificação das amostras por interpolação da resposta das amostras nas retas de calibração obtidas.

As determinações foram realizadas em 4 a 5 plantas de cada variedade/tratamento e os açúcares presentes em cada amostra expressos em função do seu peso seco.

### **3.6 Parâmetros agronômicos – Indicadores de produção**

No final do ciclo de crescimento de cada planta e logo após a completa maturação das vagens, procedeu-se à colheita de todas as vagens de cada planta e secagem em estufa com ventilação (Termaks, Noruega) a 35 °C durante 72 h (Scotti-Campos et al. 2015). Posteriormente para cada planta foram determinados alguns parâmetros de produção, nomeadamente o número de vagens por planta, número de grãos por vagem, peso das vagens, peso de 100 grãos e o peso total de grãos por planta, em todas as plantas do ensaio.

#### **3.6.1 Número de vagens por planta (NVP)**

Procedeu-se à contagem de todas as vagens colhidas por planta, sendo o resultado expresso como média de vagens produzidas por planta em cada variedade/tratamento.

#### **3.6.2 Número de grãos por vagem e planta (NGV; NGP)**

Por planta, procedeu-se à pesagem de todas as vagens, debulha e contagem manual do número de grãos em cada vagem. Para cada variedade foi posteriormente determinada a produção média de grãos por planta, assim como a média do número de grãos por vagem, que resultou do quociente entre o número de sementes e o número de vagens de cada planta para cada variedade.

#### **3.6.3 Peso dos grãos por planta (PGP)**

O peso de grãos por planta (g) foi calculado após contagem e pesagem dos grãos de cada vagem, para todas as vagens de cada planta. O resultado é dado pela média do peso de grãos por planta para todas as plantas de cada variedade/tratamento e expresso em g.

#### **3.6.4 Peso das vagens por planta (PVP)**

O peso de vagens por planta (g) foi calculado após contagem e pesagem das vagens de cada planta, para todas as plantas de cada variedade/tratamento.

### 3.6.5 Peso de 100 grãos (P100G)

Após obtenção, contagem e pesagem da totalidade dos grãos de cada planta, o peso de 100 grãos foi obtido por extrapolação a partir da Equação (5), resultando da média das plantas de cada variedade/tratamento em estudo e expresso em g.

Equação 5:

$$(5) m_{100} = \frac{m_{sementes}}{n_{sementes}} \times 100 \quad , \text{ em que:}$$

$m_{100}$  – peso de 100 grãos (g);

$m_{sementes}$  – peso dos grãos da planta (g);

$n_{sementes}$  – número de sementes da planta (n)

De acordo com o proposto por Shimelis and Rakshit (2005), este parâmetro permite classificar os grãos quanto ao seu tamanho, em grãos pequenos ( $P100G < 25$  g), grãos médios (peso de 100 grãos entre 25 e 40 g) e grãos grandes ( $P100G > 40$  g).

## 3.7 Parâmetros qualidade - Análise colorimétrica e composição do grão

Para a análise colorimétrica foram utilizados os grãos inteiros (forma de apresentação habitual desta leguminosa ao consumidor), completamente maduros e secos. Relativamente à composição do grão os doseamentos dos açúcares solúveis e das proteínas foram realizados após moagem dos grãos com um moinho de pás (Polymix, WK 1623704) e um crivo de 1 mm. As amostras obtidas foram colocadas em tubos selados e armazenados num exsiccador, ao abrigo da luz. Para estes parâmetros nutricionais foram moídas entre 3 a 5 amostras para cada variedade e tratamento.

### 3.7.1 Análise colorimétrica do grão

A cor dos grãos de cada planta foi determinada pela medição das coordenadas CIE –  $L^*a^*b^*$  ( $L^* = 0$  (preto - escuro) a  $L^* = 100$  (branco - claro),  $-a^*$  (verde) a  $+a^*$  (vermelho) e  $-b^*$  (azul) a  $+b^*$  (amarelo)), na superfície dos grãos, usando um colorímetro portátil Konica Minolta CR-400 (Minolta Co. Lta., Osaka, Japão), tendo por base a refletância da luz, utilizando o iluminante D65 e após calibração do equipamento com azulejo padrão branco (branco nº15233011,  $L^* 93,5$ ,  $a^* 0,3164$  e  $b^* 0,3325$ ).

As determinações das coordenadas foram realizadas com recurso a recipiente específico para amostras de pós e grãos, como recomendado no manual do equipamento (Konica Minolta CR-400/410), realizando-se leituras em triplicado em grãos resultantes de 5 a 10 plantas por variedade/tratamento.

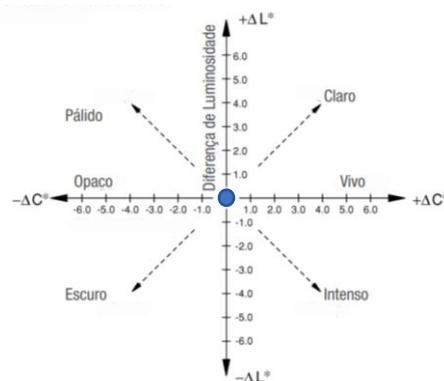
Os resultados foram expressos segundo o sistema CIE  $L^*a^*b^*$  (Comissão Internationale de Éclairage, espaço de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) e os valores das coordenadas deste sistema usados para calcular o espaço de cores pelo sistema CIE  $L^*C^*h^\circ$ , onde mantém o valor de  $L^*$  para a luminosidade,  $C^*$  corresponde a cromaticidade (saturação de cor) enquanto  $h^\circ$  apresenta o ângulo de matiz como uma sombra de acordo com o ângulo na roda de cores (360°), representando 0° a tonalidade vermelho-púrpura, a cor amarela a 90°, a tonalidade cinza-verde são 180° e a tonalidade azul a 270°, no sentido anti-horário (McGuire 1992). Sendo os valores de cromaticidade ( $C^*$ ) e o ângulo de tonalidade hue ( $h^\circ$ ) obtidos com base na equação (6) e equação (7), respetivamente (Konica Minolta 2007),

$$(6) C^* \text{ (Cromaticidade)} = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$$

$$(7) h^\circ \text{ (Ângulo hue)} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

onde  $a^*$  e  $b^*$  correspondem às coordenadas de cromaticidade no espaço de cor  $L^*a^*b^*$ .

Estes resultados definem as cores de cada objeto/alimento, sendo os termos propostos para a variação das coordenadas  $L^*$  ( $\Delta L$ ) e  $C^*$  ( $\Delta C^*$ ) representados na figura 14 (Konica Minolta 2007).



**Figura 14 - Termos para descrever as diferenças de Croma ( $C^*$ ) e Luminosidade ( $L^*$ ). (Adaptado do *Precise color communication*, Konica Minolta (2007))**

As diferenças existentes entre diferentes amostras em termos psicométricos, podem ser calculadas pela fórmula da diferença total de cor ( $\Delta E$ ) (Konica Minolta 2007), representada na equação (8), que indica a diferença de cor entre uma dada amostra ( $L^*$ amostra,  $a^*$ amostra,  $b^*$ amostra) e uma amostra de referência ( $L^*$ padrão,  $a^*$ padrão,  $b^*$ padrão), com os cálculos a incorporar as características dos limites de percepção de cor do olho humano no sistema CIE Lab (espaço de cor  $L^*a^*b^*$ ), nomeadamente a dependência da saturação, tonalidade e luminosidade.

$$(8) \Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Onde  $\Delta L^*$  (9),  $\Delta a^*$  (10),  $\Delta b^*$  (11) correspondem às diferenças em  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , valores entre o valor da amostra e o valor do padrão:

$$(9) \Delta L^* = L^*amostra - L^*padrão$$

$$(10) \Delta a^* = a^*amostra - a^*padrão$$

$$(11) \quad \Delta b^* = b^*_{amostra} - b^*_{padr\tilde{a}o}$$

Considera-se como amostra padrão para cada uma das variedades em WD a média de cada um dos parâmetros do feijão-frade resultante das plantas do respetivo tratamento controlo (WW).

De acordo com o manual de ciência da cor de Yamauchi (1989) citado por Yousif (2014), esta diferença total de cor  $\Delta E$  é um índice para diferenças de cor totais visíveis e permite a classificação por categorias para valores entre 0-0,5 (ligeiramente discernível), 0,5 e 1,5 (difícil de detetar pelo olho humano); 1,5 a 3,0 (diferença visível, detetável por pessoas treinadas) e; 3,0 a 6,0 (diferenças apreciáveis e detetáveis por pessoas comuns). Grandes diferenças já são consideradas para valores entre 6,0 e 12,0, mas dentro do mesmo grupo de cores e valores superiores a 12 já representam extremos, com amostras pertencentes a um grupo de cores diferentes.

### 3.7.2 Açúcares solúveis no grão

Os açúcares solúveis do grão foram quantificados tendo por base o método de Medlicott e Thompson (1985) em amostras de ca. 400 mg de grão previamente moído a que se adicionaram 10 mL de água fria ultrapura (Milli-Q, Tipo I) em tubos de centrifuga com agitador magnético. Procedeu-se à extração (30 min) a frio, (tubos em gelo) numa placa de agitação (100 rpm), seguida de 5 min em banho ultrassónico. Após centrifugação (centrifuga Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech) a 15000 g durante 20 min e a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido para frascos de vidro. De forma a garantir a completa recuperação dos açúcares presentes na amostra e a lavagem do precipitado, procedeu-se a nova extração como descrito anteriormente. O sobrenadante (1ª e 2ª extração) foi submetido a 100 °C num banho termostatizado (4 min) para desnaturação das proteínas, colocado em gelo (6 min) e centrifugado (12000 g, 15 min, 4 °C). A solução sobrenadante obtida foi filtrada (filtro nylon Millipore, 0,45 µm) para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC). Foi usado um sistema HPLC (Waters, EUA) equipado com detetor refratométrico (Waters 2414, EUA), uma coluna em fase reversa Sugar-Pak I (Waters 300 x 6,5 mm) e respetiva pré-coluna (SugarPak II inserts, Wat 015209) a 90 °C. Como eluente foi usada uma solução de 50 mg EDTA-Ca L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O ultrapura, num fluxo isocrático de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, durante 22 min e volume de injeção de 50 µL.

Os açúcares presentes foram identificados e quantificados como descrito em 3.5.7, acrescido de padrões conhecidos dos açúcares estaquiase (Sigma, USA) e rafinose (Sigma, USA), dentro da gama de trabalho pretendida. As determinações foram realizadas em 3 a 4 plantas de cada variedade/tratamento.

### 3.7.3 Proteína bruta no grão

O teor proteico das amostras de grão obtido em WW e WD foi determinado pelo método Kjeldhal (NP1996:2000), através da quantificação do nitrogénio total presente nas amostras em estudo. Para tal, em tubos de digestão foram pesadas amostras de ca. 1 g ao qual se adicionaram 12,5 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado (95 - 97 %) para a digestão da amostra na presença de um catalisador metálico (sulfato de potássio + selénio) em placa de aquecimento a  $420 \pm 10$  °C durante pelo menos 2 h, garantindo a completa mineralização da amostra, com a conversão de N orgânico em sulfato de amónia (até que a solução esteja límpida, incolor ou verde-pálido) e deixando-se depois arrefecer. Antes de seguir para a destilação o ácido sulfúrico foi neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 32 %). Posteriormente foi realizada a destilação do sulfato de amónia numa unidade de destilação (Kjeltec 2200 – Auto Destillation), com a recolha do amoníaco em 50 mL de ácido bórico ( $H_3BO_3$  – 4 % p/v). A solução obtida foi posteriormente titulada (titulador automático Tim 850 - Titration Manager) com uma solução de ácido clorídrico (HCl 0,1 N) e usando como indicador o vermelho de metilo.

Para a determinação do teor de proteína nas amostras, os resultados da quantificação de nitrogénio total foram multiplicados pelo fator de conversão (6,25), baseado na percentagem de nitrogénio na proteína (FAO, 2002).

As determinações foram realizadas em amostras de grão obtidas a partir de 3 plantas de cada variedade/tratamento e os resultados expressos como média da % de proteína.

### 3.8 Análise estatística

Foi realizada estatística descritiva para a caracterização da amostra e estatística inferencial, com a realização da análise de variâncias (ANOVA) e estudo comparativo das médias (teste Tukey) para um grau de confiança de 95 % (diferença entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas em  $p < 0,05$ ). A análise bivariada, com recurso à correlação de Pearson, foi realizada para avaliar a correlação entre os parâmetros analisados.

Com recurso a gráficos e tabelas, são apresentadas as médias dos resultados, erro padrão (SE) e análise de variância, onde diferentes letras expressam diferenças significativas entre variedades (a, b, c) ou entre tratamentos hídricos (WW e WD) dentro da mesma variedade (r, s), com grau de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ). As (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados.

Para a referida análise estatística foi utilizado o programa IBM SPSS Statistics 25 (IBM SPSS, Inc., Chicago, EUA).

## **Capítulo 4 – Resultados e Discussão**

Para enfrentar os desafios agrícolas decorrentes das alterações climáticas, é necessário compreender as respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas à seca nas plantas, bem como os impactos ao nível agronómico e na qualidade (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006; Farooq et al. 2017). Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da avaliação da resistência à seca em variedades portuguesas de feijão-frade, uma cultura sustentável e de grande importância nutricional e agronómica, visando a identificação de características de maior adaptação ao défice hídrico bem como um melhor conhecimento e preservação dos recursos genéticos existentes.

### **4.1 Desenvolvimento fenológico e características morfológicas na resposta à seca**

#### **4.1.1 Crescimento e desenvolvimento fenológico**

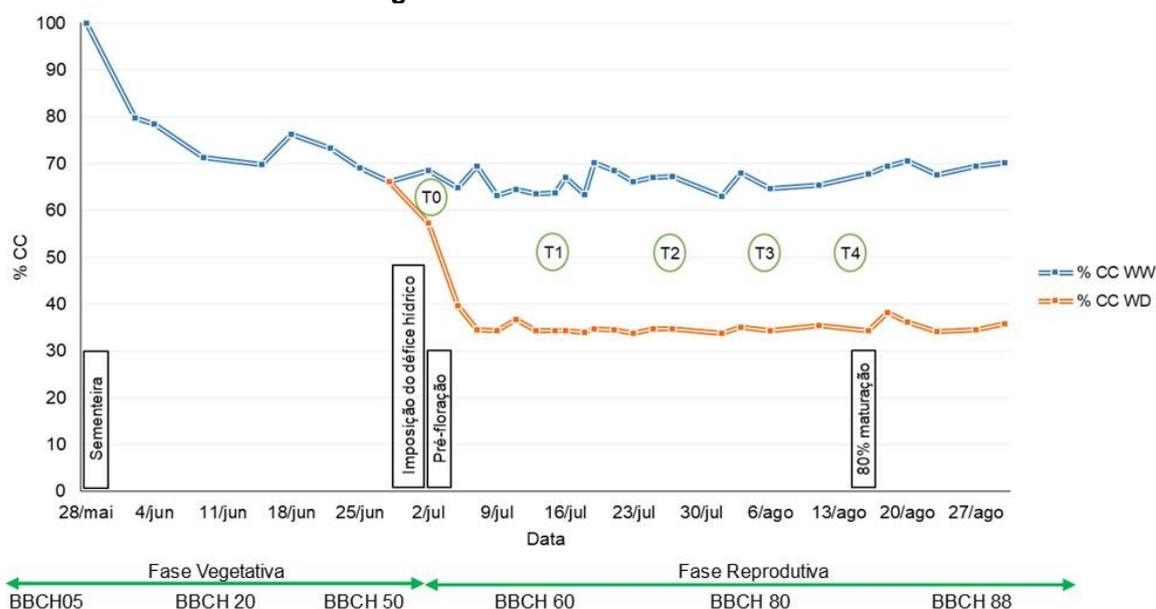
A seca é um stresse abiótico crítico para o crescimento e desenvolvimento das plantas com impacto no rendimento das culturas (Singh e Reddy 2011; Ravelombola et al. 2018; Ravelombola et al. 2020), entre as quais o feijão-frade (Singh et al. 1999; Verbree et al. 2015). Todas as fases do ciclo de crescimento podem ser afetadas pelo défice hídrico, sendo a fase reprodutiva a mais crítica (Agbicodo et al. 2009; Verbree et al. 2015).

Como descrito por Rollins et al. (2013) a redução do crescimento das plantas é uma resposta de adaptação da planta à seca e não uma consequência secundária face à diminuição de recursos. É a relação concertada entre o desenvolvimento fenológico e um padrão eficiente de uso da água que permite a uma cultura adaptar-se a um stresse como a seca (Sekhon et al. 2010).

Os efeitos da seca também dependem da intensidade e duração da mesma, uma vez que o teor de água dos tecidos diminui linearmente com o aumento da gravidade da seca (Reddy et al. 2004; Iwuagwu and Ogbonnaya 2017).

A disponibilidade hídrica do solo das plantas em controlo (WW) e em défice hídrico (WD) na fase reprodutiva, expressa na média da percentagem de capacidade de campo, ao longo do ensaio está expressa no gráfico 2.

**Gráfico 2 - Conteúdo hídrico do solo expresso em capacidade de campo (CC) ao longo do ensaio e desenvolvimento fenológico de cada variedade/tratamento.**



|    | Fase Vegetativa  |                   |                   | Fase Reprodutiva   |                    |                    |                     |                    |                    |
|----|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|    | BBCH 05          | BBCH 20           | BBCH 50           | BBCH 60            |                    | BBCH 80            |                     | BBCH 88            |                    |
|    |                  |                   |                   | WW                 | WD                 | WW                 | WD                  | WW                 | WD                 |
| CV | 4±0 <sup>a</sup> | 32±0 <sup>a</sup> | 39±1 <sup>a</sup> | 60±4 <sup>ar</sup> | 61±2 <sup>ar</sup> | 77±0 <sup>as</sup> | 81±1 <sup>ar</sup>  | 84±0 <sup>ar</sup> | 89±3 <sup>ar</sup> |
| L1 | 4±0 <sup>a</sup> | 32±0 <sup>a</sup> | 39±1 <sup>a</sup> | 50±1 <sup>br</sup> | 49±1 <sup>br</sup> | 71±4 <sup>ar</sup> | 64±0 <sup>br</sup>  | 81±1 <sup>ar</sup> | 77±1 <sup>bs</sup> |
| L2 | 4±0 <sup>a</sup> | 32±0 <sup>a</sup> | 40±1 <sup>a</sup> | 52±1 <sup>br</sup> | 53±1 <sup>br</sup> | 77±0 <sup>ar</sup> | 62±3 <sup>bs</sup>  | 91±6 <sup>ar</sup> | 78±1 <sup>bs</sup> |
| L3 | 4±0 <sup>a</sup> | 32±0 <sup>a</sup> | 40±1 <sup>a</sup> | 51±1 <sup>br</sup> | 51±1 <sup>br</sup> | 73±2 <sup>ar</sup> | 69±2 <sup>abr</sup> | 81±2 <sup>ar</sup> | 78±1 <sup>br</sup> |
| L4 | 4±0 <sup>a</sup> | 32±0 <sup>a</sup> | 40±1 <sup>a</sup> | 51±1 <sup>br</sup> | 51±1 <sup>br</sup> | 77±0 <sup>ar</sup> | 74±3 <sup>abr</sup> | 81±2 <sup>ar</sup> | 80±2 <sup>br</sup> |

CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; T0, T1, T2, T3, T4 – datas de análise; CC – Capacidade de campo. Os valores correspondem ao nº de dias médios ± SE (n = 5 a 10). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

As plantas controlo (WW), regadas para 80 % da capacidade de campo, apresentaram valores médios de CC na ordem dos 65 %. Em contraponto as plantas em déficit hídrico (WD), estabelecido na préfloração (T0), atingiram e mantiveram valores de CC na ordem dos 35 % até ao final do seu ciclo fenológico.

No gráfico 2 apresentam-se também as principais fases do ciclo fenológico e alguns estágios do desenvolvimento de cada variedade e tratamento de acordo com a escala BBCH, com indicação do número médio de dias após sementeira até serem atingidos os estágios fenológicos mencionados na tabela 4. Esta análise evidenciou uma duração semelhante da fase vegetativa em todas as variedades (CV, L1 a L4), sendo as diferenças verificadas somente na fase reprodutiva, tanto por influência das variedades como do tratamento imposto (WW e WD). A variedade comercial (CV) distinguiu-se das variedades locais logo no início da fase reprodutiva (BBCH60), com a ântese (primeira flor) a ocorrer cerca de 10 dias depois das variedades locais (L1 a L4), não se verificando nesta fase qualquer diferença entre

tratamentos. Com o avançar da fase reprodutiva (BBCH80 - Início do amadurecimento de frutos e sementes) observou-se para L1 e L2 e L3 uma mais rápida progressão no ciclo fenológico como resposta à seca, nas plantas em WD, verificando-se o início da maturação das vagens 4 (L3), 7 (L1) e 15 (L2) dias antes que os respetivos controlos, sendo a maturação precoce referida como uma importante estratégia para evitar o défice hídrico (Ulemale et al. 2013).

A variedade L2 manteve a estratégia de antecipar o estado fenológico como resposta à seca, atingindo a maturação de 80 % das vagens (BBCH88) com um avanço de 13 dias face ao controlo, o mesmo não acontecendo para L1 e L3 que reduziram a diferença entre tratamentos ao atingir esta fase do desenvolvimento.

As variedades locais L3 e L4 apresentaram duração semelhante do seu ciclo, independentemente do tratamento imposto, não se verificando por isso impacto da seca nesta avaliação, sendo o mesmo verificado para a variedade CV. De referir que CV apesar de iniciar mais tarde a floração (BBCH60), atinge as restantes fases (BBCH80 e BBCH88) de forma semelhante que os controlos de L1, L3 e L4.

Quanto às características morfológicas visíveis e ocorridas na planta, após a imposição do défice hídrico, observou-se um rápido amarelecimento e queda das folhas adultas, ficando os recursos disponíveis para as folhas mais jovens, em menor número, e que permaneceram verdes (Figura 15). A seca leva à redução do número de folhas (Farooq et al. 2017; Khatun et al. 2021), como observado para todas as variedades em estudo (Figura 15). Esta redução da biomassa aérea traduz-se na diminuição no número de vagens e grãos por planta obtidos em cada variedade, também visível na figura 15.



**Figura 15 - Características e alterações morfológicas das plantas, vagens e grãos produzidos na variedade comercial (CV) e nas variedades locais (L1, L2, L3 e L4) no tratamento hídrico de controlo (WW) e de défice hídrico (WD). (Fotografias do autor)**

#### 4.1.2 Floração e desenvolvimento das vagens

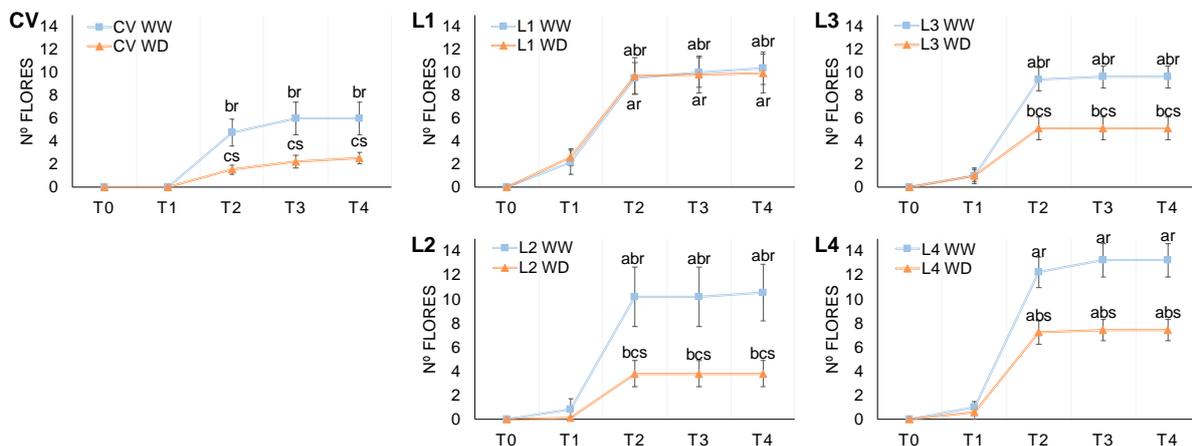
A seca afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas, podendo levar à redução da produção de flores e obtenção de menos grãos, bem como a constrangimentos no enchimento e dimensão dos grãos (Farooq et al. 2009). No feijão-frade (*V. unguiculata*) é

relatada uma maior suscetibilidade ao défice hídrico na fase da floração e enchimento das vagens, causando o aborto de flores, queda de vagens e redução do enchimento dos grãos (Mwale et al. 2017).

Relativamente ao número médio de flores abertas por planta (Gráfico 3), observaram-se padrões distintos. Em WW CV apresentou menor número de flores que as variedades locais (55 %), assim como em WD (38 %). Com a seca o número de flores reduziu em todas as variedades à exceção de L1 onde o défice hídrico não teve impacto. Nas variedades locais registaram-se reduções de floração entre 44 e 64 % a partir de T2, com valores médios de 10-13 flores para WW e 4-7 flores em WD.

A seca não afetou o início da floração em nenhuma das variedades (Gráfico 3), observando-se uma maior precocidade nas variedades locais (em WW e WD) relativamente a CV que floresce ca. 10 dias mais tarde. A floração precoce é relatada por diversos autores como uma das principais estratégias de fuga à seca terminal em lentilhas e grão-de-bico (Saxena et al. 1993; Silim and Saxena 1993). Neste estudo esta característica observada nas quatro variedades locais pode refletir a sua maior rusticidade e adaptação a climas mais quentes e secos. Um atraso na floração devido à seca pode causar maiores perdas no rendimento da cultura (Fukai 1999). Não foi o caso neste estudo onde, não se observam diferenças no início da floração em resposta à seca, apenas se observou diferença entre a variedade CV e as locais.

**Gráfico 3 - Desenvolvimento da floração durante a imposição do défice hídrico nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



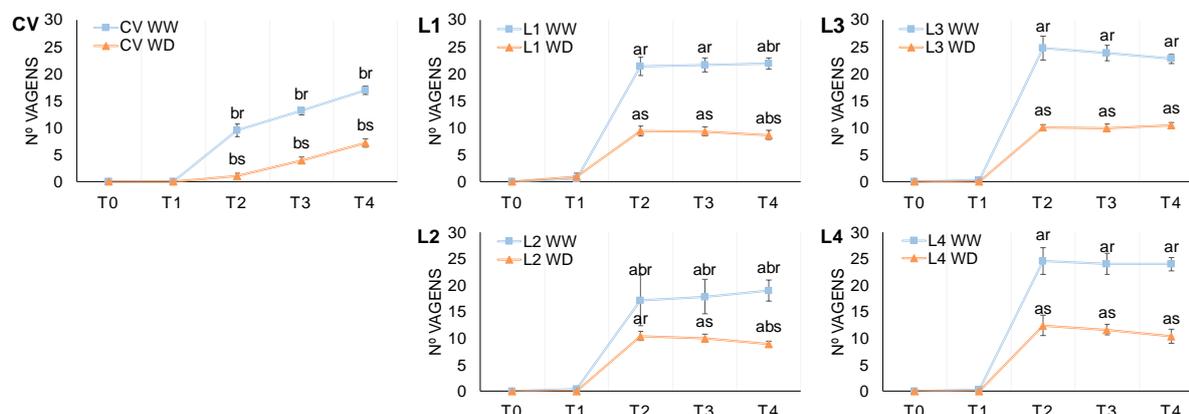
CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Défice hídrico; T0, T1, T2, T3, T4 – 0, 2, 4, 5 e 6 semanas após imposição défice hídrico, respetivamente. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 5 a 10). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

Como já referido, ao contrário das restantes variedades locais, para L1 não foi verificada diferença na floração entre tratamentos (Gráfico 3, L1). Contudo esta manutenção nos valores de floração em seca não se traduziu em padrões semelhantes entre tratamentos para o desenvolvimento de vagens ao longo das observações (Gráfico 4, L1), facto que pode

ser explicado pela abscisão das flores em WD inviabilizando a frutificação, em resposta ao déficit hídrico (Kramer and Boyer 1995; Mwale et al. 2017).

O gráfico 4 expressa o desenvolvimento das vagens e o número médio de vagens obtidas por planta entre T0 e T4 nos diferentes tratamentos e variedades (Gráfico 4).

**Gráfico 4 - Desenvolvimento de vagens durante a imposição do déficit hídrico nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforo hídrico; WD – Déficit hídrico; T0, T1, T2, T3, T4 – 0, 2, 4, 5 e 6 semanas após imposição déficit hídrico, respetivamente. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 5 a 10). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

O início do desenvolvimento de vagens ocorreu mais tarde para CV face às variedades locais (Gráfico 4, CV), em consonância com o observado para o início da floração. Em CV registou-se um aumento gradual da média de vagens por planta entre T2 e T4 (WW) e uma redução média de 72 % de vagens por planta em WD face ao controlo. As 4 variedades locais, por sua vez, apresentaram padrão semelhante entre si, com o desenvolvimento das vagens a ocorrer quase na totalidade entre T1 e T2 (Gráfico 4), registando-se valores médios em T2 entre 17 e 25 vagens por planta para L2 e L3 respetivamente com reduções em WD entre 45 % para L2 e 58 % para L1 face aos respetivos controlos.

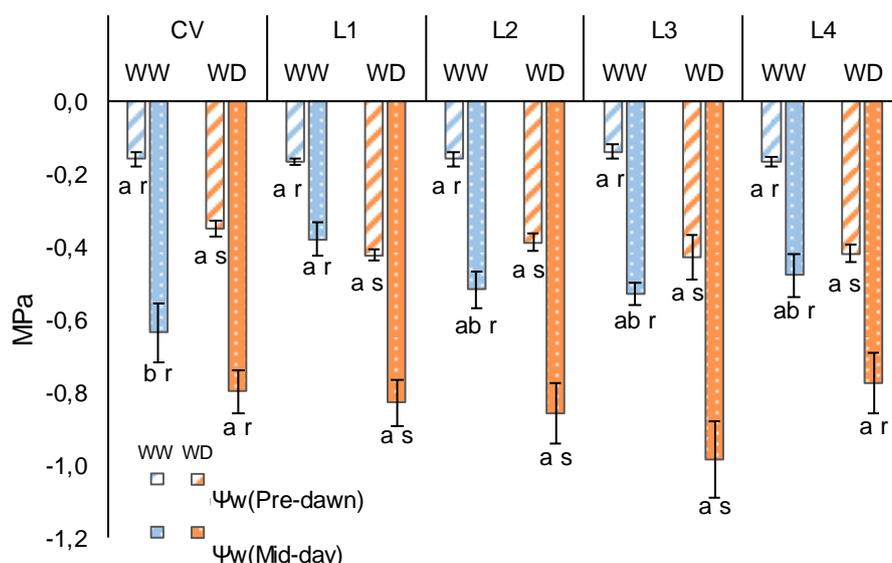
## 4.2 Desempenho fisiológico das plantas em resposta à seca

A avaliação do desempenho das plantas em resposta ao déficit hídrico foi feita através de parâmetros fisiológicos como o teor hídrico relativo (RWC), índice dano membranas (%I), trocas gasosas foliares, eficiência instantânea do uso da água (iWUE), fluorescência da clorofila (Fv/Fm; Fv'/Fm') e teor relativo de clorofila (SPAD), referidos como importantes indicadores de tolerância à seca (Anyia and Herzog 2004; Bahadur et al. 2011).

## 4.2.1 Potencial hídrico

Os valores obtidos para o potencial hídrico de pré-aurora ( $\Psi_{PD}$ ) espelham o stress imposto no tratamento WD (Gráfico 5) com valores entre -0,35 MPa (CV) e -0,43 MPa (L3), face aos valores obtidos nas plantas de WW entre -0,14 MPa (L3) e -0,17 MPa (L4 e L1). Verificaram-se diferenças significativas entre tratamentos para as variedades estudadas, contudo não se observaram diferenças entre variedades para o  $\Psi_{PD}$ , com a menor redução a ser verificada para a variedade comercial.

**Gráfico 5 - Potencial hídrico nas plantas ( $\Psi_{PD}$  e  $\Psi_{MD}$ ) de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Défice hídrico;  $\Psi_w$ (Pre-dawn) – Potencial hídrico pré-aurora;  $\Psi_w$ (Mid-day) – Potencial hídrico ao meio-dia; os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 4 a 5). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

A determinação do potencial hídrico ao meio-dia ( $\Psi_{MD}$ ) reflete a necessidade de um maior fluxo de água causado pelas condições atmosféricas, registando-se uma acentuada diminuição do  $\Psi_{MD}$  face ao  $\Psi_{PD}$ , tanto no tratamento controlo como em défice hídrico. Não se verificaram diferenças significativas entre os valores registados pelas variedades em WD, com valores entre -0,78 MPa e -0,99 MPa, ao contrário do verificado para WW onde foram observados valores entre -0,38 MPa e -0,68 MPa, com a maior redução de  $\Psi_{MD}$  a ser verificada para CV. Em défice hídrico as variedades locais L1, L2 e L3 registaram diferenças significativas em  $\Psi_{MD}$  face ao tratamento em conforto hídrico, com reduções de potencial superiores a 62 %, ao contrário de CV que registou uma diminuição não significativa na ordem dos 25 % (p < 0,05).

O menor valor de  $\Psi_{MD}$  foi encontrado ao meio-dia solar (-0,99 MPa) e o maior foi observado na pré-aurora (-0,35 MPa), valores próximos dos reportados por outros autores para o feijão-frade (Pimentel et al. 1999; Nascimento et al. 2011; Freitas et al. 2017). Freitas

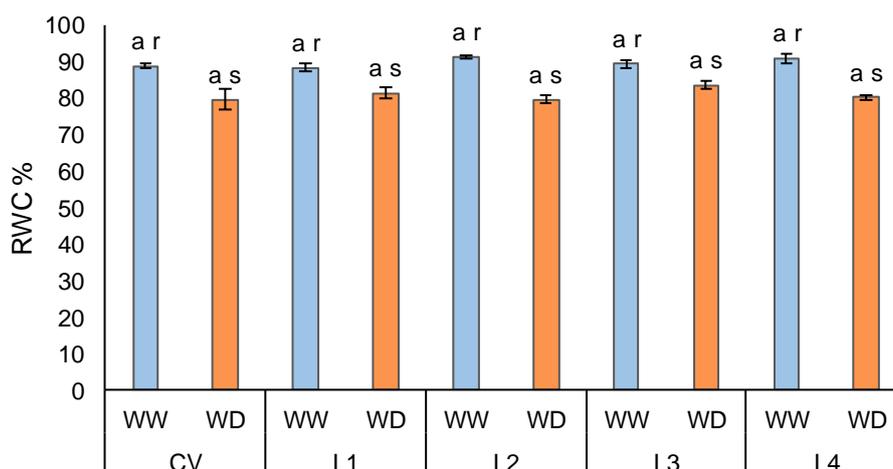
et al. (2017) referem que o feijão-frade é uma cultura que possui um mecanismo de conservação da água, mantendo um potencial hídrico elevado e um controlo estomático eficiente para resistência à seca.

#### 4.2.2 Teor hídrico relativo - RWC

O teor hídrico relativo (RWC) é afetado negativamente por stresses como a seca (Sánchez-Rodríguez et al. 2010; Rai et al. 2015), apresentando-se como um dos parâmetros mais adequados para a avaliação do estado hídrico da planta, uma vez que é obtido em função da hidratação máxima que esta pode apresentar. Moaveni (2011) considera o RWC como melhor indicador do estado hídrico da planta, em comparação com o potencial hídrico alcançado pela planta sob défice hídrico. Sendo a manutenção de um RWC elevado sob condições de stresse característica de resistência à seca (Zegaoui et al. 2017).

As plantas em condições de conforto hídrico (WW) mantiveram o seu RWC na ordem dos 90 % em todas as variedades em estudo (Gráfico 6).

**Gráfico 6 - Teor hídrico relativo (RWC) foliar nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Défice hídrico; RWC % - Teor de água relativo (percentagem); os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 4 a 5). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Não foi verificada qualquer variabilidade entre variedades tanto para WW como para WD. Porém, sob défice hídrico na fase reprodutiva o RWC desceu para valores na ordem dos 80 % para todas as variedades, sendo os maiores decréscimos ocorridos para as variedades L2 e L4, com reduções de 13 % e 12 % respetivamente. As menores reduções ocorreram em L1 (8 %) e L3 (7 %) e, a variedade comercial (CV) apresentou uma redução intermédia (ca. 10 %).

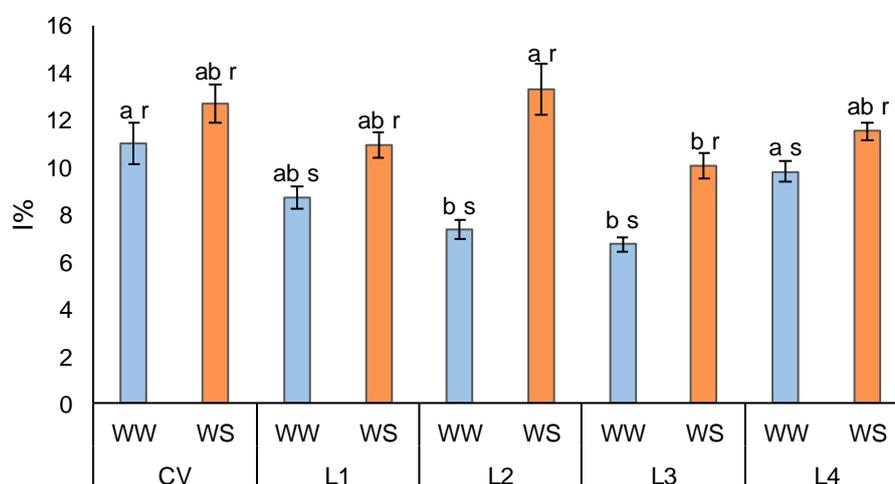
Em todas as variedades observou-se um ligeiro efeito do défice hídrico no RWC das folhas, demonstrando a capacidade desta cultura em manter um teor elevado de água nos tecidos em condições de stresse (Anyia and Herzog 2004).

### 4.2.3 Permeabilidade membranar – fuga de eletrólitos

A fuga de eletrólitos mede a condutividade relativa de íões libertados na água por dano nas membranas celulares e alterações na sua permeabilidade, decorrentes da exposição das plantas aos stresses. O índice de dano membranar (I %) expressa o grau de integridade membranar, sendo um bom indicador na identificação de variedades tolerantes ao déficit hídrico (Lee and Zhu 2010; Singh and Reddy 2011).

Em condições de déficit hídrico, observaram-se valores de I % abaixo dos 14 %, mas ainda assim apresentando diferenças significativas face ao registado nos controlos, no que respeita às variedades locais. Pelo contrário, CV não apresenta diferenças significativas neste parâmetro entre tratamentos, apresentando por sua vez as plantas de controlo (WW) um valor já por si mais elevado, de 11,0 %, em comparação com as variedades locais (Gráfico 7).

**Gráfico 7 - Índice de dano membranar (I %) nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; I % - índice de dano membranar; Os valores apresentados correspondem às médias (n = 4 a 5) com Erro Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

Este parâmetro revela alguma variabilidade entre as variedades em estudo, tanto entre os valores registados no tratamento em conforto hídrico, como no comportamento das diferentes variedades face ao déficit hídrico imposto na fase reprodutiva.

Foram registados aumentos no índice de dano membranar, face ao controlo, entre 15 % e 82 %, revelando a grande amplitude de resultados. O impacto da seca na permeabilidade membranar, em relação ao controlo, foi menor para CV e L4, com um aumento de 15 % para CV e 18 % em L4, partindo de valores de I % em WW de 11,0 % e 9,8 %, respetivamente, contudo apesar de baixo, em L4 esse impacto já se revela significativo. As maiores percentagens de dano membranar em WW também foram registadas para CV e L4.

A variedade local L3 apresenta os menores valores de dano membranar, tanto em WW como em WS, apresentando, porém, um impacto da seca na ordem dos 50 %.

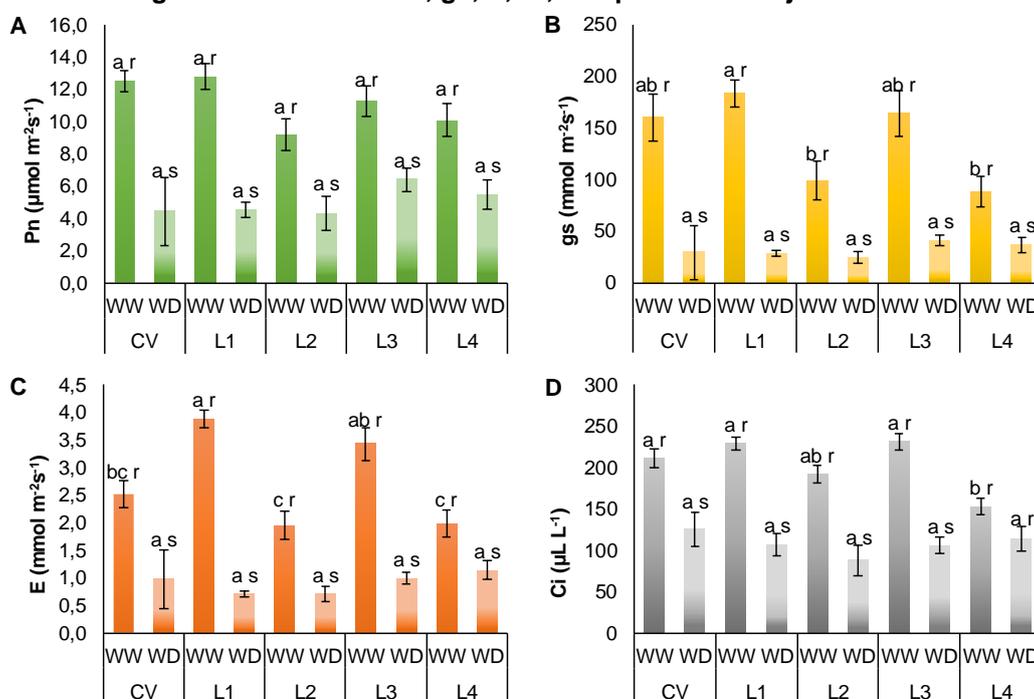
Dentro das variedades em estudo, observamos que os impactos provocados pela seca foram mais notórios para L2, com uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de 82 % em relação ao controlo, atingindo o máximo de dano observado para o défice hídrico de 13,3 %. A capacidade de manter um RWC elevado sob défice hídrico (Gráfico 6) poderá ter evitado danos mais fortes ao nível membranar, como verificado pela análise dos valores de I % (Gráfico 7). Esta relação é confirmada pela variedade L3, que apresenta menor I% e maior RWC sob stresse, e pela variedade L2 que apresenta maior dano membranar e o menor valor de RWC registado.

As membranas biológicas são o primeiro alvo na exposição a stresses abióticos, e a manutenção da sua integridade e estabilidade sob défice hídrico é uma das componentes principais de tolerância à seca (Bajji et al. 2002; Scotti-Campos et al. 2013). Para além de ser uma característica genética, como demonstrado por Dhanda et al. (2004), a integridade membranar é um importante indicador na avaliação de germoplasma tolerante à seca.

#### 4.2.4 Trocas gasosas foliares

Na fase de floração (garantindo 50 % da floração) foram realizadas as medições das trocas gasosas foliares ( $P_n$ ,  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i$ ) e calculada a eficiência instantânea do uso da água (iWUE), expressos nos gráficos 8 e 9.

**Gráfico 8 - Trocas gasosas foliares –  $P_n$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $C_i$ , nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Défice hídrico;  $P_n$  - taxa de fotossíntese;  $g_s$  - condutância estomática;  $E$  – transpiração;  $C_i$  – Concentração interna  $\text{CO}_2$ ; os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE ( $n = 4$  a  $5$ ). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Uma das principais respostas à seca é o fecho estomático (diminuição da condutância estomática,  $g_s$ ), que permite conservar temporariamente o teor de água do mesófilo e assegurar as funções vitais das folhas (Nunes et al. 2022). Porém, esta estratégia também apresenta consequências na produtividade pois se por um lado se reduz a perda de água por transpiração (E), por outro limita o acesso do  $CO_2$  ao interior nas células ( $C_i$ ) e a sua assimilação através da fotossíntese (Pn), reduzindo a produção de biomassa (Chaves 1991; Cornic 2000; Flexas and Medrano 2002; Lawlor 2002; Lawlor and Cornic 2002; Brito et al. 2013; Semedo et al. 2021). A  $g_s$  apresenta assim estreita relação com diversos parâmetros fisiológicos, como  $iWUE$ , Pn, E,  $C_i$  (Ansari et al. 2019), como verificado pelos resultados da correlação de Pearson apresentados na tabela 5.

**Tabela 5 - Tabela com os valores da Correlação de Pearson e significância do tratamento, variedade e sua interação para os resultados das trocas gasosas foliares**

| Correlação Pearson   | Pn<br>( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) | $g_s$<br>( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) | $C_i$<br>( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) | E<br>( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) | $iWUE$<br>( $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)/\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})$ ) |
|--|---|--|-----------------------------------|--|--|
| Pn<br>( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )                              | 1   | 0,952**  | -0,346 <sup>ns</sup>              | 0,851**                                    | 0,488*   |
| $g_s$<br>( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )                             | 0,886**                                       | 1  | -0,070 <sup>ns</sup>              | 0,916**                                    | 0,224 <sup>ns</sup>  |
| $C_i$<br>( $\mu\text{L L}^{-1}$ )  | 0,652**                                       | 0,886**  | 1                                 | -0,005 <sup>ns</sup>                       | -0,727**   |
| E<br>( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )                                 | 0,764**                                       | 0,911**  | 0,854**                           | 1  | -0,086 <sup>ns</sup>   |
| $iWUE$<br>( $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)/\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})$ ) | -0,303 <sup>ns</sup>                          | -0,602**                                       | -0,750**                          | -0,824**                                   | 1  |
| <b>Nível significância</b>   |   |  |                                   |  |  |
| <b>Tratamento</b>  | ***   | ***  | ***                               | ***  | ns   |
| <b>Variedade</b>   | ns  | ns   | ns                                | ns   | ns   |
| <b>Variedade x Tratamento</b>  | ns  | ns   | ns                                | ns   | **   |

A diagonal superior a salmão representa as plantas cultivadas sob condições de estresse hídrico e a diagonal inferior a azul representa as plantas cultivadas sob condições bem regadas. Valores próximos a zero indicam ausência de correlação e valores próximos a um indicam forte correlação entre dois parâmetros, sendo: <sup>ns</sup> – não significativo, \* - significativo ( $p < 0,05$ ), \*\* - muito significativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* - altamente significativo ( $p < 0,001$ ). E a laranja encontram-se representados os efeitos do tratamento, variedade e sua interação nos parâmetros analisados.

Todas as variedades em estudo apresentaram reduções de condutância estomática ( $g_s$ ) significativas sob seca (Figura 8, B), com valores abaixo de  $50 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  resultantes do fecho estomático, e reduções entre 75 e 85 % para CV e restantes variedades locais, com exceção de L4, que apresentou os valores mais baixos de  $g_s$  em WW (ca.  $88 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e por isso também sofreu menor redução com a seca (58 %).

As variedades L1 e L2 apresentam os menores valores de  $g_s$  em seca, contudo não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as variedades (Figura 8, B).

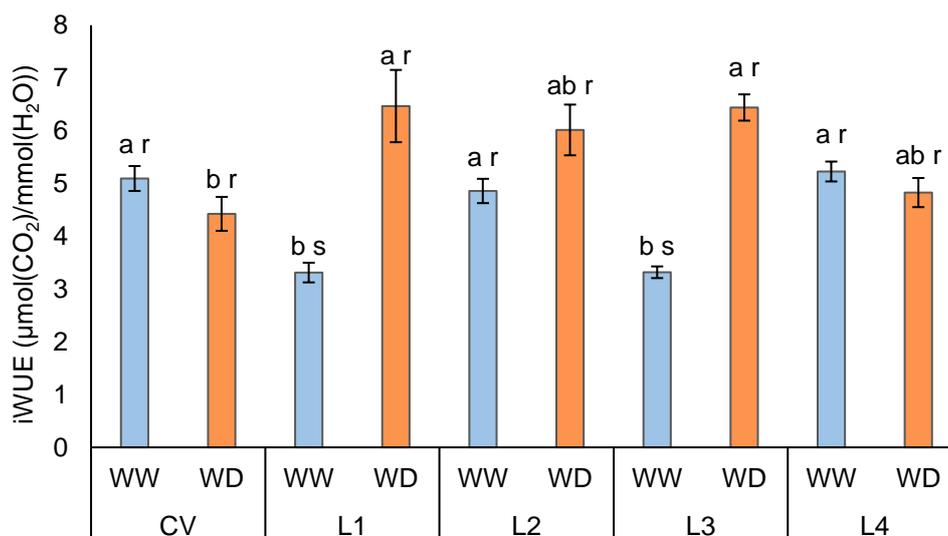
Em consequência dos reduzidos valores de  $g_s$  para L1 e L2, estas variedades apresentaram como esperado, as mais baixas taxas de transpiração (E), registando-se valores de  $0,7 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para ambas, assim como menores concentrações de  $C_i$ , e decréscimos significativos na fotossíntese, que por consequência se traduzem numa maior eficiência instantânea do uso da água ( $iWUE$ ) (Abbate et al. 2004).

Observaram-se decréscimos significativos ( $p < 0,05$ ) de E em todas as variedades (Gráfico 8, C), em resultado do défice hídrico imposto, não havendo, porém, diferenças entre variedades em WD (valores entre 0,7 e 1,1  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Face às plantas em conforto hídrico, a maior redução foi verificada para L1 (82 %), que partiu de um valor de 3,9  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

A mesma homogeneidade dos resultados entre variedades, em resposta ao défice hídrico, foi verificada para Pn, registando-se valores de fotossíntese líquida entre 4,4 e 6,4  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , e como esperado, decréscimos significativos ( $p < 0,05$ ) foram observados face ao controlo, com as menores reduções a serem registadas para L3 e L4 como resultado do seu comportamento em gs, E e Ci. A diminuição observada em Pn sob WD em resposta ao fecho dos estomas (redução de gs) foi mais acentuada que a diminuição observada para Ci, apontando para que a diminuição da fotossíntese sob défice hídrico não resulte somente de limitações estomáticas, em consonância com o referido por Carvalho, Lino-Neto, et al. (2017), que descrevem a presença de outro tipo de limitações à fotossíntese para esta cultura. Uma vez que a redução da fotossíntese é um dos principais efeitos da seca (Wahid and Rasul 2005), poderá refletir-se na diminuição da expansão foliar, danos na maquinaria fotossintética, senescência prematura das folhas e conseqüente redução na produtividade (Boukar et al. 2019; Semedo et al. 2021).

A iWUE (Gráfico 9) indica o balanço entre a assimilação de  $\text{CO}_2$  e a perda de água, à medida que ocorre o fecho estomático, e poderá contribuir para avaliar a tolerância das variedades ao stresse hídrico ao nível ecofisiológico.

**Gráfico 9 - Eficiência instantânea do uso da água (iWUE) nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; iWUE – eficiência instantânea do uso da água; os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 4 a 5). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

As variedades L1 e L3 apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da iWUE quando submetidas a déficit hídrico (Gráfico 9), apresentando valores de 6,5 e 6,4  $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)/\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})$ , respetivamente, em consonância com a redução mais acentuada que se verificou para E. L2 também aumentou iWUE, apesar de não se revelar significativa, ao contrário da CV e L4 que registaram pequenas reduções não significativas face ao controlo, bem como os menores valores de iWUE face às restantes variedades em déficit hídrico (4,4 e 4,8  $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)/\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})$ , respetivamente), acompanhadas de maiores taxas de transpiração (E). (Figure 8, C, D).

Richards (1996) descreveu uma forte correlação entre a eficiência da transpiração e a eficiência do uso da água e conseqüente rendimento em déficit hídrico, levando a que estes parâmetros também sejam avaliados com o objetivo de identificar variedades resistentes à seca.

Entre os parâmetros fisiológicos, o mais sensível ao stresse tende a ser o  $g_s$ , que revela o controlo da abertura estomática, e relatado por diversos autores como sendo a resposta imediata à redução da água no solo em feijão-frade (Silva et al. 2010; Gomes et al. 2020). Este mecanismo de defesa para a conservação da água na planta é uma importante estratégia nesta espécie, fazendo dela uma cultura mais adequada para utilização em regiões semiáridas, onde ocorrem longos períodos sem precipitação, como é o caso das regiões do Mediterrâneo no seu contexto agravado das alterações climáticas (Moreira et al. 2022; Nunes et al. 2022).

Segundo Ansari et al. (2019), a melhoria do rendimento das culturas sob déficit hídrico pode ser alcançada pela combinação de elevadas taxas fotossintéticas com melhor eficiência no uso da água (iWUE). Espécies tolerantes à seca mantêm a iWUE, reduzindo a perda de água, contudo, nos casos em que o crescimento da planta é prejudicado em maior medida, também iWUE pode acompanhar com reduções na eficiência.

A iWUE mostra-se assim como importante parâmetro a avaliar, uma vez que revela diferenças na capacidade de cada variedade utilizar de forma eficiente a água disponível, quando submetida a déficit hídrico (Chaves et al. 2016), capacidade esta fundamental na tentativa de alcançar a sustentabilidade ambiental na produção alimentar (Dow et al. 2014), face ao consumo de um recurso cada vez mais escasso que é a água.

#### **4.2.5 Eficiência Fotossintética ( $F_v/F_m$ ; $F_v'/F_m'$ )**

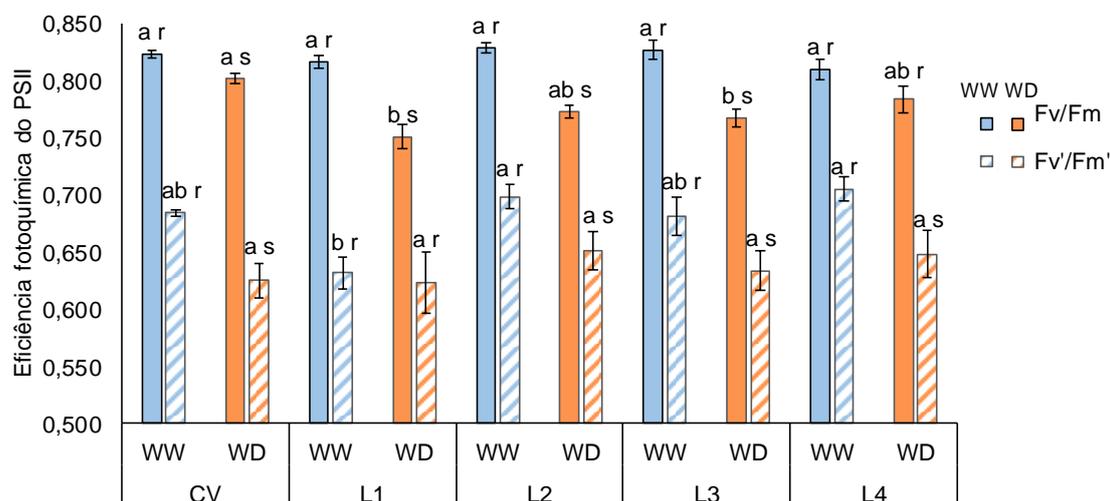
Em conseqüência da exposição a um stresse ambiental as plantas podem apresentar um excesso de energia de excitação ao nível dos pigmentos antena dos fotossistemas, levando a planta a dissipar defensivamente parte dessa energia pela forma de calor. Contudo, quando este mecanismo não é suficiente ocorrem danos nos fotossistemas, danos esses que

podem ser reversíveis ou irreversíveis, como é o caso da fotoinibição e fotoxidação, respetivamente.

A fluorescência da clorofila *a* apresenta-se como indicador de eficiência fotossintética, pela medição de desequilíbrios ocorridos sob défice hídrico entre a captura de luz e a sua utilização (Foyer and Noctor 2000), revelando-se uma ferramenta não destrutiva, rápida e simples na discriminação de variedades tolerantes à seca. Sob défice hídrico, plantas suscetíveis à seca apresentam reduções da atividade do fotossistema II (*Fv/Fm*) em comparação com plantas tolerantes (Bahadur et al. 2011).

Para as variedades em estudo, nenhuma variabilidade foi observada nas plantas correspondentes ao tratamento em conforto hídrico, relativamente à máxima eficiência fotoquímica da conversão de energia pelos centros de reação abertos de PSII em folhas adaptadas ao escuro (*Fv/Fm*), como observado na Figura 10.

**Gráfico 10 - Fluorescência da clorofila *a* (*Fv/Fm* e *Fv'/Fm'*) nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Défice hídrico; *Fv/Fm* – Eficiência fotoquímica máxima do PSII; *Fv'/Fm'* – Eficiência fotoquímica do PSII à luz. Os valores apresentados correspondem às médias (n = 5 a 10) com Erro Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

Foram registados para WW valores entre 0,810 e 0,829, em concordância com o valor de 0,832 unidades relativas, valor este que representa a eficiência fotoquímica teórica máxima. O valor de 0,832 é referido por diversos autores (Björkman and Demmig 1987; Maxwell and Johnson 2000; Nogués and Baker 2000; Hunt 2003) como altamente estável na maioria das espécies vegetais não sujeitas a stresse, indicando que para a produção de uma molécula de O<sub>2</sub> na fotossíntese é necessária a absorção da energia de 9-10 fotões (Hunt 2003).

Para as plantas em défice hídrico foi observado um leve, mas significativo, impacto em resposta à seca, levando a ligeiras diminuições de *Fv/Fm*, não ultrapassando as 0,751 unidades relativas, com exceção de L4 onde a redução não se mostrou significativa. A

variedade local L1 registou o menor valor para este parâmetro ( $Fv/Fm = 0,751$  unidades relativas). Reduções mais acentuadas no valor de  $Fv/Fm$  poderiam indicar dano fotoinibitório elevado ou eventuais danos de fotoxidação no PSII, em consequência de stresses ambientais como a seca (Maxwell e Johnson 2000), uma vez que, como referido por Kalaji e Guo (2008) este é um parâmetro sensível ao desempenho fotossintético da planta.

Por sua vez, em condições fotossintéticas de estado estacionário, para a eficiência fotoquímica real do PSII, de conversão da energia sob exposição à luz ( $Fv'/Fm'$ ) foram observadas leves diferenças entre variedades nas plantas de controlo, mas com diminuição significativa para valores semelhantes sob défice hídrico, valores entre 0,623 e 0,652 para L1 e L2, respetivamente, com exceção de L1. A menor redução face ao controlo, foi então observada para L1 (1,4 %), resultado do já baixo valor verificado em WW. As restantes variedades tiveram reduções entre 6,7 % (L2) e 8,7 % (CV).

Neste sentido, podemos referir que pelos dados obtidos L1 não revela impacto na eficiência fotoquímica real de PSII em resposta à seca, e que as restantes variedades apresentaram, apesar de significativo, um baixo impacto face stresse ambiental em estudo, podendo no limite apresentar leves danos fotoinibitórios reversíveis.

### **4.3 Indicadores bioquímicos de resposta à seca**

Em resposta aos diferentes stresses ambientais as plantas usam diversas estratégias para sobreviver, crescer e se adaptar ao meio, podendo para tal apresentar alterações do perfil bioquímico dos seus tecidos.

#### **4.3.1 Pigmentos Fotossintéticos**

Os pigmentos fotossintéticos presentes nas plantas têm um papel fundamental na captação da radiação solar e sua conversão em energia química, necessária ao seu desenvolvimento (Taiz et al. 2015). Sendo a clorofila *a* o principal pigmento vegetal, os seus teores constituem um indicador da resposta a fatores ambientais abióticos, como a seca, podendo ser determinado por diferentes técnicas. O mesmo acontece com pigmentos acessórios como a clorofila *b* e os carotenóides, presentes no cloroplasto e que ajudam na absorção de luz solar e na proteção das plantas a stresses ambientais, participando em mecanismos de defesa não enzimáticos (Tanan et al. 2017; Barickman et al. 2019; Ali et al. 2021).

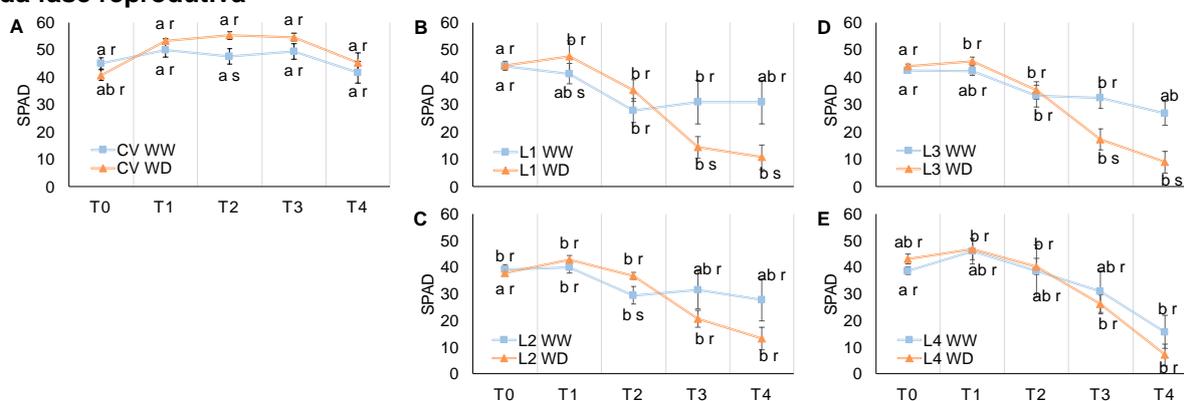
O teor de clorofila pode ser estimado com precisão por extração em solvente orgânico e leitura espectrofotométrica. Contudo a necessidade de avaliar um maior número de génotipos levou ao desenvolvimento alternativo de técnicas mais rápidas, com recurso a

equipamentos portáteis e não destrutivos, permitindo a leitura ao longo do tempo e na mesma folha (Gitelson et al. 2006).

#### 4.3.1.1 Teor relativo de clorofila (SPAD)

No início da imposição do déficit hídrico (T0 – BBCH50, prefloração, 5 semanas após sementeira), as medições de SPAD mostraram não haver diferenças significativas nos teores relativos de clorofila entre tratamentos para cada variedade, registando-se valores entre 38,6 e 45,1 (Gráfico 11).

**Gráfico 11 - Teor relativo de clorofila (SPAD) nas plantas de feijão-frade em WW e WD ao longo da fase reprodutiva**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; T0, T1, T2, T3, T4 – estágios de análise; SPAD – Teor relativo de clorofila; os valores apresentados correspondem às médias ± SE (n = 5 a 10). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

Até T2 (BBCH79 - final do desenvolvimento dos frutos, 9 semanas após sementeira) as plantas em WW e WD, em todas as variedades, apresentaram tendência semelhante, momento a partir do qual se observaram diferenças entre os tratamentos e variedades.

Com a manutenção de valores de SPAD comparáveis entre tratamentos, a variedade comercial (CV) revela não sofrer alterações pela imposição do déficit hídrico entre T0 e T4 (BBCH88 - amadurecimento de cerca de 80 % frutos, 11 semanas após sementeira), apresentando os mais elevados valores de SPAD em todo o período estudado, face às restantes variedades. CV apresentou valores de 41,8 e 45,2 para WW e WD ainda em T4, apresentando-se verde ainda nesta fase do ciclo de crescimento, quando todas as variedades locais já se encontravam em declínio, com valores abaixo de 31,0 em WW e 13,1 em WD. Esta característica de CV sugere que a variedade comercial pode ser mais eficiente no uso da energia (Hayatu and Mukhtar 2010; Fang and Xiong 2015), sugerindo algum grau de resiliência ao déficit hídrico na fase reprodutiva. À medida que o stresse progredia, e com grande evidência a partir de T2, as variedades L1, L2 e L3 mostraram padrão oposto entre tratamentos, com as plantas em déficit hídrico a reduzir em média os valores de SPAD em

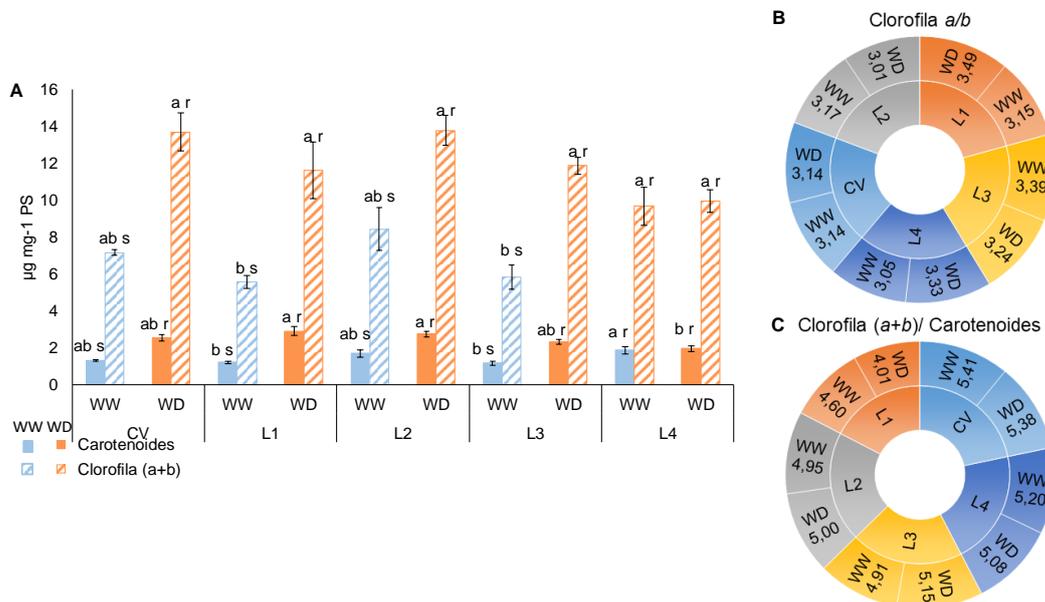
45 % e 61 %, após 5 (T3) e 6 (T4) semanas de seca, respetivamente. Esta diminuição pode ser resultado do stresse oxidativo decorrente do défice hídrico, que se traduz em dano celular e senescência (Lopez et al. 1997).

A variedade L4 comportou-se de forma semelhante a CV, no que toca ao tratamento, não se observando impacto do défice hídrico na planta para este parâmetro, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os valores de SPAD entre tratamentos, entre T0 e T4. Contudo, ao contrário de CV, que permaneceu verde por mais tempo independentemente do tratamento, L4 evidenciou uma senescência mais acelerada, com redução gradual do SPAD entre T2 e T4, registando-se valores médios de 7,1 em WD e 15,6 em WW em T4.

#### 4.3.1.2 Teor de clorofila e carotenóides

Em laboratório e utilizando o método espectrofotométrico, foram determinados os principais teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b* e carotenóides) e suas razões (Gráfico 12).

**Gráfico 12 - Teores de clorofila e carotenóides e suas razões nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



A – Teores de clorofila e carotenóides; B – Razão Clorofila *a* e *b*; C – Razão Clorofila (*a+b*) e carotenóides; CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 4 a 5). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

A clorofila é considerada um dos principais componentes do cloroplasto, e a sua concentração apresenta uma relação positiva com a fotossíntese (Ansari et al. 2019). Por sua vez a seca tem sido associada a lesões significativas nos pigmentos fotossintéticos (Kannan and Kulandaivelu 2011), com a observação da diminuição do teor de clorofila (Din et al. 2011).

Porém, neste estudo o mesmo não foi verificado, em consonância com Pirzad et al. (2011) que descreveu aumentos de clorofila sob déficit hídrico.

Em resultado do déficit hídrico imposto, foi observado um aumento significativo do teor de clorofila ( $a+b$ ) para CV, L1, L2 e L3, com aumentos de 61 % para L2 e entre 91 e 112 % para as restantes variedades, com as maiores concentrações dentro destas variedades, a ocorrerem para L2 tanto em WW ( $8,4 \mu\text{g mg}^{-1}$  PS) como em WD ( $13,8 \mu\text{g mg}^{-1}$  PS) (Gráfico 12A). Foi exceção a variedade L4 onde a seca não apresentou qualquer alteração nos teores de clorofila  $a$ ,  $b$  e ( $a+b$ ), registando-se teores médios de  $9,7 \mu\text{g mg}^{-1}$  PS em controlo e  $9,9 \mu\text{g mg}^{-1}$  PS sob déficit hídrico.

Este aumento ou manutenção observada no teor de clorofila ( $a+b$ ) pode dever-se possivelmente à rápida diminuição do número de folhas perante o déficit hídrico, levando à canalização de recursos de forma mais eficiente para as folhas que se mantêm em funcionamento. Neste sentido, Fang e Xiong (2015) referem que plantas que conseguem manter o teor de clorofila mais alto sob condições de seca podem ser consideradas como mais eficientes no uso da energia da luz, sugerindo maior resistência à seca.

Por sua vez os carotenóides fazem parte dos mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos (Ansari et al. 2019). Os resultados denotam um incremento notório no teor de carotenóides em todas as variedades, registando-se aumentos entre 63 % (L2) e 141 % (L1), comparativamente às respetivas plantas de controlo com exceção de L4 onde não se observaram diferenças significativas entre tratamentos e que em controlo apresentou um teor de carotenóides mais elevado ( $1,9 \mu\text{g mg}^{-1}$  PS) que as restantes variedades (Gráfico 12A).

Este aumento observado sugere a mobilização de carotenóides como mecanismo foto-protetor pela planta sob déficit hídrico, em resposta a possíveis danos no aparelho fotossintético, uma vez que os carotenóides são referidos como essenciais para a fotoproteção da fotossíntese, desempenhando um papel importante durante o crescimento da planta sob stresses abióticos como a seca (Ansari et al. 2019).

Tanto a clorofila  $a$  como a clorofila  $b$  são componentes das membranas dos cloroplastos e encontram-se na razão aproximada de 3:1 (Lichtenthaler et al. 1981). Contudo, a razão clorofila  $a/b$  varia em função da exposição foliar a ambientes ensolarados, registando-se valores de 3,2 a 4,0, ou de sombra, com valores entre 2,5 e 2,9 (Lichtenthaler 1987).

Os resultados obtidos para esta razão (Figura 12 B) não revelaram alterações significativas entre os tratamentos hídricos em estudo (WW e WD) registando-se valores para a razão da clorofila  $a/b$  em WD entre 3,0 (L2) e 3,5 (L1) e entre 3,1 (L4) e 3,4 (L3) em WW, demonstrando também que todas as plantas se encontravam sob uma boa e semelhante exposição solar. Da mesma forma, a razão clorofila ( $a+b$ ) e carotenóides não foi alterada pela exposição ao déficit hídrico, uma vez que o aumento de carotenóides também foi acompanhado de um aumento da clorofila (Figura 12 C).

### 4.3.2 Açúcares solúveis foliares

Uma das estratégias de tolerância a stresses, como a seca, pode ser a superprodução de diferentes tipos de solutos orgânicos (Serraj and Sinclair 2002), compostos solúveis de baixo peso molecular, geralmente não tóxicos, mesmo em altas concentrações. Este mecanismo de ajuste osmótico protege a planta sustentando as relações hídricas necessárias ao metabolismo celular, contribuindo para a desintoxicação de ROS e estabilização das membranas, enzimas e proteínas. Estão incluídos nestes compostos orgânicos, entre outros, os açúcares, que ao aumentarem sob déficit hídrico levam à diminuição do potencial osmótico da célula, atraindo água de forma a ajudar na manutenção da turgescência da célula (Farooq et al. 2009).

O déficit hídrico leva à alteração dos teores de açúcares solúveis (sacarose, glucose e frutose), sendo por isso a sua quantificação também um importante indicador dos impactos dos stresses nas plantas (Chaves and Oliveira 2004) e possíveis implicações na produção e qualidade do grão. De uma forma geral, a seca leva ao aumento dos açúcares solúveis e diminuição do teor de amido (Chaves 1991), por seu turno em seca extrema estes valores podem estar invertidos (Pinheiro et al. 2001). A sacarose e a glucose atuam como substrato para a respiração celular ou como osmólitos para manter o potencial osmótico celular (Gupta and Kaur 2005).

Os resultados obtidos para a quantificação de açúcares solúveis (Tabela 6) mostram aumentos (apesar de nem sempre significativos) das concentrações de sacarose, glucose e frutose, expressas em função do seu peso seco, sob WD para CV, L1 e L3, sugerindo que estas moléculas podem estar a funcionar como osmoprotetores.

**Tabela 6 - Teores de açúcares solúveis foliares nas plantas de feijão-frade em WW e WD expresso em função do seu peso seco**

| Variedade  |    | Açúcares solúveis folha (mg g <sup>-1</sup> PS) |             |             |               |
|------------|----|---|-------------|-------------|---------------|
| Tratamento |    | Sacarose  | Glucose     | Frutose     | Soma*         |
| CV         | WW | 31,5±2,5 br                                     | 14,6±0,8 as | 5,6±0,7 bs  | 51,7±3,1 bs   |
|            | WD | 40,1±3,1 ar                                     | 30,7±3,1 ar | 13,2±2,0 ar | 84,0±6,9 ar   |
| L1         | WW | 38,9±2,4 abr                                    | 17,1±3,1 ar | 8,2±1,4 ar  | 64,2±4,4 abs  |
|            | WD | 48,2±4,6 ar                                     | 24,3±2,5 ar | 9,7±1,1 ar  | 82,2±4,7 ar   |
| L2         | WW | 55,2±5,2 ar                                     | 22,2±2,1 ar | 9,6±1,1 ar  | 87,0±6,9 ar   |
|            | WD | 43,6±1,1 ar                                     | 23,2±3,0 ar | 12,7±1,7 ar | 79,5±4,8 ar   |
| L3         | WW | 37,5±0,7 br                                     | 12,8±0,6 as | 6,9±0,5 as  | 57,2±1,3 abs  |
|            | WD | 44,4±4,9 ar                                     | 26,9±1,4 ar | 16,7±1,4 ar | 88,0±4,4 ar   |
| L4         | WW | 39,5±5,8 abr                                    | 23,3±4,8 ar | 12,5±2,4 ar | 75,3±12,5 abr |
|            | WD | 38,4±0,8 ar                                     | 28,0±2,2 ar | 13,1±1,5 ar | 79,6±3,9 ar   |

\*Soma - Soma da sacarose, glucose e frutose; CV - variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD - Déficit hídrico. Os valores apresentados correspondem às médias ± SE (n = 4 a 5). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

Para a glucose e frutose foi registado um aumento significativo face ao controlo para CV e L3, com aumentos no teor foliar de glucose de 110 % para ambas as variedades, com a maior concentração deste açúcar sob WD a ser regista para CV (30,7 mg g<sup>-1</sup> PS). Para a frutose registaram-se aumentos de 135 % (CV) e 142 % (L3) sob WD, sendo neste caso o maior teor a ser encontrado para a variedade L3 (16,7 mg g<sup>-1</sup> PS).

Níveis mais altos de sacarose também são conhecidos por aumentar a resistência mecânica da parede celular, de forma a minimizar a perda de água e a desidratação celular, revelando-se características cruciais para as plantas resistirem e recuperarem da seca (Wang et al. 2016). Além disso, os hidratos de carbono também podem desempenhar um papel importante na eliminação de radicais hidroxilo, atuando contra o stresse oxidativo, nomeadamente os RFOs (oligossacarídeos da família rafinose) (Rejšková et al. 2007).

As variedades CV, L1 e L3 também registaram aumentos para a sacarose embora não significativos na ordem dos 27 % (CV), 24 % (L1) 18 % (L3) face ao WW, registando-se uma concentração máxima sob WD observada em L1 com 48,2 mg g<sup>-1</sup> PS. A manutenção ou aumento do teor de sacarose foi relacionado com uma maior tolerância das plantas face à seca (Praxedes et al. 2006), como verificado pelos resultados obtidos, com exceção da variedade L2, onde apesar de não se revelar significativo, manifesta uma tendência de redução na ordem dos 21 % face ao controlo.

L2 e L4 não apresentaram alterações significativas nas concentrações de açúcares solúveis foliares, como verificado também no somatório dos açúcares quantificados.

Por outro lado, não se verificou grande variabilidade nos teores de açúcares solúveis foliares entre as variedades, destacando-se CV por apresentar as menores concentrações de sacarose e frutose em WW em comparação com as variedades locais.

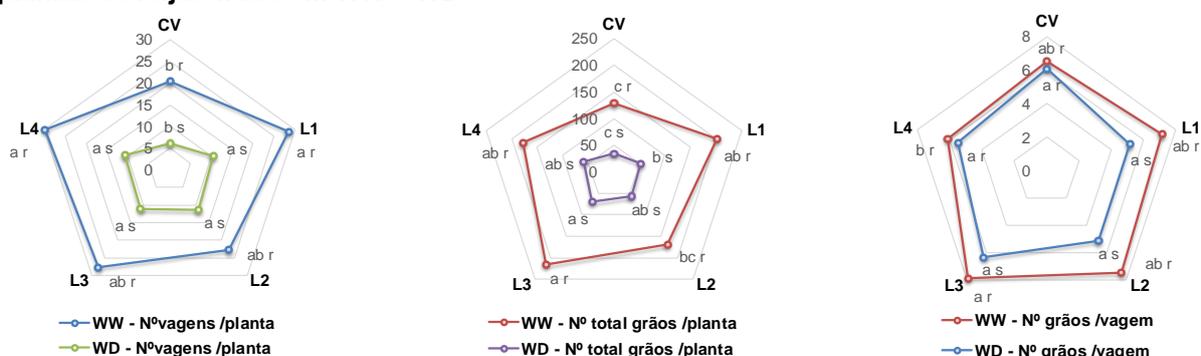
#### **4.4 Impacto da seca nos parâmetros agrónómicos – indicadores da produção**

A diminuição dos recursos hídricos em resultado da poluição, práticas agrícolas desajustadas e alterações climáticas, entre outras, resultam numa preocupação crítica para a produtividade e economia agrícola (Jaleel et al. 2009; Ansari et al. 2018), dificultando assim a tarefa de assegurar a segurança alimentar face ao crescente aumento populacional e disponibilidade de alimentos no futuro (Battisti and Naylor 2009; Ansari et al. 2019). Por seu turno, a capacidade de uma cultura suportar um stresse como a seca depende da sua capacidade de sobrevivência, mas apresenta ainda mais impacto no seu potencial de rendimento e qualidade (Ansari et al. 2019).

O défice hídrico e as diferentes respostas das plantas a esse stresse abiótico resultaram em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros de produção avaliados (Gráficos 13 e 14), com exceção do peso do grão, onde não se verificaram diferenças entre

tratamentos para o peso de 100 grãos (Gráfico 14 B), e com CV a registar grãos com maior massa, registrando-se uma média de 22,3 g para o peso de 100 grãos em CV contra uma massa média de 14,7 g para as variedades locais (Figuras 14 B).

**Gráfico 13 - Número de vagens e grãos por planta e número de grãos por vagem obtidos nas plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; os valores apresentados correspondem às médias (n = 5 a 10). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Foi assim evidente o impacto da seca tanto no número total de vagens por planta como no número total de grãos por planta (Gráfico 13) em todas as variedades em estudo, registrando-se decréscimos médios de 61 % e 69 %, respetivamente. O número de grãos por vagem não foi alterado em CV e L4 em consequência do déficit hídrico imposto, ao contrário das restantes variedades (Gráfico 13).

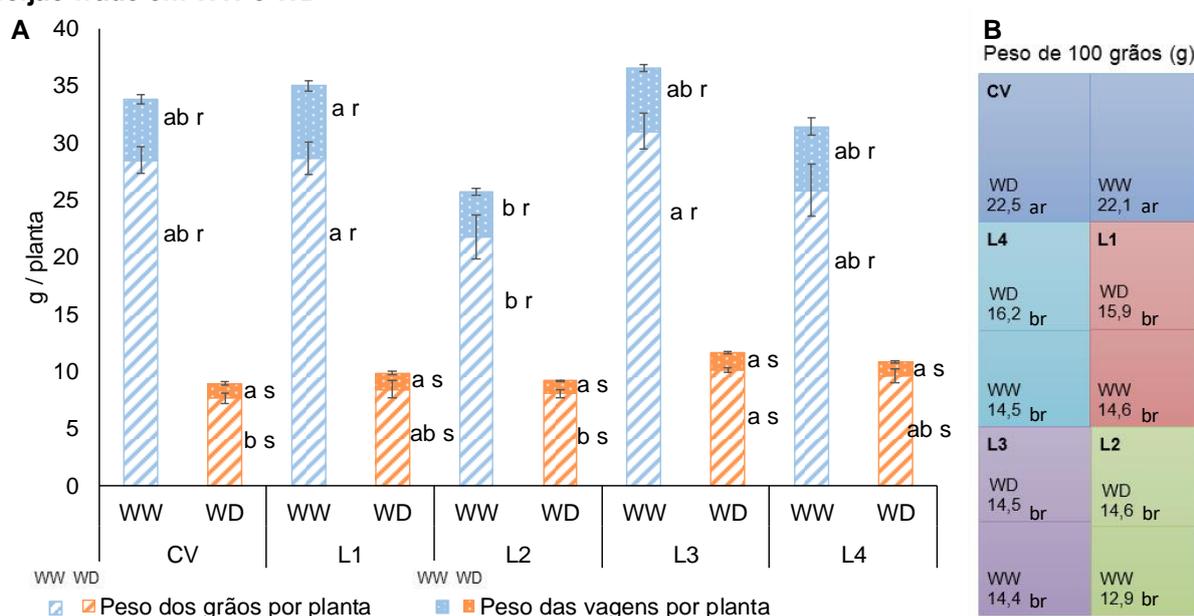
O número de vagens por planta é uma das principais características agronómicas associadas ao potencial de rendimento da planta de feijão-frade (*V. unguiculata*) (Gerrano et al. 2022). A variedade comercial, para ambos os tratamentos, apresentou o menor número de vagens (20 vagens por planta em WW e 6 vagens por planta em WD) e grãos por planta (129 grãos por planta em WW e 35 grãos por planta em WD), contudo estes valores foram compensados pela produção de grãos com uma massa maior (Gráfico 14 B), o que resultou numa produtividade total de 28,5 g/planta em WW e 7,6 g/planta em WD (Gráfico 14 A), produtividades estas semelhantes ( $p < 0,05$ ) ao registado para as variedades locais L1, L3 e L4 em WW e a L1, L2 e L4 em plantas sujeitas a déficit hídrico na fase reprodutiva.

O número de grãos por vagem (NGV) determina o potencial de rendimentos da cultura, a par com outras características como o peso de 100 grãos (Gerrano et al. 2022), não se tendo verificado diferenças significativas pela exposição à seca no NGV em CV e L4. Contudo, tal não se traduziu diretamente em melhores rendimentos, uma vez que L3 apesar de apresentar redução significativa face ao stresse no NGV, apresentou médias ligeiramente superiores em comparação com as restantes, tanto em WW como em WD, destacando-se assim ligeiramente no rendimento.

A menor produtividade em plantas em conforto hídrico (WW) foi então registada para L2 (21,8 g/planta) e a maior em L3 (31,0 g/planta). Em resposta à seca, o maior rendimento foi obtido pela variedade local L3 (10,1 g/planta) e a menor, curiosamente, foi registada para CV.

Foram registados decréscimos de produtividade em WD de 63 % para L2 e L4, 67 % em L3, 71 % em L1 e 73 % para CV, resultados estes em linha com os observados por diversos autores (Ahmed and Suliman 2010; Bastos et al. 2011; Munjonji et al. 2018; Boukar et al. 2019).

**Gráfico 14 - Peso dos grãos e das vagens por planta e peso de 100 grãos obtidos das plantas de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 5 a 10). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

No geral, foi possível observar que a variedade local L3 se destacou nos parâmetros produtivos face a CV, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em déficit hídrico para o número de grãos por planta (L3 = 70 grãos/planta, CV = 35 grãos/planta), número de vagens por planta (L3 = 11 vagens/planta, CV = 6 vagens/planta) e peso total de grãos por planta (L3 = 10,1 g/planta, CV = 7,6 g/planta). Estes valores, sugerem um menor impacto da seca nesta variedade local, tendo em conta somente estes parâmetros produtivos.

Foi então notória a diminuição da produção em todas as variedades sob déficit hídrico, corroborando o facto de o stresse ocorrido na fase reprodutiva (desde a floração até ao enchimento das vagens) ter grande impacto a nível produtivo no feijão-frade (Delmer 2005; Pushpavalli et al. 2015). Destaca-se como exceção o número de grãos por vagem (Hamidou et al. 2007) como verificado para CV e L4 (Gráfico 13).

Como já referido, e como verificado pelo gráfico 14 B, CV distingue-se das restantes variedades quanto ao P100G, apresentando valores significativamente maiores (22,5 g WW e 22,1 g WD). Não foram registadas diferenças significativas no P100G entre as variedades locais, nem se registaram diferenças face ao tratamento hídrico imposto. Contudo, e tendo em conta a escala proposta por Shimelis e Rakshit (2005) todas as variedades em estudo, incluindo a CV apresentam grãos pequenos, independentemente do regime hídrico.

A diminuição no enchimento do grão pode estar associada à redução da atividade das enzimas de síntese do amido e decorrente decréscimo na acumulação de sacarose, como sugerido por Farooq et al. (2009). Este não parece ser o caso uma vez que estas variedades mantiveram o peso de 100 grãos sob seca, e a diminuição no teor de sacarose nas folhas não se verificou de forma significativa.

Deikman et al. (2012), sugerem que estratégias/respostas da planta face ao stresse, como a redução do tamanho da planta e biomassa, assim como a baixa condutância estomática, podem explicar em grande parte a redução da produtividade.

A seleção tendo em conta parâmetros agronómicos relacionados com o rendimento, pode ajudar na melhoria do rendimento (Kamara et al. 2011), uma vez que existe uma associação positiva entre esses parâmetros agronómicos e a produção (Shanko et al. 2014; Edematie et al. 2021; Mbuma et al. 2021). Neste sentido os coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de produção e de rendimento agronómico estão apresentados na tabela 7.

**Tabela 7 - Valores da correlação de Pearson e nível de significância do tratamento, variedade e sua interação nos parâmetros agronómicos avaliados**

| Correlação Pearson            | NVP     | NGV                  | NGP                 | PGP                 | PVP                  | P100G                |
|-------------------------------|---------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| NVP                           | 1       | -0,378*              | 0,722**             | 0,615**             | 0,478**              | -0,568**             |
| NGV                           | -0,334* | 1                    | 0,270 <sup>ns</sup> | 0,277 <sup>ns</sup> | -0,119 <sup>ns</sup> | -0,088 <sup>ns</sup> |
| NGP                           | 0,749** | 0,330*               | 1                   | 0,802**             | 0,382*               | -0,751**             |
| PGP                           | 0,574** | -0,034 <sup>ns</sup> | 0,593**             | 1                   | 0,640**              | -0,286 <sup>ns</sup> |
| PVP                           | 0,701** | -0,234 <sup>ns</sup> | 0,554**             | 0,754**             | 1                    | 0,041 <sup>ns</sup>  |
| P100G                         | -0,335* | -0,412*              | -0,592**            | 0,276 <sup>ns</sup> | 0,106 <sup>ns</sup>  | 1                    |
| <b>Nível significância</b>    |         |                      |                     |                     |                      |                      |
| <b>Tratamento</b>             | ***     | ***                  | ***                 | ***                 | ***                  | ns                   |
| <b>Variedade</b>              | ***     | *                    | ***                 | ***                 | ***                  | ***                  |
| <b>Variedade x Tratamento</b> | ns      | ns                   | **                  | **                  | *                    | ns                   |

NVP – Número de vagens por planta; NGV – Número de grãos por vagem; NGP- Número de grãos por planta; PGP – Peso dos grãos por planta; PVP – Peso das vagens por planta; P100G – Peso de 100 grãos. A diagonal superior a salmão representa as plantas cultivadas sob condições de stresse hídrico e a diagonal inferior a azul representa as plantas cultivadas sob condições bem regadas. Valores próximos a zero indicam ausência de correlação e valores próximos a um indicam forte correlação entre dois parâmetros e a laranja encontram-se representados os efeitos do tratamento, variedade e sua interação nos parâmetros analisados, sendo: <sup>ns</sup> – não significativo, \* - significativo (p < 0,05), \*\* - muito significativo (p < 0,01), \*\*\* - altamente significativo (p < 0,001).

Como referido por alguns autores (Mohammed et al. 2010; Stoilova and Pereira 2013; Carvalho, Bebeli, et al. 2017) um dos parâmetros agronômicos mais importantes para a produção de grãos em feijão-frade é o número de vagens por planta. Neste trabalho obteve-se uma correlação positiva do número de vagens por planta com o número de grãos por planta (WW –  $r = 0,749$ ,  $p < 0,01$ ; WD –  $r = 0,722$ ,  $p < 0,01$ ) e com o peso dos grãos por planta (WW –  $r = 0,574$ ,  $p < 0,01$ ; WD –  $r = 0,615$ ,  $p < 0,01$ ), indiciando que a seleção para um aumento do número de vagens por planta favorece o peso de grãos por planta e por consequência a produtividade da planta. Já o número de grãos por planta apresenta correlação negativa com o peso de 100 grãos ( $r = -0,592$ ,  $p < 0,01$  para WW;  $r = -0,751$ ,  $p < 0,01$  para WD) indicando que a seleção para um aumento do número de grãos pode implicar uma redução no peso de 100 grãos. Como já referido e reforçado pela análise da tabela 7 o tratamento teve impacto em todos os parâmetros agronômicos avaliadas, com exceção do P100G.

#### **4.5 Impacto da seca na qualidade do grão de feijão-frade (Cor, Açúcares solúveis e Proteína bruta)**

Dada a sua vasta distribuição geográfica, o feijão-frade (*V. unguiculata*) caracteriza-se por uma variabilidade morfológica significativa e grande capacidade de adaptação a diversos ambientes, o que resulta numa vasta gama de variedades locais (OECD 2015).

A composição nutricional do feijão-frade é a expressão de fatores genéticos, mas também resultado das condições agroclimáticas, exposição a stresses bióticos e abióticos, colheita, pós-colheita e condições de conservação e armazenamento (Oluwatosin 1998; Silveira et al. 2001; Murdock et al. 2003; Gonçalves et al. 2016). Contudo, mesmo sob influência dos fatores referenciados, o feijão-frade apresenta-se como alimento altamente nutritivo e com potenciais benefícios para a saúde, dado o seu alto teor proteico e fibra, acompanhado de um índice glicémico baixo (Carnovale et al. 1991; Siddhuraju and Becker 2007; Sreerama et al. 2012; Xu and Chang 2012; Aguilera et al. 2013; Xiong et al. 2013). Neste trabalho, de forma a avaliar o impacto da seca na qualidade do grão de feijão-frade obtido, foram avaliadas a cor, o teor de açúcares solúveis e proteína bruta do grão.

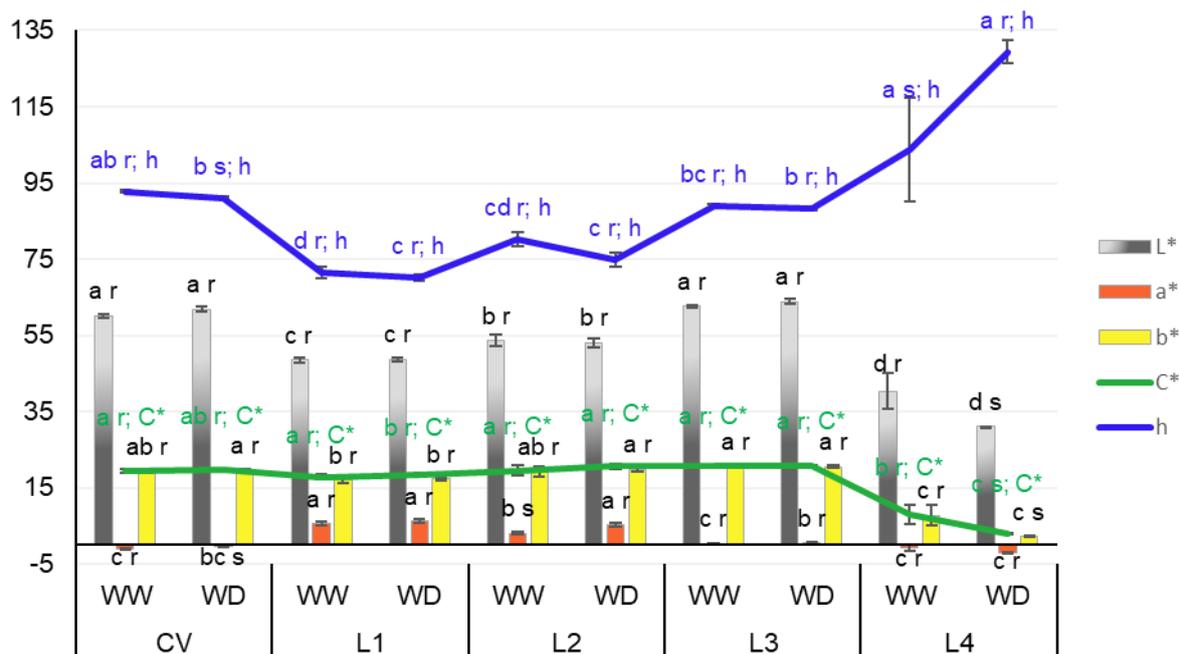
##### **4.5.1 Cor do grão**

A aparência de um alimento é um indicador chave da sua qualidade e que pode determinar a sua aceitação pelo consumidor (Culver and Wrolstad 2008), sendo por isso um fator importante, tanto para o consumidor como para o produtor. Neste sentido a cor do grão de feijão-frade é uma característica física e comercial importante, dada a diversidade de cores de grão existentes, sendo essa cor definida pelos pigmentos contidos no tegumento, devidos

à presença de compostos fenólicos. Por outro lado, fatores como a variedade, a composição química, o tipo e duração do armazenamento, entre outros, podem influenciar a cor dos grãos (Shimelis and Rakshit 2005).

No gráfico 15 estão apresentados os resultados dos parâmetros colorimétricos dos sistemas  $CIE L^*a^*b^*$  e  $CIE L^*C^*h^*$  das 4 variedades locais e da CV analisados, nos 2 tratamentos hídricos em estudo (WW e WD).

**Gráfico 15 - Análise colorimétrica dos grãos de feijão-frade obtidos em WW e WD pelo sistema  $CIE L^*C^*h^*$  e  $CIE L^*a^*b^*$**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; L\* - Luminosidade; a\* - verde (-) ao vermelho (+); b\* - azul (-) ao amarelo (+); C\* - Cromaticidade; h° - ângulo hue. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  SE (n = 5 a 10). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

A cor, enquanto parâmetro de caracterização física de um alimento e como indicador de qualidade do mesmo, progride de forma diferente dependendo da variedade e do parâmetro de cor em causa. Assim, como esperado, e pelas diferenças verificadas visualmente, a análise de variâncias demonstrou a existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes variedades para todos os parâmetros colorimétricos.

Os valores médios de  $L^*$ , escala entre preto e branco, apresentam diferenças significativas entre todas as variedades, apresentando as cores mais escuras um valor de 40,3 (WW) e 31,1 (WD) para a variedade L4 e no oposto, correspondendo a cores mais claras valores de 62,7 (WW) e 63,9 (WD) para a variedade L3, com exceção de CV e L3 que são semelhantes quanto à luminosidade. Este valor de luminosidade, dependendo dos valores de

$a^*$  e  $b^*$ , corresponde à definição de cores mais claras (maior luminosidade) ou cores mais escuras (menor luminosidade) dentro da escala de cores em que se encontrarem.

Na escala de cromaticidade  $a^*$  verificamos valores negativos e/ou próximos de zero para as variedades CV, L3 e L4, afastando-as da cor vermelha, e mais próximos da escala de  $L^*$  entre branco e preto. As variedades L1 e L2 apresentam valores positivos entre 3,1 (WW) e 5,2 (WD) em L2 e 5,7 (WW) e 6,3 (WD) para L1, indicando uma ligeira movimentação para cores mais avermelhadas.

Para a componente de cromaticidade  $b^*$ , que representa a variação de coloração entre o azul para valores negativos e o amarelo para valores positivos, CV, L1, L2 e L3 apresentaram valores próximos, situando-se entre 16,9 (L1) e 20,6 (L3) para WW e 17,3 (L1) e 20,6 (L3) para WD, correspondendo a uma coloração ligeiramente mais amarela. Com diferenças significativas quanto às restantes variedades encontra-se L4, apresentando valores mais baixos, mas ainda positivos de 7,8 (WW) e 2,3 (WD).

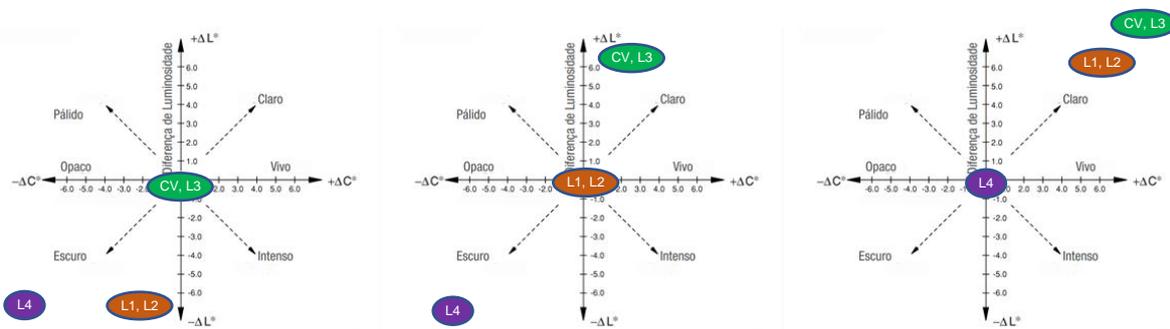
No geral, e tendo em conta as coordenadas  $L^*a^*b^*$ , podemos observar que a variedade mais distinta das restantes quanto à cor é L4, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para  $L^*$  e  $b^*$  face às restantes variedades, apresentando uma coloração mais próxima da gama dos pretos.

As variedades CV e L3 são semelhantes quanto às coordenadas  $L^*a^*b^*$ , situando-se numa coloração mais próxima do branco para  $L^*$  e  $a^*$  e com uma ligeira coloração creme dada pelos valores de  $b^*$ . A diferença total de cor ( $\Delta E$ ) entre estas duas variedades foi de 6,28 (WW), o que de acordo com a escala de Yamauchi 1989, citado por Yousif (2014) corresponde a uma diferença perceptível ao olho humano, com tonalidades correspondentes ao mesmo grupo de cores.

Por outro lado, as variedades L1 e L2 apresentam valores próximos para  $a^*$ , apresentando cores tendencialmente mais avermelhadas, e para  $b^*$  com ligeira coloração amarela, já o valor de  $L^*$  dá-nos a indicação da menor luminosidade para L1, correspondendo a um padrão mais escuro para L2. L1 e L2 apresentaram uma diferença total de cor ( $\Delta E$ ) mais baixa que a registada para CV e L3, contudo ainda apreciável e facilmente visualizada, com um valor de  $\Delta E$  de 3,05.

Como esperado, face aos resultados da avaliação das coordenadas  $L^*a^*b^*$  e das características perceptíveis a olho nu, observam-se 3 grupos de cores diferentes, com resultados de  $\Delta E$  superiores a 12 entre eles, correspondendo um grupo a CV e L3, com coloração mais creme e luminosidade mais próxima do branco que as restantes (cores mais claras). L1 e L2 formam outro grupo com uma coloração mais avermelhada e luminosidade intermédia, e por último a variedade L4 afasta-se com uma luminosidade menor, logo cores mais escuras, assim como valores de  $a^*$  e  $b^*$  mais próximos do zero aproximando esta variedade da escala dos pretos.

Analisando o valor da cromaticidade ( $C^*$ ) que representa a saturação da cor, descrevendo cores mais opacas ou vivas, em conjunto com os resultados da luminosidade ( $L^*$ ), e tendo em conta diferenças ( $\Delta C$  e  $\Delta L$ ) entre os grupos de cores encontrados pela análise de  $L^*a^*b^*$  descrita anteriormente, e como esquematizado na figura 16, verificamos que face a L4, L1 e L2 apresentam cores mais claras e mais vivas ( $\Delta C = 10,7$ ;  $\Delta L = 10,8$ ), com CV e L3 a distanciarem-se, apesar de não significativos face a L4 ( $\Delta C = 12,0$ ;  $\Delta L = 21,1$ ). Em relação a CV e L3, verificamos que L1 e L2 são variedades com coloração mais escura e ligeiramente mais opaca ( $\Delta C = -1,3$ ;  $\Delta L = -10,3$ ), e L4 apresentando-se bem mais escura e opaca ( $\Delta C = -12,0$ ;  $\Delta L = -21,1$ ). Por sua vez, usando como padrão as variedades L1 e L2, confirmamos que CV e L3 apresentam uma cor mais clara e ligeiramente mais viva ( $\Delta C = 1,3$ ;  $\Delta L = 10,3$ ) e que L4 pelo contrário é bem mais escura e opaca ( $\Delta C = -10,7$ ;  $\Delta L = -10,8$ ).



**Figura 16 - Relação entre os grupos de cores encontrados para as variedades em estudo, de acordo com as diferenças de Croma ( $C^*$ ) e Luminosidade ( $L^*$ ). (Adaptado de "Precise color communication", Konica Minolta (2007))**

Pela análise do ângulo hue ( $h^\circ$ ), que apresenta o ângulo de matiz como uma sombra de acordo com o ângulo na roda de cores de  $360^\circ$ , com um vermelho-púrpura a  $0^\circ$ , a tonalidade amarela a  $90^\circ$ , a tonalidade cinza-verde a  $180^\circ$  e a tonalidade azul a  $270^\circ$ , no sentido anti-horário, verificamos que todas as variedades com exceção de L4 se encontram entre os  $0^\circ$  (vermelho-púrpura) e  $90^\circ$  (amarelo) com valores entre os apresentados pela variedade L1 em WW (71,6) e WD (70,2) e os apresentados para CV em WW (92,8) e WD (91,1). A variedade L4 situa-se entre os  $90^\circ$  (tonalidade amarela) e os  $180^\circ$  (tonalidade cinza-verde) registando valores de 103,9 (WW) e 129,3 (WD).

Tendo em conta os tratamentos, não foram verificadas diferenças significativas pela análise de variâncias ( $p < 0,05$ ) entre WW e WD para as variedades CV, L1, L2 e L3, indicando que o défice hídrico não apresentou impacto na cor destas variedades. O mesmo foi verificado pela análise da diferença total de cor ( $\Delta E$ ) usando como controlo o tratamento (Tabela 8) em conforto hídrico de cada variedade. As variedades L1 e L3 apresentaram  $\Delta E$  de 0,73 e 1,30, respetivamente, indicando diferenças ligeiramente perceptíveis, mas difíceis de distinção pelo olho humano, e as variedades CV ( $\Delta E = 1,77$ ) e L2 ( $\Delta E = 2,35$ ) pela escala Yamauchi sugerem diferenças visíveis, mas só detetadas por pessoas treinadas.

**Tabela 8 - Valores da diferença total de cor ( $\Delta E$ ) das amostras em déficit hídrico face ao controle**

| Variedades | $\Delta E$ |
|------------|------------|
| CV         | 1,77       |
| L1         | 0,73       |
| L2         | 2,35       |
| L3         | 1,30       |
| L4         | 10,84      |

CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico;  $\Delta E$  – diferença total de cor

A variedade L4 pela análise de variâncias apresentou diferenças significativas entre tratamentos para os parâmetros  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^0$ , assim como um valor de  $\Delta E$  de 10,84, revelando grandes diferenças no mesmo grupo de cores. Contudo, e acompanhando os erros padrão mais elevados, que evidencia a grande dispersão de resultados em torno da média para WW para todos os parâmetros estudados, esta diferença poderá não ser devida à influência do déficit hídrico, mas sim à elevada heterogeneidade fenotípica dos grãos desta variedade, composta por grãos com diversos padrões de cor, dentro do mesmo grupo de cores, nomeadamente a cor preta, como verificado na Figura 17.



**Figura 17 - Variação fenotípica observada na variedade L4, em duas plantas em WW (fotografias do autor)**

#### **4.5.2 Açúcares solúveis no grão**

O teor de açúcares solúveis é descrito como importante característica fisiológica/bioquímica, uma vez que tem impacto não só na produção, mas também na qualidade nutricional e de cozimento do grão (Hou, Chen, Shi, et al. 2009; Tchiagam et al. 2011; Ngalamu et al. 2014), sendo também importante para a sua conservação e armazenamento (Teixeira et al. 2012; Weng et al. 2018). Os açúcares presentes podem também afetar o sabor e a cor do grão, características que se alteram posteriormente com o processamento, como por exemplo a cozedura.

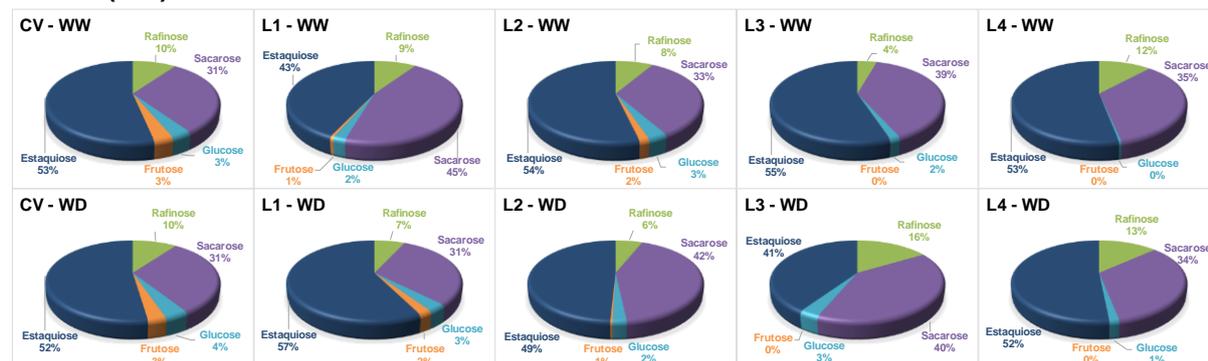
O aumento de açúcar nos grãos tem sido relacionado com o início da tolerância à dessecação durante o desenvolvimento dos grãos (Rosa et al. 2009), uma vez que o aumento

destes açúcares leva ao ajuste osmótico, que é um ótimo mecanismo de resposta fisiológica à seca em leguminosas (Küchenmeister et al. 2013).

As variedades de grão de feijão-frade apresentam sabores ligeiramente diferentes, baseados principalmente nos açúcares solúveis presentes (Kitch et al. 1998; Weng et al. 2018). No geral os grãos de feijão-frade são caracterizados pela alta proporção de hidratos de carbono, que representam a maior parte do peso seco do grão, com as maiores concentrações a dizerem respeito ao amido e à fibra. Por sua vez, é descrita a presença de 8 açúcares (hidratos de carbono simples), nomeadamente: sacarose (11-19 g/kg), glucose (4-5 g/kg), frutose (1-2 g/kg), galactose ( $\leq 15$  g/kg), maltose ( $\leq 11$  g/kg), e três açúcares considerados antinutrientes, a estaquiose (17-60 g/kg), verbascose (6-13 g/kg), e rafinose (5-10 g/kg) (Gonçalves et al. 2016).

Neste estudo foram quantificados os açúcares presentes na tabela 9, com as percentagens de cada açúcar na variedade/tratamento representada no gráfico 16. O perfil de açúcares acompanha o referido na literatura, com o oligossacarídeo estaquiose a destacar-se, seguido da sacarose, rafinose, glucose e frutose (Gráfico16).

**Gráfico 16 - Perfil de açúcares analisados em cada variedade sob controlo (WW) e sob défice hídrico (WD)**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Défice hídrico.

Contudo, o comportamento face ao stress hídrico em termos de variação do teor de cada açúcar é distinto, com CV e L4 a não apresentarem alteração significativa, ao contrário das restantes, onde se verificou impacto da seca na composição do grão, mas de forma diferente principalmente no que toca ao teor de estaquiose, onde L1 apresenta aumento sob seca, e L2 e L3 redução (Gráfico 16).

O feijão-frade apresenta alguns constituintes com efeitos antinutricionais, onde estão incluídos os oligossacarídeos (estaquiose, rafinose e verbascose). A concentração destes açúcares difere em função da variedade e técnicas posteriores de processamento, como descasque, embebição, germinação ou cozedura, podendo desta forma reduzir o seu conteúdo (Aguilera et al. 2013; Singh 2014; FAO 2016c) e conseqüentemente o seu efeito adverso, associado a perturbações digestivas, como a flatulência (FAO 2016c; FAO 2016d).

Por sua vez, estes fatores antinutricionais são compostos químicos sintetizados pela planta em sua defesa, face a diversos stresses. Neste sentido, a melhoria de práticas agronômicas e controlo do stresse durante a produção, podem contribuir para a minimização desses fatores inerentes à composição dos grãos das leguminosas (Chibarabada et al. 2017b).

Os hidratos de carbono não redutores, também designados RFOs (oligossacarídeos da família rafinose), são também bons compostos de armazenamento, podendo acumular-se em grandes quantidades sem afetar os processos metabólicos primários. Alguns estudos relataram que a tolerância à seca está fortemente correlacionada com a acumulação destes compostos nos grãos, principalmente rafinose, estaquiase e verbascose (Chakraborty et al. 2016).

Pela análise individual dos açúcares solúveis analisados (tabela 9), nas condições de controlo, a variedade L2 apresentou o teor mais elevado do açúcar estaquiase (53,3 mg g<sup>-1</sup>) e o valor mais baixo a verificar-se em L1 (32,3 mg g<sup>-1</sup>). Em condições de seca a menor concentração foi verificada em L3 (31,5 mg g<sup>-1</sup>), enquanto CV apresentou a maior concentração neste regime hídrico (54,7 mg g<sup>-1</sup>).

**Tabela 9 - Teores de açúcares solúveis no grão de feijão-frade em WW e WD**

| Variedade | Tratamento | Açúcares solúveis grão (mg g <sup>-1</sup> ) |             |             |             |             | Soma*        |
|-----------|------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
|           |            | Estaquiase                                   | Rafinose    | Sacarose    | Glucose     | Frutose     |              |
| CV        | WW         | 48,6±3,5 ar                                  | 9,0±0,9 abr | 27,9±0,7 ar | 2,9±0,2 ar  | 2,8±0,8 ar  | 91,3±4,6 abr |
|           | WD         | 54,7±1,2 ar                                  | 10,5±0,5 ar | 32,5±2,0 ar | 3,9±0,7 ar  | 3,0±0,7 ar  | 104,6±2,7 ar |
| L1        | WW         | 32,3±0,8 bs                                  | 7,1±0,2 br  | 33,9±1,8 ar | 1,5±0,2 as  | 0,4±0,1 abs | 75,1±2,4 bs  |
|           | WD         | 52,3±2,8 ar                                  | 6,2±0,6 br  | 28,1±1,2 as | 2,7±0,2 abr | 1,9±0,6 abr | 91,1±4,9 abr |
| L2        | WW         | 53,3±2,1 ar                                  | 8,4±0,6 br  | 33,1±2,1 ar | 3,0±1,1 ar  | 1,5±0,9 abr | 99,4±5,4 ar  |
|           | WD         | 34,1±1,6 bs                                  | 4,2±0,4 bs  | 29,3±1,6 ar | 1,5±0,2 br  | 0,2±0,2 bcr | 69,3±2,4 cs  |
| L3        | WW         | 49,8±2,6 ar                                  | 4,0±0,4 cs  | 35,1±4,5 ar | 1,5±0,5 ar  | 0,0±0,0 br  | 90,4±6,5 abr |
|           | WD         | 31,5±0,8 bs                                  | 12,7±0,6 ar | 31,0±2,1 ar | 2,5±0,3 abr | 0,0±0,0 cr  | 77,7±2,9 bcr |
| L4        | WW         | 48,8±1,5 ar                                  | 10,9±0,4 ar | 32,0±2,8 ar | 0,3±0,1 as  | 0,0±0,0 br  | 92,1±4,3 abr |
|           | WD         | 50,2±0,7 ar                                  | 12,9±1,1 ar | 32,8±1,8 ar | 1,5±0,1 br  | 0,0±0,0 cr  | 97,4±2,9 ar  |

CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; Os valores apresentados correspondem às médias ± SE (n = 3 a 5). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b, c) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

Porém, como já referido, o déficit hídrico provocou efeitos distintos na concentração de estaquiase em função da variedade. L1 apresentou aumentos significativos na ordem dos 62 %, com o oposto a ocorrer para L2 e L3, que apresentaram reduções significativas de 36 % e 37 %, respetivamente, enquanto CV e L4 não apresentaram qualquer impacto significativo no grão, relativamente ao teor deste açúcar face ao stresse.

A redução do teor de estaquiase em L2 e L3 sob WD pode indicar uma vantagem em termos de efeitos adversos ao consumo de leguminosas nestas variedades.

Outro oligossacarídeo referido e quantificado foi a rafinose, composto também da família dos açúcares não digeríveis e que apresenta concentrações bastante menores que a estaquiase. Os teores máximos foram verificados na variedade local L4, tanto em WW como

WD, com 10,9 mg g<sup>-1</sup> e 12,9 mg g<sup>-1</sup>, respetivamente, com esta alteração a não se revelar significativa. O teor mais reduzido em WW foi registado para L3 (4,0 mg g<sup>-1</sup>) e em WD para L2 (4,2 mg g<sup>-1</sup>).

Para além de L4, também CV e L1 não apresentaram impacto da seca no teor de rafinose, e L2 e L3 a terem comportamento oposto, apresentando L2 uma redução de 50 % e L3 a registar um aumento de 218 %. Para L3 o aumento da rafinose foi compensado pela diminuição da estaquiose, enquanto L2 reduziu ambos os açúcares.

Açúcares como a sacarose, glucose e frutose podem ajudar na melhoria do sabor dos grãos de leguminosas (Hou, Chen, Alloatti, et al. 2009; Sugimoto et al. 2010), sendo referido que o aumento da doçura de grãos pode ajudar na aceitação e consumo de leguminosas, como o feijão-frade (Faye et al. 2006). Neste sentido, já existem alguns esforços para o desenvolvimento de variedades com maior teor de sacarose nos grãos, conferindo-lhe um sabor mais doce (Hall et al. 2003; Nassourou et al. 2017).

O conteúdo em açúcares prontamente disponíveis (sacarose, glucose e frutose) apresentou pouca variabilidade entre as variedades, sendo quase nulo o impacto do tratamento (Tabela 9 e gráfico 16). Para as plantas em controlo os grãos que apresentaram maior teor destes açúcares foram as variedades locais L2 e L3, já para os grãos que resultaram de plantas sob défice hídrico foram as variedades CV e L4. Estas variedades podem assim apresentar melhoria no sabor doce do grão com a seca, tornando-se mais apelativas ao consumidor.

Glucose e frutose apresentaram uma baixa expressão face aos restantes açúcares, com percentagens abaixo dos 5 %, sendo a variedade L1 a única a apresentar diferenças significativas entre tratamentos, com ligeiros aumentos em resposta à seca.

A sacarose apresenta-se como o segundo açúcar mais abundante no feijão-frade, não se verificando diferenças entre variedades, nem em resultado da exposição a diferentes tratamentos hídricos, sendo exceção a variedade L1 que registou uma ligeira (17 %) mas significativa diminuição sob seca (Tabela 9), apresentando concentrações entre 27,9 mg g<sup>-1</sup> (CV em WW) e 35,1 mg g<sup>-1</sup> (L3 em WW).

A taxa de exportação da sacarose dos locais de síntese (folhas) para regiões de consumo (órgão reprodutivos) depende da taxa fotossintética atual e da concentração de sacarose na folha, sendo o crescimento dos grãos suportado pelos recursos existentes na folha e que podem ser mobilizados para o grão. Neste sentido, uma fotossíntese limitada e a acumulação de sacarose nas folhas, podem dificultar a taxa de exportação da sacarose para órgãos reprodutivos e finalmente afetar o desenvolvimento reprodutivo (Sehgal et al. 2017).

Foi verificado na análise dos açúcares foliares que nenhuma variedade local, nem a variedade comercial apresentaram impacto da seca no teor foliar da sacarose, ocorrendo,

porém, ligeiros aumentos em algumas variedades, o que pode ajudar a explicar os resultados obtidos no grão para o teor de sacarose.

O padrão verificado para o somatório dos açúcares quantificados foi semelhante ao observado para a estaquiose, uma vez que o maior impacto da seca foi observado de forma notória no açúcar mais abundante, traduzindo-se na maior relevância para o somatório dos açúcares. Neste sentido L1 apresentou um aumento de 21 %, L2 uma redução de 30 %, ambos significativos, e apesar de não se apresentarem significativos, CV e L4 apresentaram aumentos de 15 % e 6 % respetivamente, e L3 uma redução de 14 %.

O maior teor de açúcar no grão obtido das plantas em controlo foi registado para a variedade local L2 (99,4 mg g<sup>-1</sup>) enquanto que, sob défice hídrico CV registou a maior concentração de açúcares solúveis no grão (104,6 mg g<sup>-1</sup>). As menores concentrações ocorreram em L1 (75,1 mg g<sup>-1</sup>) para o grão em WW e em L2 (69,3 mg g<sup>-1</sup>) para o grão resultante das plantas sujeitas a WD.

Teores de açúcares solúveis superiores no grão de variedades de feijão-frade em condições de seca, poderão assim ser benéficos numa perspetiva de melhoramento genético e qualidade (Weng et al. 2018).

De destacar que, à semelhança do perfil de açúcares encontrado no tecido foliar sob défice hídrico, também no grão não houve qualquer impacto da seca na variedade local L4.

### **4.5.3 Proteína bruta no grão**

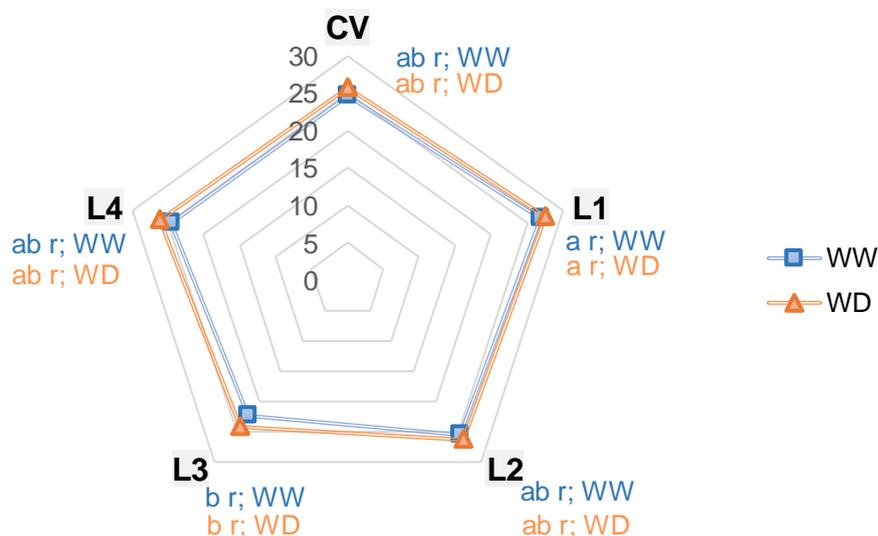
O feijão-frade é uma leguminosa que, além da sua intrínseca capacidade de tolerância à seca (Agbicodo et al. 2009; Hall 2012), constitui uma importante fonte de proteína em alternativa à proteína animal, com grande potencialidade num contexto de alterações climáticas e necessidade de aumentar a produção de culturas sustentáveis e nutritivas, satisfazendo as necessidades de segurança alimentar do crescente aumento populacional. A quantificação de proteína no grão e sua variação com o défice hídrico é um parâmetro que contribui para a avaliação do impacto da seca na qualidade nutricional das leguminosas (Ntatsi et al. 2018).

Como já referido, o grão de feijão-frade é tido como uma excelente fonte proteica (Boukar et al. 2011) com os grãos inteiros a apresentarem entre 16 a 31 % e o tegumento a conter cerca de 12 % de proteína (Aremu 1990). Grande parte da proteína corresponde a globulinas, e níveis mais baixos correspondem a albumina, glutelina e prolamina (Vasconcelos et al. 2010; Gonçalves et al. 2016)

O teor médio de proteína bruta obtido neste trabalho, para as variedades locais e comercial situaram-se entre 22 e 28 % (Gráfico 17) em linha com o alcançado por outros

autores, com resultados entre 20 e 27 % (Iqbal et al. 2006; Henshaw 2008; Vasconcelos et al. 2010; Mamiro et al. 2011; Antova et al. 2014; Gonçalves et al. 2016).

**Gráfico 17 - Teores de proteína bruta (%) no grão de feijão-frade em WW e WD**



CV – variedade comercial; L1, L2, L3, L4- variedades locais; WW- conforto hídrico; WD – Déficit hídrico; Os valores apresentados correspondem às médias (n = 3). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre variedades em cada tratamento (a, b) e entre tratamentos para cada variedade (r, s). As letras (a) e (r) correspondem aos valores mais elevados. (ANOVA, p < 0,05).

Em África tem sido promovido o seu consumo em famílias pobres com o objetivo de reduzir a prevalência de desnutrição proteica e energética (Jayathilake et al. 2018) aproveitando o seu alto teor proteico e capacidade da cultura em resistir a ambientes áridos.

Sendo a diversidade genética apontada como responsável por variações no teor proteico (Muranaka et al. 2016), foi verificada uma ligeira variabilidade nos teores encontrados, com a variedade L1 a apresentar as maiores concentrações, com resultados médios de proteína bruta na ordem dos 27 % para WW e 28 % para WD, e L3 a registar os menores valores com resultados de 22 e 24 % de proteína bruta para WW e WD, respetivamente.

Quanto ao déficit hídrico não se observou qualquer impacto no teor de proteína bruta obtido, evidenciando assim a manutenção da qualidade do grão a este nível, face à seca imposta, ao contrário do reportado por outros autores, que referem a diminuição do teor de proteína em leguminosas em resultado do déficit hídrico (Chibarabada et al. 2017a), redução essa relacionada com a diminuição da absorção de nitrogénio sob condições limitadas de água (Chibarabada et al. 2017a; Farooq et al. 2017).

#### 4.5.4 Relações entre parâmetros agronômicos, físicos e de qualidade estudados

Uma análise global do nível de influência das variáveis tratamento, variedade e interação entre elas, nos resultados obtidos, isto é, quanto estas variáveis afetaram os parâmetros quantitativos de qualidade, P100G, NGP e PGP é apresentada na tabela 10. Pela sua análise verificamos que os parâmetros colorimétricos ( $L$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C$ ,  $h^\circ$ ) apresentaram influência altamente significativa da variedade, assim como os parâmetros agronômicos P100G, NGP e PGP. Por outro lado, a variedade não influenciou significativamente os teores de hidratos de carbono simples (sacarose, glucose e frutose).

Relativamente ao tratamento hídrico imposto (WW ou WD), não se verificaram influências significativas na maioria dos parâmetros de qualidade, com uma pequena influência observada no parâmetro colorimétrico  $b^*$  (escala azul-amarelo), cromaticidade, nos oligossacarídeos (estaquiose e rafinose), proteína bruta e P100G, porém altamente significativo para os resultados do NGP e PGP.

Os parâmetros com efeitos mais significativos em resultado da interação tratamento e variedade foram observados nos açúcares estaquiose, rafinose e do somatório dos açúcares analisados, confirmando o facto de estes resultarem da resposta adaptativa das diferentes plantas à seca. Os parâmetros colorimétricos apresentaram ligeira influência desta interação, ao contrário da proteína bruta e do P100G, que não apresentaram qualquer efeito significativo da interação tratamento/variedade.

Na tabela 10 também se encontram apresentados os valores da correlação de Pearson obtidos para as plantas em WW e em WD. Embora não implique uma causalidade, o coeficiente de correlação de Pearson exprime se existe uma relação entre duas variáveis, expressando de forma quantitativa a intensidade dessa relação. Este coeficiente permite-nos entender como é que a variabilidade de um parâmetro afeta outro. Quando o valor da correlação se aproxima de 1, verifica-se o aumento no valor de uma variável quando a outra também aumenta, ou seja, observa-se uma relação linear positiva. Quando o valor se aproxima de -1 podemos dizer que as variáveis são correlacionáveis, mas de forma inversa, ou seja quando uma aumenta a outra diminui. Valores próximos de zero indicam que não se verifica correlação entre os parâmetros para o conjunto de dados analisado.

**Tabela 10 - Valores da correlação de Pearson e nível de significância do tratamento, variedade e sua interação nos parâmetros de qualidade do grão**

| <b>Correlação Pearson</b>          | <b>L</b>             | <b>a*</b>            | <b>b*</b>            | <b>C</b>             | <b>hº</b>            | <b>Estaquiose</b>    | <b>Rafinose</b>      | <b>Sacarose</b>      | <b>Glucose</b>       | <b>Frutose</b>       | <b>Somatório açúcares solúveis</b> | <b>% Proteína bruta</b> | <b>P100G</b>         | <b>NGP</b>           | <b>PGP</b>           |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>L</b>                           | 1                    | -0,099 <sup>ns</sup> | 0,885 <sup>**</sup>  | 0,845 <sup>**</sup>  | -0,404 <sup>**</sup> | -0,264 <sup>ns</sup> | -0,050 <sup>ns</sup> | 0,080 <sup>ns</sup>  | 0,575 <sup>*</sup>   | 0,403 <sup>ns</sup>  | -0,129 <sup>ns</sup>               | -0,410 <sup>ns</sup>    | 0,177 <sup>ns</sup>  | -0,024 <sup>ns</sup> | -0,029 <sup>ns</sup> |
| <b>a*</b>                          | -0,496 <sup>**</sup> | 1                    | 0,329 <sup>*</sup>   | 0,411 <sup>**</sup>  | -0,846 <sup>**</sup> | -0,209 <sup>ns</sup> | -0,856 <sup>**</sup> | -0,518 <sup>*</sup>  | -0,092 <sup>ns</sup> | 0,028 <sup>ns</sup>  | -0,492 <sup>*</sup>                | 0,395 <sup>ns</sup>     | -0,328 <sup>*</sup>  | 0,025 <sup>ns</sup>  | -0,171 <sup>ns</sup> |
| <b>b*</b>                          | 0,819 <sup>**</sup>  | -0,034 <sup>ns</sup> | 1                    | 0,996 <sup>**</sup>  | -0,729 <sup>**</sup> | -0,303 <sup>ns</sup> | -0,323 <sup>ns</sup> | -0,217 <sup>ns</sup> | 0,506 <sup>*</sup>   | 0,409 <sup>ns</sup>  | -0,262 <sup>ns</sup>               | -0,179 <sup>ns</sup>    | 0,010 <sup>ns</sup>  | -0,008 <sup>ns</sup> | -0,122 <sup>ns</sup> |
| <b>C</b>                           | 0,762 <sup>**</sup>  | 0,071 <sup>ns</sup>  | 0,993 <sup>**</sup>  | 1                    | -0,780 <sup>**</sup> | -0,302 <sup>ns</sup> | -0,373 <sup>ns</sup> | -0,245 <sup>ns</sup> | 0,490 <sup>*</sup>   | 0,405 <sup>ns</sup>  | -0,282 <sup>ns</sup>               | -0,137 <sup>ns</sup>    | -0,010 <sup>ns</sup> | -0,012 <sup>ns</sup> | -0,135 <sup>ns</sup> |
| <b>hº</b>                          | 0,167 <sup>ns</sup>  | -0,880 <sup>**</sup> | -0,227 <sup>ns</sup> | -0,308 <sup>ns</sup> | 1                    | 0,290 <sup>ns</sup>  | 0,728 <sup>**</sup>  | 0,456 <sup>ns</sup>  | -0,225 <sup>ns</sup> | -0,249 <sup>ns</sup> | 0,452 <sup>ns</sup>                | -0,160 <sup>ns</sup>    | 0,140 <sup>ns</sup>  | 0,053 <sup>ns</sup>  | 0,205 <sup>ns</sup>  |
| <b>Estaquiose</b>                  | 0,441 <sup>ns</sup>  | -0,652 <sup>**</sup> | 0,196 <sup>ns</sup>  | 0,114 <sup>ns</sup>  | 0,449 <sup>ns</sup>  | 1                    | 0,097 <sup>ns</sup>  | 0,153 <sup>ns</sup>  | 0,410 <sup>ns</sup>  | 0,647 <sup>**</sup>  | 0,882 <sup>**</sup>                | 0,403 <sup>ns</sup>     | 0,579 <sup>*</sup>   | -0,600 <sup>**</sup> | -0,251 <sup>ns</sup> |
| <b>Rafinose</b>                    | -0,456 <sup>*</sup>  | -0,194 <sup>ns</sup> | -0,480 <sup>*</sup>  | -0,496 <sup>*</sup>  | 0,289 <sup>ns</sup>  | 0,208 <sup>ns</sup>  | 1                    | 0,504 <sup>*</sup>   | 0,160 <sup>ns</sup>  | -0,095 <sup>ns</sup> | 0,462 <sup>*</sup>                 | -0,408 <sup>ns</sup>    | 0,283 <sup>ns</sup>  | 0,152 <sup>ns</sup>  | 0,412 <sup>ns</sup>  |
| <b>Sacarose</b>                    | 0,015 <sup>ns</sup>  | 0,274 <sup>ns</sup>  | 0,213 <sup>ns</sup>  | 0,225 <sup>ns</sup>  | -0,258 <sup>ns</sup> | 0,065 <sup>ns</sup>  | -0,187 <sup>ns</sup> | 1                    | 0,257 <sup>ns</sup>  | 0,115 <sup>ns</sup>  | 0,528 <sup>*</sup>                 | -0,195 <sup>ns</sup>    | 0,354 <sup>ns</sup>  | -0,088 <sup>ns</sup> | 0,350 <sup>ns</sup>  |
| <b>Glucose</b>                     | 0,473 <sup>*</sup>   | -0,122 <sup>ns</sup> | 0,563 <sup>*</sup>   | 0,548 <sup>*</sup>   | -0,027 <sup>ns</sup> | 0,286 <sup>ns</sup>  | 0,102 <sup>ns</sup>  | 0,046 <sup>ns</sup>  | 1                    | 0,830 <sup>**</sup>  | 0,571 <sup>**</sup>                | -0,008 <sup>ns</sup>    | 0,514 <sup>*</sup>   | -0,418 <sup>ns</sup> | -0,156 <sup>ns</sup> |
| <b>Frutose</b>                     | 0,342 <sup>ns</sup>  | -0,208 <sup>ns</sup> | 0,332 <sup>ns</sup>  | 0,313 <sup>ns</sup>  | 0,070 <sup>ns</sup>  | 0,164 <sup>ns</sup>  | 0,372 <sup>ns</sup>  | -0,126 <sup>ns</sup> | 0,669 <sup>**</sup>  | 1                    | 0,640 <sup>**</sup>                | 0,331 <sup>ns</sup>     | 0,632 <sup>**</sup>  | -0,626 <sup>**</sup> | -0,325 <sup>ns</sup> |
| <b>Somatório açúcares solúveis</b> | 0,341 <sup>ns</sup>  | -0,441 <sup>ns</sup> | 0,252 <sup>ns</sup>  | 0,190 <sup>ns</sup>  | 0,282 <sup>ns</sup>  | 0,862 <sup>**</sup>  | 0,332 <sup>ns</sup>  | 0,445 <sup>ns</sup>  | 0,459 <sup>*</sup>   | 0,348 <sup>ns</sup>  | 1                                  | 0,157 <sup>ns</sup>     | 0,633 <sup>**</sup>  | -0,509 <sup>*</sup>  | -0,040 <sup>ns</sup> |
| <b>%Proteína bruta</b>             | -0,365 <sup>ns</sup> | 0,566 <sup>*</sup>   | -0,077 <sup>ns</sup> | -0,026 <sup>ns</sup> | -0,441 <sup>ns</sup> | -0,345 <sup>ns</sup> | 0,432 <sup>ns</sup>  | -0,305 <sup>ns</sup> | 0,044 <sup>ns</sup>  | 0,034 <sup>ns</sup>  | -0,273 <sup>ns</sup>               | 1                       | 0,139 <sup>ns</sup>  | -0,229 <sup>ns</sup> | -0,075 <sup>ns</sup> |
| <b>P100G</b>                       | 0,257 <sup>ns</sup>  | -0,357 <sup>*</sup>  | 0,078 <sup>ns</sup>  | 0,059 <sup>ns</sup>  | 0,209 <sup>ns</sup>  | -0,077 <sup>ns</sup> | 0,227 <sup>ns</sup>  | -0,337 <sup>ns</sup> | 0,216 <sup>ns</sup>  | 0,536 <sup>*</sup>   | -0,069 <sup>ns</sup>               | 0,022 <sup>ns</sup>     | 1                    | -0,751 <sup>*</sup>  | -0,286 <sup>ns</sup> |
| <b>NGP</b>                         | -0,017 <sup>ns</sup> | 0,188 <sup>ns</sup>  | 0,002 <sup>ns</sup>  | 0,010 <sup>ns</sup>  | 0,060 <sup>ns</sup>  | 0,003 <sup>ns</sup>  | -0,387 <sup>ns</sup> | 0,319 <sup>ns</sup>  | -0,271 <sup>ns</sup> | -0,520 <sup>*</sup>  | -0,035 <sup>ns</sup>               | -0,126 <sup>ns</sup>    | -0,592 <sup>**</sup> | 1                    | 0,802 <sup>**</sup>  |
| <b>PGP</b>                         | 0,260 <sup>ns</sup>  | -0,201 <sup>ns</sup> | 0,079 <sup>ns</sup>  | 0,067 <sup>ns</sup>  | 0,172 <sup>ns</sup>  | 0,089 <sup>ns</sup>  | -0,175 <sup>ns</sup> | 0,046 <sup>ns</sup>  | -0,047 <sup>ns</sup> | -0,088 <sup>ns</sup> | 0,026 <sup>ns</sup>                | -0,134 <sup>ns</sup>    | 0,276 <sup>ns</sup>  | 0,593 <sup>**</sup>  | 1                    |
| <b>Nível significância</b>         |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                                    |                         |                      |                      |                      |
| <b>Tratamento</b>                  | ns                   | ns                   | *                    | *                    | ns                   | *                    | *                    | ns                   | ns                   | ns                   | ns                                 | *                       | *                    | ***                  | ***                  |
| <b>Variedade</b>                   | ***                  | ***                  | ***                  | ***                  | ***                  | ***                  | ***                  | ns                   | *                    | **                   | **                                 | **                      | ***                  | ***                  | ***                  |
| <b>Variedade x Tratamento</b>      | *                    | *                    | *                    | *                    | *                    | ***                  | ***                  | ns                   | *                    | ns                   | ***                                | ns                      | ns                   | **                   | **                   |

L - Luminosidade; a\* - verde (-) ao vermelho (+); b\* - azul (-) ao amarelo (+); C\* - cromaticidade; hº - ângulo hue; P100G – Peso de 100 grãos; NGP – Número de grãos por planta; PGP – Peso dos grãos por planta. A diagonal superior a salmão representa as plantas cultivadas sob condições de stresse hídrico e a diagonal inferior a azul representa as plantas cultivadas sob condições bem regadas. Valores próximos a zero indicam ausência de correlação e valores próximos a um indicam forte correlação entre dois parâmetros e a laranja encontram-se representados os efeitos do tratamento, variedade e sua interação nos parâmetros analisados, sendo: <sup>ns</sup> – não significativo, \* - significativo (p < 0,05), \*\* - muito significativo (p < 0,01), \*\*\* - altamente significativo (p < 0,001).

Neste sentido, relativamente ao teor proteico do grão podemos verificar uma relação positiva (fraca), para os dados resultantes das plantas do tratamento controlo, com o parâmetro colorimétrico  $a^*$  (variação (-) verde para (+) amarelo), indicando que valores de proteína bruta mais elevados são observados para coloração mais elevada na escala do amarelo ( $r = 0,566^*$ ). Porém sob stresse hídrico esta relação não se verificou, não devendo por isso estabelecer-se correlação direta entre estes parâmetros.

Uma correlação inversa fraca foi observada também para o valor de  $a^*$ , para ambos os tratamentos, com o parâmetro agronómico P100G ( $r = -0,357^*WW$ ;  $r = -0,328^*WD$ ). Neste caso, grão com pigmento amarelo mais elevado apresentou menor valor para o P100G.

Por sua vez, o P100G apresentou uma relação inversa bastante significativa com o NGP em ambos os tratamentos ( $r = -0,592^{**}WW$ ;  $r = -0,751^{**}WD$ ), sugerindo que plantas com produção de um menor número de grãos apresentam maior peso dos grãos (P100G).

Ainda relativamente aos parâmetros colorimétricos, a análise dos valores da correlação de Pearson corroboram a análise efetuada para os  $\Delta L$  e  $\Delta C$  entre as variedades (Figura 16), demonstrando uma relação positiva entre  $L$  e  $C$ , logo amostras de grão mais claras (valor de  $L$  superior), apresentaram uma saturação de cor mais viva (valor de  $C$  superior), ou pelo contrário, grão como a variedade L4, mais escuro (valor de  $L$  menor) apresenta-se mais opaco (valor de  $C$  menor) ( $r = 0,762^{**}WW$ ;  $r = 0,845^{**}WD$ ).

Sob condições de conforto hídrico, verificou-se também que os grãos de feijão-frade com menores concentrações de estaquiose foram os que registaram maior valor de  $a^*$  ( $r = -0,652^{**}$ ), relação que poderia ser interessante aprofundar. Contudo, nas plantas em seca esse comportamento não se verifica para este açúcar, sendo neste caso a relação inversa a observada para a rafinose ( $r = -0,856^{**}$ ). Weng et al. (2018) verificaram que o teor de açúcares solúveis modificou em função da cor dos grãos.

Pela avaliação destes resultados, torna-se de grande importância a execução de estudos sob diferentes níveis de defice hídrico, tendo em conta as alterações climáticas previstas. Apesar de não se ter observado, para este conjunto de variedades, grande nível de significância do tratamento imposto nos valores obtidos para os parâmetros de qualidade, o mesmo já não se verifica quando avaliamos as correlações entre esses parâmetros, isto é, o tratamento altera a forma como a variabilidade de um parâmetro afecta outro.

## Capítulo 5 – Conclusão

As leguminosas são conhecidas pelos seus benefícios nutricionais e de saúde, assim como pelo seu impacto positivo na segurança e sustentabilidade alimentar, nutricional e ambiental.

O rápido crescimento populacional e conseqüente aumento da necessidade de mais alimentos seguros e nutritivos, sugerem que o incremento verificado na produção e na procura deste alimento continuará a crescer nas próximas décadas. Esta tendência será acentuada pelo aumento do conhecimento e a adoção de uma alimentação assente na qualidade nutricional.

No entanto prevê-se que a produção venha também a ser afetada e limitada pelas alterações climáticas. Neste contexto ganha relevo o estudo de culturas mais sustentáveis e resilientes às alterações climáticas, como o feijão-frade. Efetuou-se a caracterização dos mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de resistência/tolerância à seca em cinco variedades portuguesas de Feijão-frade, sendo quatro variedades locais (diferentes zonas de Portugal), e uma variedade comercial obtida através do Programa de Melhoramento de Leguminosas do INIAV (Elvas). Para além do rendimento, avaliou-se também a qualidade nutricional dos grãos produzidos nessas condições.

### **1. Desenvolvimento fenológico e características morfológicas em resposta à seca**

Em termos de desenvolvimento fenológico, a maturação precoce referida como estratégica para evitar o défice hídrico foi verificado na variedade L1 e L2, com a variedade L2 a atingir 80 % da maturação das vagens com um avanço de 13 dias face ao controlo.

O défice hídrico provocou uma alteração morfológica rápida da parte aérea da planta em todas as variedades, reduzindo o número de folhas, flores (entre 44 % e 64 %) e vagens (entre 45 % a 72 %), com exceção de L1 que não apresentou diferenças no número de flores sob seca face ao controlo.

### **2. Desempenho fisiológico das plantas em resposta à seca**

Todas as variedades apresentaram a capacidade de manter um elevado potencial hídrico e eficiente controlo estomático, tendo-se verificado baixos índices de dano membranal ( $I\% < 14\%$ ), sugerindo que a capacidade de manter um teor hídrico relativo (RWC) elevado (aprox. 80 %) sob défice hídrico poderá ter evitado danos mais acentuados ao nível membranal, manifestando-se assim uma das estratégias de tolerância à seca desta cultura. L3 apresentou o menor  $I\%$  e maior RWC sob stresse, com o oposto a registar-se para L2.

Reduções significativas da condutância estomática ( $g_s$ ) revelam a estratégia principal de tolerância à seca desta cultura, com todas as variedades a apresentarem um impacto negativo na fotossíntese, com L3 e L4 a registarem as menores reduções. As variedades L1

e L3 apresentaram melhorias na eficiência instantânea do uso da água (iWUE) quando submetidas a déficit hídrico.

Os dados indicam que em L1 a eficiência fotoquímica real do PSII não foi afetada pela seca, tendo as restantes variedades apresentado um impacto reduzido, embora significativo face ao stresse em estudo, o que sugere possíveis danos fotoinibitórios reversíveis.

### **3. Indicadores bioquímicos de resposta à seca**

Os teores relativos de clorofila (SPAD) não se alteraram em função do tratamento imposto em CV e L4. CV apresentou a capacidade de manter a cor verde das folhas durante toda a fase reprodutiva, retardando a senescência em comparação com as variedades locais.

A manutenção ou aumento no teor de clorofila acompanhado de aumentos no teor de carotenóides ocorreu em todas as variedades, refletindo alguma eficiência na resistência à seca destas variedades e existência de mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos.

Quase todas as variedades mantiveram ou aumentaram a concentração foliar de açúcares solúveis, sugerindo que estas moléculas, nomeadamente a sacarose, funcionem como osmoprotetores através do ajuste osmótico, que aumenta a tolerância à seca.

### **4. Impactos da seca nos parâmetros agronômicos**

As modificações no desenvolvimento, características morfológicas, respostas fisiológicas e bioquímicas observadas em resposta à seca, comprometeram o rendimento, com algumas alterações na qualidade do grão. Todos os parâmetros de rendimento avaliados foram afetados, à exceção do P100G que não apresentou diferenças em resposta à seca, com CV a apresentar grãos maiores (22,3 g/100G) que as variedades locais (média 14,7 g/100G). Observaram-se decréscimos na produção entre 63 e 73 %, com L3 a registar a maior produtividade sob seca (10,1 g/planta) e a menor a ser verificada curiosamente em CV (7,6 g/planta). Estes resultados confirmam que o stresse hídrico ocorrido na fase reprodutiva é acompanhado de grandes impactos ao nível da produção.

No geral para os parâmetros agronômicos avaliados L3 destacou-se da variedade comercial, sugerindo a resiliência desta variedade local à seca.

### **5. Impactos da seca na qualidade do grão de feijão-frade**

Dada a sua ampla distribuição geográfica, o feijão-frade caracteriza-se pela sua variedade morfológica e apresenta uma vasta gama de variedades locais, que diferem também na sua cor. Este parâmetro é relevante na aceitação visual do produto pelo consumidor. Nas variedades em estudo não se registaram diferenças de cor entre tratamentos.

Sendo o feijão-frade caracterizado pela alta proporção de hidratos de carbono no grão, dos oito açúcares referidos como presentes no grão, foram quantificados cinco, tendo o seu perfil acompanhado os valores referidos literatura. O oligossacarídeo estaquiase destacou-se como mais abundante (41 a 67 %), seguindo-se a sacarose (31 a 45 %), a rafinose (4 a 18

%), a glucose (0 a 4 %) e a frutose (0 a 3 %). CV e L4 não apresentaram alterações significativas nos teores de açúcares solúveis. L2 e L3 apresentaram impactos da seca no teor de estaquiose, registrando-se uma diminuição significativa (36 e 37 %) e L1 a apresentar um aumento (62 %). L3 apresentou a menor concentração de estaquiose sob seca (31,5 mg g<sup>-1</sup>) e CV a maior concentração neste regime hídrico (54,7 mg g<sup>-1</sup>).

Na variedade L4 não se observou impacto da seca no perfil de açúcares do grão, à semelhança do ocorrido para o perfil de açúcares no tecido foliar.

Uma vez que o feijão frade se apresenta como excelente fonte proteica, a avaliação do impacto da seca no teor de proteína é um parâmetro fundamental na avaliação da sua qualidade nutricional. O teor médio de proteína bruta obtido neste trabalho situou-se entre 22 % e 28 %. A variedade L1 apresentou os teores mais elevados (27 % em WW e 28 % em WD) e L3 registou os teores mais baixos (22 % em WW e 24 % em WD). Quanto ao déficit hídrico não foi verificado qualquer impacto no teor de proteína bruta, evidenciando a manutenção da qualidade do grão a este nível.

No geral, a avaliação dos elementos de qualidade físicos e nutricionais estudados, apresentaram variações pouco significativas em função dos regimes hídricos impostos, com exceção dos teores de açúcares da família rafinose que estão associados aos mecanismos adaptativos das plantas em resposta à seca.

A preservação da qualidade física e nutricional dos grãos produzidos em seca indica a vantagem da utilização do feijão-frade como cultura sustentável em ambientes de baixa disponibilidade hídrica, beneficiando ainda dos mecanismos eficientes de tolerância e adaptação à seca que apresenta e que foram observados neste trabalho. A diversidade das variedades locais poderá ser uma mais-valia de acordo com os objetivos a alcançar, tendo em vista a produção, requisitos nutricionais e de segurança alimentar, face aos cenários prementes de escassez de água que as populações e que os ecossistemas irão cada vez mais enfrentar no contexto das alterações climáticas.

## Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

Abbate PE, Dardanelli JL, Cantarero MG, Maturano M, Melchiori RJM, Suero EE. 2004. Climatic and water availability effects on water-use efficiency in wheat. *Crop Science*. 44(2):474-483. doi:10.2135/cropsci2004.4740.

Abberton M. 2010. Enhancing the role of legumes: potential and obstacles. *Grassland Carbon sequestration: management, policy and economics*. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 11:177-187.

Adebooye OC, Singh V. 2007. Effect of cooking on the profile of phenolics, tannins, phytate, amino acid, fatty acid and mineral nutrients of whole-grain and decorticated vegetable cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Journal of Food Quality*. 30(6):1101-1120. doi:10.1111/j.1745-4557.2007.00155.x.

AEA. 2016. Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2016- An indicator-based report. European Environment Agency, (Agência Europeia do Ambiente, Füssel, EEA/Hans-Martin). 2017. pp 419. Doi:10.2800/534806.

Agbicodo EM, Fatokun CA, Muranaka S, Visser RGF, Linden Van Der CG. 2009. Breeding drought tolerant cowpea: Constraints, accomplishments, and future prospects. *Euphytica*. 167(3):353-370. doi:10.1007/s10681-009-9893-8.

Aguilera Y, Díaz MF, Jiménez T, Benítez V, Herrera T, Cuadrado C, Martín-Pedrosa M, Martín-Cabrejas MA. 2013. Changes in non-nutritional factors and antioxidant activity during germination of nonconventional legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(34):8120-8125. doi:10.1021/jf4022652.

Ahmed FE, Suliman ASH. 2010. Effect of water stress applied at different stages of growth on seed yield and water-use efficiency of Cowpea. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1(4):534-540.

Akande KE, Fabiyi EF. 2010. Effect of processing methods on some antinutritional factors in legume seeds for poultry feeding. *International Journal of Poultry Science*. 9(10):996-1001. doi:10.3923/ijps.2010.996.1001.

Akibode S, Maredia M. 2011. Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops. *Department of Agricultural, Food and Resource Economics*. No. 1099-2016-89/32. doi:10.2204/ag.econ.136293.

Ali KA, Noraldeem SS, Yaseen AA. 2021. An evaluation study for chlorophyll estimation techniques. *Sarhad Journal of Agriculture*. 37(4):1458–1465. doi:10.17582/journal.sja/2021/37.4.1458.1465.

Ansari W, Atri N, Pandey M, Kumar Singh A, Singh B, Pandey S. 2019. Influence of drought stress on morphological, physiological and biochemical attributes of plants: A review. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*. 16(04):697–709. doi:10.13005/bbra/2785.

Ansari WA, Atri N, Singh B, Kumar P, Pandey S. 2018. Morpho-physiological and biochemical responses of muskmelon genotypes to different degree of water deficit. *Photosynthetica*. 56(4):1019-1030. doi:10.1007/s11099-018-0821-9.

Ansari WA, Atri N, Singh B, Pandey S. 2017. Changes in antioxidant enzyme activities and gene expression in two muskmelon genotypes under progressive water stress. *Biologia Plantarum*. 61(2):333-341. doi:10.1007/s10535-016-0694-3.

Antova GA, Stoilova TD, Ivanova MM. 2014. Proximate and lipid composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivated in Bulgaria. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33(2):146-152. doi:10.1016/j.jfca.2013.12.005.

Anyia AO, Herzog H. 2004. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy*. 20(4):327-339. doi:10.1016/S1161-0301(03)00038-8.

APA. 2013. Estratégia setorial de adaptação aos impactos das alterações climáticas relacionados com os recursos hídricos. Agência Portuguesa do Ambiente. [https://apambiente.pt/sites/default/files/\\_Clima/Adapta%C3%A7%C3%A3o/Relt\\_Setor\\_ENA\\_AC\\_Recursos\\_Hidricos.pdf](https://apambiente.pt/sites/default/files/_Clima/Adapta%C3%A7%C3%A3o/Relt_Setor_ENA_AC_Recursos_Hidricos.pdf)

APN, Craveiro C, Helena Real, Mariana Barbosa, Pedro Pimenta, Sónia Xará, Teresa Rodrigues. 2016. Leguminosa a leguminosa, encha o seu prato de saúde. Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Nº 40.

Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C. 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?. *Annals of Botany*. 89(7):925-940. doi:10.1093/aob/mcf049.

Aremu CY. 1990. Proximate and amino acid composition of cowpea (*Vigna unguiculata, walp*) protein concentrate prepared by isoelectric point precipitation. *Food Chemistry*. 37(1):61-68. doi:10.1016/0308-8146(90)90045-6.

Bahadur A, Chatterjee A, Kumar R, Naik PS. 2011. Physiological and biochemical basis of drought tolerance in vegetables. *Vegetable Science*. 38(1):1-16.

Bailey R, Bailey AR, King R, Pérez J, Gilbride K, Evans A, García J, Gómez S, Hughes K, Raworth K, et al. 2011. Growing a better future: food justice in a resource constrained world. Oxfam Policy and Practice.

Bajji M, Kinet JM, Lutts S. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*. 36(1):61-70. doi:10.1023/A:1014732714549.

Barickman TC, Simpson CR, Sams CE. 2019. Waterlogging causes early modification in the physiological performance, carotenoids, chlorophylls, proline, and soluble sugars of cucumber plants. *Plants*. 8(6):160. doi:10.3390/plants8060160.

Barrs HD. 1968. Effect of cyclic variations in gas exchange under constant environmental conditions on the ratio of transpiration to net photosynthesis. *Physiologia Plantarum*. 21(5):918-929. doi:10.1111/j.1399-3054.1968.tb07318.x.

Bastos EA, Ferreira VM, Silva CR da, Andrade Júnior AS de. 2008. Evapotranspiração e coeficiente de cultivo do feijão-caupi no vale do Gurguéia, Piauí. *Irriga*. 13(2):182-190. doi:10.15809/irriga.2008v13n2p182-190.

Bastos EA, Nascimento SP do, Silva EM da, Freire Filho FR, Gomide RL. 2011. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. *Revista Ciência Agronômica*. 42(1):100-107. doi:10.1590/s1806-66902011000100013.

Battisti DS, Naylor RL. 2009. Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science*. 323(5911):240-244. doi:10.1126/science.1164363.

Bayat A, Ahmadvand G, Dorri H. 2010. The effect of water stress on the yield and yield components of spotted beans genotypes. *J Agron Sci Iran*. 45:42-45.

Bejarano A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Peix A. 2014. *Vigna unguiculata* is nodulated in Spain by endosymbionts of Genisteae legumes and by a new symbiovar (*vignae*) of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*. 37(7):533-540. doi:10.1016/j.syapm.2014.04.003.

Berners-Lee M, Kennelly C, Watson R, Hewitt CN. 2018. Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. *Elementa: Science of the Anthropocene*. 6. doi:10.1525/elementa.310.

Bevis LEM. 2015. Soil-to-Human Mineral Transmission with an Emphasis on Zinc, Selenium, and Iodine. *Springer Science Reviews*. 3(1):77-96. doi:10.1007/s40362-014-0026-y.

Björkman O, Demmig B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*. 170(4):489-504. doi:10.1007/BF00402983.

Blum A. 2011. Drought resistance - is it really a complex trait?. *Functional Plant Biology*. 38(10):753-757. doi:10.1071/FP11101.

Boukar O, Belko N, Chamarthi S, Togola A, Batiemo J, Owusu E, Haruna M, Diallo S, Umar ML, Olufajo O, et al. 2019. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. *Plant Breeding*. 138(4):415-424. doi:10.1111/pbr.12589.

Boukar O, Massawe F, Muranaka S, Franco J, Maziya-Dixon B, Singh B, Fatokun C. 2011. Evaluation of cowpea germplasm lines for protein and mineral concentrations in grains. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*. 9(4):515-522. doi:10.1017/S1479262111000815.

Boyer JS. 1969. Measurement of the water status of plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 20(1):351-364. doi:10.1146/annurev.pp.20.060169.002031.

Brito MEB, Filho GD de A, Wanderley JAC, Melo AS de, Costa FB da, Ferreira MGP. 2013. Crescimento, fisiologia e produção do milho doce sob estresse hídrico. *Bioscience Journal*. 29(5):1244-1254.

Bruce WB, Edmeades GO, Barker TC. 2002. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53(366):13-25. doi:10.1093/jxb/53.366.13.

Caemmerer S, Farquhar GD. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*. 153(4):376-387. doi:10.1007/BF00384257.

Carneiro da Silva A, da Costa Santos D, Lopes Teixeira Junior D, Bento da Silva P, Cavalcante dos Santos R, Siviero A. 2019. Cowpea: A strategic legume species for food security and health. In J. C. Jimenez-Lopez, & A. Clemente (Eds.), *Legume Seed Nutraceutical Research*. London. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.79006

Carnovale E, Lugaro E, Marconi E. 1991. Protein quality and antinutritional factors in wild and cultivated species of *Vigna spp.* *Plant Foods for Human Nutrition*. 41(1):11-20. doi: 10.1007/BF02196377

Carvalho M, Bebeli PJ, Pereira G, Castro I, Egea-Gilabert C, Matos M, Lazaridi E, Duarte I, Lino-Neto T, Ntatsi G, et al. 2017. European cowpea landraces for a more sustainable agriculture system and novel foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(13):4399-4407. doi:10.1002/jsfa.8378.

Carvalho M, Castro I, Moutinho-Pereira J, Correia C, Egea-Cortines M, Matos M, Rosa E, Carnide V, Lino-Neto T. 2019. Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. *Journal of Plant Physiology*. 241:153001. doi:10.1016/j.jplph.2019.153001.

Carvalho M, Lino-Neto T, Rosa E, Carnide V. 2017. Cowpea: a legume crop for a challenging environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(13):4273-4284. doi:10.1002/jsfa.8250.

- Chakraborty K, Mahatma MK, Thawait LK, Bishi SK, Kalariya KA, Singh AL. 2016. Water deficit stress affects photosynthesis and the sugar profile in source and sink tissues of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) and impacts kernel quality. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 89:98–104. doi:10.5073/JABFQ.2016.089.012.
- Chardigny JM, Walrand S. 2016. Plant protein for food: Opportunities and bottlenecks. *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids*. 23(4). doi:10.1051/ocl/2016019.
- Chaves MM. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*. 42(1):1-16. doi:10.1093/jxb/42.1.1.
- Chaves MM, Costa JM, Zarrouk O, Pinheiro C, Lopes CM, Pereira JS. 2016. Controlling stomatal aperture in semi-arid regions—The dilemma of saving water or being cool?. *Plant Science*. 251:54-64. doi:10.1016/j.plantsci.2016.06.015.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 30(3):239-264. doi:10.1071/FP02076.
- Chaves MM, Oliveira MM. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 55(407):2365-2384. doi:10.1093/jxb/erh269
- Chibarabada TP, Modi Albert T, Mabhaudhi T. 2017. Expounding the value of grain legumes in the semi- and arid tropics. *Sustainability (Switzerland)*. 9(1):60. doi:10.3390/su9010060.
- Chibarabada TP, Modi A T, Mabhaudhi T. 2017. Nutrient content and nutritional water productivity of selected grain legumes in response to production environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14(11):1300. doi:10.3390/ijerph14111300.
- Commission E. 2020. Farm to Fork Strategy. DG SANTE/Unit 'Food information and composition, food waste' (DG SANTE/Unit 'Food information and composition, food waste').
- Cornic G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - Not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*. 5(5):187-188. doi:10.1016/S1360-1385(00)01625-3.
- Costa VP da, Hayashi AH, Carvalho MAM de, Silva EA da. 2012. Aspectos fisiológicos, anatômicos e ultra-estruturais do rizoma de *Costus arabicus* L. (Costaceae) sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea*. 39(1):125-137. doi:10.1590/s2236-89062012000100007.
- Culver CA, Wrolstad RE. 2008. Color quality of fresh and processed foods. *Amer Chemical Society*. 983. doi:10.1021/bk-2008-0983.
- Damesin C, Lelarge C. 2003. Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant, Cell and Environment*. 26(2):207-219. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.00951.x.
- Deikman J, Petracek M, Heard JE. 2012. Drought tolerance through biotechnology: Improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(2):243-250. doi:10.1016/j.copbio.2011.11.003.
- Delmer DP. 2005. Agriculture in the developing world: Connecting innovations in plant research to downstream applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(44):15739-15746. doi:10.1073/pnas.0505895102.

Derbyshire E. 2011. The Nutritional Value of Whole Pulses and Pulse Fractions. In: Pulse Foods. In Tiwari BK, Gowen A, McKenna B. (Eds.), Pulse foods: processing, quality and nutraceutical applications. Manchester: Elsevier Inc. p. 363-383.

Dhanda SS, Sethi GS, Behl RK. 2004. Indices of drought tolerance in wheat Genotypes at early stages of plant growth. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 190(1):6-12. doi:10.1111/j.1439-037X.2004.00592.x.

Din J, Khan SU, Ali I, Gurmani AR. 2011. Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 21(1): 78-82.

Dow GJ, Berry JA, Bergmann DC. 2014. The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 201(4):1205-1217. doi:10.1111/nph.12586.

Dumroese RK, Pinto JR, Montville ME. 2015. Using container weights to determine irrigation needs: a simple method. *Native Plants Journal*. 16(1):67-71. doi:10.3368/npj.16.1.67.

Silva CDS, Santos PAA, Lira JMS, de Santana MC, da Silva Junior CD. 2010. Curso diário das trocas gasosas em plantas de feijão-caupi submetidas a deficiência hídrica. *Revista Caatinga*. 23(4):7-13.

Edematie VE, Fatokun C, Boukar O, Adetimirin VO, Kumar PL. 2021. Inheritance of pod length and other yield components in two cowpea and yard-long bean crosses. *Agronomy*. 11(4):682. doi:10.3390/agronomy11040682.

EEA. 2020. Economic losses from climate-related extremes in Europe (CLIM 039), European Environment Agency; <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/direct-losses-from-weather-disasters-4/assessment>.

EEA. 2021. Water resources across Europe - confronting water stress: an updated assessment, EEA Report N°12/2021, European Environment Agency, <https://www.eea.europa.eu/publications/water-resources-across-europe-confronting>.

EIMasry G, Mandour N, Ejeez Y, Demilly D, Al-Rejaie S, Verdier J, Belin E, Rousseau D. 2021. Multichannel imaging for monitoring chemical composition and germination capacity of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds during development and maturation. *Crop Journal*. 10(5):1399-1411. doi:10.1016/j.cj.2021.04.010.

European Commission. 2015. Sustainable Development Goals | International Partnerships. 2015.

European Commission. 2019. The European Green Deal - COM(2019) 640.

Fabbri ADT, Crosby GA. 2016. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 3:2-11. doi:10.1016/j.ijgfs.2015.11.001.

Fang Y, Xiong L. 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72(4):673-689. doi:10.1007/s00018-014-1767-0.

Fao. 2014. Walking the nexus talk: Assessing the water-energy-food Nexus in the context of the sustainable energy for all initiative. Climate, Energy and Tenure Division (NRC), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma July 2014. <https://www.fao.org/3/i3959e/i3959e.pdf>. <http://www.fao.org/icatalog/inter-e.htm>.

FAO. 2016a. Pulses: Nutritious seeds for a sustainable future. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma, October 2016. <https://www.fao.org/3/i5528e/i5528e.pdf>.

FAO. 2016b. Pulses and climate change. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma, 2016. [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/pulses2016/docs/factsheets/Climate\\_EN\\_PRINT.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/pulses2016/docs/factsheets/Climate_EN_PRINT.pdf).

FAO. 2016c. Nutritional benefits of pulses. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma, 2016. [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/pulses2016/docs/factsheets/Nutrition\\_EN\\_PRINT.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/pulses2016/docs/factsheets/Nutrition_EN_PRINT.pdf)

FAO. 2016d. Health benefits of pulses. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma, 2016. [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/pulses2016/docs/factsheets/Health\\_EN\\_PRINT.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/pulses2016/docs/factsheets/Health_EN_PRINT.pdf)

FAO. 2018a. Sustainable food systems: Concept and framework. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO. 2018b. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> .

FAO. 2021a. FAO's Strategic Framework 2022-31. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations Roma, October 2021. <http://www.fao.org/3/cb7099en/cb7099en.pdf>.

FAO. 2021b. The state of food security and nutrition in the world 2021 Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO.

FAOSTAT. 2022. Production - Crops - Cow peas, dry - 2016-2020. FAO Statistics online database, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division, Rome, <http://fao.org/faostat/en> (Acesso a 24 Abril 2022).

Farooq M, Gogoi N, Barthakur S, Baroowa B, Bharadwaj N, Alghamdi SS, Siddique KHM. 2017a. Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 203(2):81-102. doi:10.1111/jac.12169.

Farooq M, Hussain M, Usman M, Farooq S, Alghamdi SS, Siddique KHM. 2018. Impact of abiotic stresses on grain composition and quality in food legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66(34):8887-8897. doi:10.1021/acs.jafc.8b02924.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant drought stress: Effects, mechanisms, and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 29(1):185-212. doi:10.1051/agro:2008021.

Faye MD, Jooste A, Lowenberg-De Boer J, Fulton J. 2006. Impact of sucrose contents and cooking time on cowpea prices in Senegal. *South African Journal of Economic and Management Sciences*. 9(2):207-212. doi:10.4102/sajems.v9i2.1147.

Ferreira H, Pinto E, Vasconcelos MW. 2021. Legumes as a cornerstone of the transition toward more sustainable agri-food systems and diets in Europe. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 5: 694121. doi:10.3389/fsufs.2021.694121.

Flexas J, Medrano H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*. 89(2):183-189. doi:10.1093/aob/mcf027.

Food and Agriculture Organization. 1996. World Food Summit: Rome declaration on world food security and world food summit plan of action. World Food Summit.

Foyer CH, Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling. *New Phytologist*. 146(3):359-388. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00667.x.

Freitas RMO, Dombroski JLD, Freitas FCL, Nogueira NW, Pinto JRDS. 2017. Physiological responses of cowpea under water stress and rewatering in no-tillage and conventional tillage systems. *Revista Caatinga*. 30(3):559-567. doi:10.1590/1983-21252017v30n303rc.

Fukai S. 1999. Phenology in rainfed lowland rice. *Field Crops Research*. 64(1-2):51-60. doi:10.1016/S0378-4290(99)00050-7.

Gebrelibanos M, Tesfaye D, Raghavendra Y, Sintayeyu B. 2013. Nutritional and health implications of legumes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research IJPSR*. 4(4):1269-1279. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.4(4).1269-79

Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 990(1):87-92. doi:10.1016/S0304-4165(89)80016-9.

Gerber N, Mirzabaev A. 2017. Integrated drought management programme working paper No. 1 Benefits of action and costs of inaction: Drought mitigation and preparedness-a literature review. Integrated Drought Management Programme (IDMP) Working Paper 1. WMO, Geneva, Switzerland and GWP, Stockholm, Sweden. <https://www.gfdr.org/post-disaster-needs-assessments>.

Gerrano AS, Jansen van Rensburg WS, Adebola PO. 2017. Preliminary evaluation of seed and germination traits in cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes. *South African Journal of Plant and Soil*. 34(5):399-402. doi:10.1080/02571862.2017.1317849.

Gerrano AS, Thungo ZG, Mavengahama S. 2022. Phenotypic description of elite cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) genotypes grown in drought-prone environments using agronomic traits. *Heliyon*. 8(2). doi:10.1016/j.heliyon.2022.e08855.

Ginkel M, Biradar C. 2021. Drought early warning in agri-food systems. *Climate*. 9(9):134. doi:10.3390/cli9090134.

Gitelson AA, Keydan GP, Merzlyak MN. 2006. Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophysical Research Letters*. 33(11). doi:10.1029/2006GL026457.

GLOPAN. 2020. Global Panel on Agriculture and Food Systems for Nutrition. Global Panel - Future Food Systems: For people, our planet, and prosperity. [Internet]. 2020. London, UK. [https://www.glopan.org/wp-content/uploads/2020/09/Foresight-2.0\\_Future-Food-Systems\\_For-people-our-planet-and-prosperity.pdf](https://www.glopan.org/wp-content/uploads/2020/09/Foresight-2.0_Future-Food-Systems_For-people-our-planet-and-prosperity.pdf)

Gomes AMF, Nhantumbo N, Ferreira-Pinto M, Massinga R, C. Ramalho J, Ribeiro-Barros A. 2019. Breeding elite cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] varieties for improved food security and income in Africa: opportunities and challenges. In: *Legume crops - Characterization and breeding for improved food security*. El-Esawi M.A.. Chapter 8, p. 14

Gomes AMF, Rodrigues AP, António C, Rodrigues AM, Leitão AE, Batista-Santos P, Nhantumbo N, Massinga R, Ribeiro-Barros AI, Ramalho JC. 2020. Drought response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces at leaf physiological and metabolite profile levels. *Environmental and Experimental Botany*. 175(2). doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104060.

Gómez C. 2004. COWPEA: Post-Harvest Operations in Developing Countries. Introduction: Economic and Social Impact. Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO). Nicaragua.

Gonçalves A, Goufo P, Barros A, Domínguez-Perles R, Trindade H, Rosa EAS, Ferreira L, Rodrigues M. 2016. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose

crop for a more sustainable agri-food system: Nutritional advantages and constraints. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96(9):2941-2951. doi:10.1002/jsfa.7644.

Gupta AK, Kaur N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*. 30(5):761-776. doi:10.1007/BF02703574.

Gupta RK, Gupta K, Sharma A, Das M, Ansari IA, Dwivedi PD. 2017. Health risks & benefits of Chickpea (*Cicer arietinum*) consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(1):6-22. doi:10.1021/acs.jafc.6b02629.

Hall AE. 2012. Phenotyping cowpeas for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology*. 3(155). doi:10.3389/fphys.2012.00155.

Hall AE, Cisse N, Thiaw S, Elawad HOA, Ehlers JD, Ismail AM, Fery RL, Roberts PA, Kitch LW, Murdock LL, et al. 2003. Development of cowpea cultivars and germplasm by the Bean/Cowpea CRSP. *Field Crops Research*. 82(2-3):103-134. doi:10.1016/S0378-4290(03)00033-9.

Hamidou F, Zombre G, Braconnier S. 2007. Physiological and biochemical responses of cowpea genotypes to water stress under glasshouse and field conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 193(4):229-237. doi:10.1111/j.1439-037X.2007.00253.x.

Hayat I, Ahmad A, Masud T, Ahmed A, Bashir S. 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54(5):580-592. doi:10.1080/10408398.2011.596639.

Hayatu, Mukhtar M. 2010. Physiological Responses of some drought resistant cowpea genotypes (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) to water stress. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 3(2):69 - 75

Henshaw FO. 2008. Varietal differences in physical characteristics and proximate composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *World Journal of Agricultural Sciences*. 4(3):302-306.

Behboudian HM, Qifu M, Turner NC, Palta JA. 2001. Reactions of chickpea to water stress: Yield and seed composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81(13):1288-1291. doi:10.1002/jsfa.939.

Hou A, Chen P, Alloatti J, Li D, Mozzoni L, Zhang B, Shi A. 2009. Genetic variability of seed sugar content in worldwide soybean germplasm collections. *Crop Science*. 49(3):903-912. doi:10.2135/cropsci2008.05.0256.

Hou A, Chen P, Shi A, Zhang B, Wang Y-J. 2009. Sugar variation in soybean seed assessed with a rapid extraction and quantification method. *International Journal of Agronomy*. 2009:1-8. doi:10.1155/2009/484571.

Hunt S. 2003. Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiologic Plantarum*. 117(3):314-325. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.00055.x.

ICRISAT. 2016. Catch the Pulse - Pulses are smart food. Patancheru 502 324, Telangana, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 36

INE. 2021. Balança Alimentar Portuguesa - 2016 - 2020. Instituto Nacional de Estatística. Lisboa - Portugal, 2021.

INE. 2022a. Consumo humano de leguminosas secas per capita (kg/ hab.) por Espécie de leguminosas secas; Anual - Instituto Nacional Estatística, Balanços de aprovisionamento de produtos vegetais. (Acesso a 22 junho 2022).

INE. 2022b. Grau de auto-provisionamento de leguminosas secas (%) por Espécie de leguminosas secas; Anual - Instituto Nacional Estatística, Balanços de aprovisionamento de produtos vegetais (Acesso a 22 junho 2022).

INE - PORDATA. 2022. Superfície das principais culturas agrícolas, Instituto Nacional Estatística - Estatística da Produção Vegetal, PORDATA (Acesso a 22 junho 2022).

IPCC. 2014. Alterações Climáticas 2014: Impactos, adaptação e vulnerabilidade - resumo para decisores. Contribuição do Grupo de Trabalho II para o Quinto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas. Organização Meteorológica Mundial (WMO), Genebra, Suíça. [https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ar5\\_wg2\\_spmport-1.pdf](https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ar5_wg2_spmport-1.pdf).

IPCC. 2019. Climate change and land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems: summary for policymakers. Intergovernmental Panel on Climate Change, WMO, United Nations Environment Programme.

IPCC. 2022. IPCC AR6 Working Group II: Summary for policymakers: Climate change 2022, Impacts, Adaptation and Vulnerability. Implementing a US Carbon Tax: Challenges and Debates.

IPMA. 2022. Boletim Seca Meteorológica-15 março 2022. [https://www.ipma.pt/pt/media/noticias/documentos/2022/Boletim\\_seca\\_IPMA\\_15mar2022.pdf](https://www.ipma.pt/pt/media/noticias/documentos/2022/Boletim_seca_IPMA_15mar2022.pdf)

Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N, Sayyar Khan M. 2006. Nutritional quality of important food legumes. Food Chemistry. 97(2):331-335. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.011.

IRENA, FAO. 2021. Renewable energy for agri-food systems – Towards the sustainable development goals and the Paris agreement. Abu Dhabi e Roma. <https://doi.org/10.4060/cb7433en>. IRENA and FAO.

Iwuagwu M, Ogbonnaya CI. 2017. Physiological response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) to drought: the osmotic adjustment resistance strategy. Academic Journal of Science. 7(2):329-344 <https://www.researchgate.net/publication/326231786>.

Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R. 2009. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. International Journal of Agriculture and Biology. 11(1):100-105.

Jayathilake C, Visvanathan R, Deen A, Bangamuwage R, Jayawardana BC, Nammi S, Liyanage R. 2018. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. Journal of the Science of Food and Agriculture. 98(13):4793-4806. doi:10.1002/jsfa.9074.

Júnior AS de A. 2002. Cultivo do Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Sistemas de Produção - EMBRAPA Meio-Norte. 2(1).

Kalaji H, Guo P. 2008. Chlorophyll fluorescence: A useful tool in barley plant breeding programs. In: Photochemistry Research Progress. Chapter: 12. Publisher: Nova Science Publishers, Inc. Editors: Sanchez A., Gutierrez S.J. p. 439-463.

Kamara AY, Tefera H, Ewansiha SU, Ajeigbe HA, Okechukwu R, Boukar O, Omoigui LO. 2011. Genetic gain in yield and agronomic characteristics of cowpea cultivars developed in the Sudan savannas of Nigeria over the past three decades. Crop Science. 51(5):1877-1886. doi:10.2135/cropsci2010.12.0698.

Kannan ND, Kulandaivelu G. 2011. Drought induced changes in physiological, biochemical and phytochemical properties of *Withania somnifera* Dun. Journal of Medicinal Plants Research. 5(16):3929-3935. doi:10.5897/JMPR.9000462.

Khatun M, Sarkar S, Era FM, Islam AKMM, Anwar MP, Fahad S, Datta R, Islam AKMA. 2021. Drought stress in grain legumes: Effects, tolerance mechanisms and management. *Agronomy*. 11(12):2374. doi:10.3390/agronomy11122374.

Kitch LW, Boukar O, Endondo C, Murdock LL. 1998. Farmer acceptability criteria in breeding cowpea. *Experimental Agriculture*. 34(4):475-486. doi:10.1017/S0014479798004049.

Konica Minolta. 2007. Precise color communication; Color control from perception to instrumentation. Report No.: [http://www.esac.pt/noronha/A.S/10\\_11/ColorCommunication.pdf](http://www.esac.pt/noronha/A.S/10_11/ColorCommunication.pdf).

Konica Minolta CR-400/410. CHROMA METER CR-400/410 E Instruction Manual, [https://sensing.konicaminolta.us/wp-content/uploads/cr-400\\_410\\_instructions\\_eng-lv67varc19.pdf](https://sensing.konicaminolta.us/wp-content/uploads/cr-400_410_instructions_eng-lv67varc19.pdf).

Kopittke PM, Menzies NW, Wang P, McKenna BA, Lombi E. 2019. Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International*. 132. doi:10.1016/j.envint.2019.105078.

Kramer PJ and Boyer JS. 1995. Chapter 10- Photosynthesis and respiration. In: *Water Relations of Plants and Soil*. Academic Press, San Diego. p. 313-343. <http://udspace.udel.edu/handle/19716/2830>

Küchenmeister K, Küchenmeister F, Kayser M, Wrage-Mönnig N, Isselstein J. 2013. Influence of drought stress on nutritive value of perennial forage legumes. *International Journal of Plant Production*. 7(4):693-710.

Laleg K, Barron C, Cordelle S, Schlich P, Walrand S, Micard V. 2017. How the structure, nutritional and sensory attributes of pasta made from legume flour is affected by the proportion of legume protein. *LWT - Food Science and Technology*. 79:471-478. doi:10.1016/j.lwt.2017.01.069.

Laleg K, Barron C, Santé-Lhoutellier V, Walrand S, Micard V. 2016. Protein enriched pasta: Structure and digestibility of its protein network. *Food and Function*. 7(2):1196-1207. doi:10.1039/c5fo01231g.

Lawlor DW. 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. Metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*. 89(7):871-885. doi:10.1093/aob/mcf110.

Lawlor DW, Cornic G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*. 25(2):275-294. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x.

Lee BH, Zhu JK. 2010. Phenotypic analysis of arabidopsis mutants: Electrolyte leakage after freezing stress. *Cold Spring Harbor Protocols*. 5(1). doi:10.1101/pdb.prot4970.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press. 148(C):350-382. doi:10.1016/0076-6879(87)48036-1.

Lichtenthaler HK, Buschmann C, Doll M, Fietz H, Bach T, Kozel U, Meier D, Rahmsdorf U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth Res* 2, 115-141. doi:10.1007/BF00028752.

Lima JR de S, Antonino ACD, Soares WDA, Silva IDF da. 2006. Estimativa da evapotranspiração do feijão caupi utilizando o modelo de Penman-Monteith. *Irriga*. 11(4):477-491. doi:10.15809/irriga.2006v11n4p477-491.

Limantara L, Dettling M, Indrawati R, Indriatmoko, Brotosudarmo THP. 2015. Analysis on the chlorophyll content of commercial green leafy vegetables. *Procedia Chemistry*. 14:225-231. doi:10.1016/j.proche.2015.03.032.

Liu Y, Wu L, Baddeley JA, Watson CA. 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 31(1):155-172. doi:10.1051/agro/2010008.

Lopez FB, Chauhan YS, Johansen C. 1997. Effects of timing of drought stress on leaf area development and canopy light interception of short duration pigeon pea. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 178(1):1-7. doi:10.1111/j.1439-037X.1997.tb00344.x.

Magrini MB, Anton M, Cholez C, Corre-Hellou G, Duc G, Jeuffroy MH, Meynard JM, Pelzer E, Voisin AS, Walrand S. 2016. Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. *Ecological Economics*. 126:152-162. doi:10.1016/j.ecolecon.2016.03.024.

Mamiro P, Mbwaga A, Mamiro D, Mwanri A, Mwanri A, Kinabo J. 2011. Nutritional quality and utilization of local and improved cowpea varieties in some regions in Tanzania. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 11(1). doi:10.4314/ajfand.v11i1.65876.

Mansourifar C, Shaban M, Ghobadi M, Ajirlu AR. 2011. Effect of drought stress and N fertilizer on yield, yield components and grain storage proteins in chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. *African Journal of Plant Science*. 5:634-642.

Martins LMV, Xavier GR, Rangel FW, Ribeiro JRA, Neves MCP, Morgado LB, Rumjanek NG. 2003. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: A strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*. 38(6):333-339. doi:10.1007/s00374-003-0668-4.

Marzinzig B, Brünjes L, Biagioni S, Behling H, Link W, Westphal C. 2018. Bee pollinators of faba bean (*Vicia faba L.*) differ in their foraging behaviour and pollination efficiency. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 264:24-33. doi:10.1016/j.agee.2018.05.003.

Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345):659-668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659.

Mbuma NW, Gerrano AS, Lebaka N, Mofokeng A, Labuschagne M. 2021. The evaluation of a southern African cowpea germplasm collection for seed yield and yield components. *Crop Science*. 61(1):466-489. doi:10.1002/csc2.20336.

McGuire RG. 1992. Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*. 27(12):1254-1255. doi:10.21273/hortsci.27.12.1254.

Medlicott AP, Thompson AK. 1985. Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica L. var Keitt*) by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 36(7):561-566. doi:10.1002/jsfa.2740360707.

Meier U, Bleiholder H, Buhr L, Feller C, Hack H, Heß M, Lancashire P, Schnock U, Stauß R, van den Boom T, et al. 2009. The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants-history and publications. *Journal für Kulturpflanzen*. 61(2):41-52.

Minolta. 1989. Chlorophyll meter SPAD-502. Instruction manual. Osaka, Japan.

Mitra J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science Association*. 80(6):758-763.

- Moaveni P. 2011. Effect of water deficit stress on some physiological traits of wheat (*Triticum aestivum*). *Agricultural Science Research Journal*. 1:64-68.
- Mohammadzadeh A, Majnoonhoseini N, Moghaddam H, Akbari M. 2011. The effect of various water stress and nitrogen levels on the yield and yield components in red beans genotype. *J Agron Sci Iran*. 43(1):29-38.
- Mohammed MS, Russom Z, Abdul SD. 2010. Inheritance of hairiness and pod shattering, heritability and correlation studies in crosses between cultivated cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) and its wild (*var. pubescens*) relative. *Euphytica*. 171(3):397-407. doi:10.1007/s10681-009-0058-6.
- Moreira R, Nunes C, Pais I, Semedo J, Guimarães JB, Simões F, Veloso MM, Scotti-Campos P. 2022. How to improve already improved cowpea—terminal drought. *Biology and Life Sciences Forum*. 11(1):45. doi:10.3390/IECPS2021-11967
- Morel MA, Brana V, Castro-Sowinski S. 2012. Legume Crops, Importance and Use of Bacterial Inoculation to Increase Production. In: *Crop Plant*, A. Goyal (ed.), IntechOpen, London. Chapter: 10. p. 217-240
- Mudryj AN, Yu N, Aukema HM. 2014. Nutritional and health benefits of pulses. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 39(11):1197-1204. doi:10.1139/apnm-2013-0557.
- Munjonji L, Ayisi KK, Boeckx P, Haesaert G. 2018. Stomatal behaviour of cowpea genotypes grown under varying moisture levels. *Sustainability (Switzerland)*. 10(1):12. doi:10.3390/su10010012.
- Muranaka S, Shono M, Myoda T, Takeuchi J, Franco J, Nakazawa Y, Boukar O, Takagi H. 2016. Genetic diversity of physical, nutritional and functional properties of cowpea grain and relationships among the traits. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*. 14(1):67-76. doi:10.1017/S147926211500009X.
- Murdock LL, Seck D, Ntougam G, Kitch L, Shade RE. 2003. Preservation of cowpea grain in sub-Saharan Africa - Bean/Cowpea CRSP contributions. *Field Crops Research*. 82(2-3):169-178. doi:10.1016/S0378-4290(03)00036-4.
- Muzquiz M, Varela A, Burbano C, Cuadrado C, Guillamón E, Pedrosa MM. 2012. Bioactive compounds in legumes: Pronutritive and antinutritive actions. implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*. 11(2-3):227-244. doi:10.1007/s11101-012-9233-9.
- Mwale SE, Ochwo-Ssemakula M, Sadik K, Achola E, Okul V, Gibson P, Edema R, Singini W, Rubaihayo P. 2017. Response of cowpea genotypes to drought stress in Uganda. *American Journal of Plant Sciences*. 8(4):720. doi:10.4236/ajps.2017.84050.
- Nadeem M, Li J, Yahya M, Sher A, Ma C, Wang X, Qiu L. 2019. Research progress and perspective on drought stress in legumes: A review. *International Journal Molecular Sciences*. 20(10):2541. doi:10.3390/ijms20102541.
- Nascimento SP do, Bastos EA, Araújo ECE, Filho FRF, Silva EM. 2011. Tolerance to water deficit of cowpea genotypes. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 15(8):853-860. doi:10.1590/S1415-43662011000800013.
- Nassourou MA, Noubissié TJB, Njintang YN, Bell JM. 2017. Diallel analyses of soluble sugar content in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *The Crop Journal*. 5(6):553-559. doi:10.1016/j.cj.2017.05.005.
- Ngalamu T, Odra J, Tongun N. 2014. Cowpea Production Handbook, Genetic improvement of cowpea for earliness and drought tolerance View project. <https://www.researchgate.net/publication/284900187>.

Nogués S, Baker NR. 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*. 51(348):1309-1317. doi:10.1093/jxb/51.348.1309.

Ntatsi G, Gutiérrez-Cortines ME, Karapanos I, Barros A, Weiss J, Balliu A, Rosa EA dos S, Savvas D. 2018. The quality of leguminous vegetables as influenced by preharvest factors. *Scientia Horticulturae*. 232:191-205. doi:10.1016/j.scienta.2017.12.058.

Nunes C, Moreira R, Pais I, Semedo J, Simões F, Veloso MM, Scotti-Campos P. 2022. Cowpea physiological responses to terminal drought— Comparison between four landraces and a commercial variety. *Plants*. 11(5):593. doi:10.3390/plants11050593.

Obrecht A, Pham-Truffert M, Spehn E, Payne D, de Bremond A, Altermatt F, Fischer M, Passarello C, Moersberger H, Schelske O, et al. 2021. Achieving the SDGs with Biodiversity. *Swiss Academies Factsheet* 16. 16(1).

OECD. 2015. Consensus document of the biology of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology report No.: 60, Environment Directorate, OECD, Paris, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2015\)48 & doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2015)48 & doclanguage=en).

OECD. 2019. Safety assessment of foods and feeds derived from transgenic crops, Volume 3: Common bean, rice, cowpea and apple compositional considerations, Novel Food and Feed Safety. Report No.: OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/f04f3c98-en>.

Olajide AA, Ilori CO. 2017. Genetic variability, performance and yield potentials of ten varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) under drought stress. *Legume Genomics and Genetics*. 8(3):17-25. doi:10.5376/lgg.2017.08.0003.

Oluwatosin OB. 1998. Genetic and environmental variability in starch, fatty acids and mineral nutrients composition in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 78(1):1-11. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199809)78:1<1::AID-JSFA47>3.0.CO;2-H.

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran LSP. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*. 5:86. doi:10.3389/fpls.2014.00086.

Parlamento Europeu. 2018. <https://www.europarl.europa.eu/news/pt/headlines/society/20180905STO11945/os-efeitos-das-alteracoes-climaticas-na-europa-infografia>.

Peoples MB, Hauggaard-Nielsen H, Huguenin-Elie O, Jensen ES, Justes E, Williams M. 2018. The contributions of legumes to reducing the environmental risk of agricultural production. In: *Agroecosystem Diversity: Reconciling Contemporary Agriculture and Environmental Quality*. Academic Press. p. 123-143.

Perez-Escamilla R. 2017. Food security and the 2015 – 2030 Sustainable development goals: From human to planetary health: perspectives and opinions, causes of food insecurity. *Current Developments in Nutrition*. 1(7). doi:10.3945/cdn.117.000513

Pimentel C, Hébert G, da Silva J v. 1999. Effects of drought on O<sub>2</sub> evolution and stomatal conductance of beans at the pollination stage. *Environmental and Experimental Botany*. 42(2):155-162. doi:10.1016/S0098-8472(99)00030-1.

Pinheiro B, Gomes C, Baltazar AL. 2020. O fitato e a biodisponibilidade de ferro nas leguminosas. *Acta Portuguesa de Nutrição*. doi:10.21011/apn.2020.2209.

Pinheiro C, Chaves MM, Ricardo CP. Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of experimental botany*. 52(358):1063-1070. doi:10.1093/jexbot/52.358.1063.

Pirzad A, Shakiba MR, Zehtab-Salmasi S, Mohammadi SA, Darvishzadeh R, Samadi A. 2011. Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(12):2483-2488. doi:10.5897/JMPR.9000503.

PNPOT. 2018. PNPOT - Estratégia e modelo territorial (Programa Nacional da Política de Ordenamento do Território). República Portuguesa - Ambiente.

Pompelli MF, Barata-Luís R, Vitorino HS, Gonçalves ER, Rolim E v., Santos MG, Almeida-Cortez JS, Ferreira VM, Lemos EE, Endres L. 2010. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy*. 34(8):1207-1215. doi:10.1016/j.biombioe.2010.03.011.

PortFIR - INSA. 2022. Tabela da composição de alimentos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Alimentação e Nutrição. versão 5,0 - 2021, Acesso a 28 abril 2022.

Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Maria MA, Cordeiro AT. 2006. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 56(3):263-273. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.02.008.

Pushpavalli R, Zaman-Allah M, Turner NC, Baddam R, Rao M v., Vadez V. 2015. Higher flower and seed number leads to higher yield under water stress conditions imposed during reproduction in chickpea. *Functional Plant Biology*. 42(2):162-174. doi:10.1071/FP14135.

Rai N, Rai KK, Tiwari G, Singh PK. 2015. Changes in free radical generation, metabolites and antioxidant defence machinery in hyacinth bean (*Lablab purpureus* L.) in response to high temperature stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 37(3). doi:10.1007/s11738-015-1791-1.

Ramalho JC, Rodrigues AP, Semedo JN, Pais IP, Martins LD, Simões-Costa MC, Leitão AE, Fortunato AS, Batista-Santos P, Palos IM, et al. 2013. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO<sub>2</sub>]. *PLoS ONE*. 8(12). doi:10.1371/journal.pone.0082712.

Ravelombola W, Mou B, Shi A, Qin J, Weng Y, Bhattarai G, Zia B, Zhou W. 2018. Investigation on various aboveground traits to identify drought tolerance in cowpea seedlings. *HortScience*. 53(12):1757-1765. doi:10.21273/HORTSCI113278-18.

Ravelombola W, Shi A, Chen S, Xiong H, Yang Y, Cui Q, Olaoye D, Mou B. 2020. Evaluation of cowpea for drought tolerance at seedling stage. *Euphytica*. 216(8):1-19. doi:10.1007/s10681-020-02660-4.

Rebello CJ, Greenway FL, Finley JW. 2014. Whole grains and pulses: A comparison of the nutritional and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(29):7029-7049. doi:10.1021/jf500932z.

Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 161(11):1189-1202. doi:10.1016/j.jplph.2004.01.013.

Rejšková A, Patková L, Stodůlková E, Lipavská H. 2007. The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology*. 164(2):174-184. doi:10.1016/j.jplph.2005.09.011.

Richards RA. 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regulation*. 20(2):157-166. doi:10.1007/BF00024012.

Richardson AD, Duigan SP, Berlyn GP. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*. 153(1):185-194. doi:10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x.

Rollins JA, Habte E, Templer SE, Colby T, Schmidt J, von Korff M. 2013. Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Journal of Experimental Botany*. 64(11):3201-3212. doi:10.1093/jxb/ert158.

Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M, Prado FE. 2009. Soluble sugars-metabolism, sensing, and abiotic stress a complex network in the life of plants. *Plant Signaling and Behavior*. 4(5):388-393. doi:10.4161/psb.4.5.8294.

Sá JC de M, Lal R, Cerri CC, Lorenz K, Hungria M, de Faccio Carvalho PC. 2017. Low-carbon agriculture in South America to mitigate global climate change and advance food security. *Environment International*. 98:102-112. doi:10.1016/j.envint.2016.10.020.

Sail MA, Dahot MU, Mangrio SM, Memon S. 2007. Genotype x environment interaction for grain yield of wheat genotypes tested under water stress conditions. *Science International (Lahore)*. 19(2):133-137.

Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi Mm, Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Rosales MA, Romero L, Ruiz JM. 2010. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science*. 178(1):30-40. doi:10.1016/j.plantsci.2009.10.001.

Santos C, Barros G, Santos I, Ferraz M. 2008. Comportamento agrônômico e qualidade culinária de grãos de linhagens de feijão-caupi avaliadas no Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira*. 26(3):404-408. doi:10.1590/S0102-05362008000300023.

Santos FD, Forbes K. 2001. Mudança climática em Portugal. Cenários, impactos e medidas de adaptação. In: Moita R, editor. *SIAM - Sumário executivo e Conclusões*. Lisboa, Portugal: Gradiva.

Saxena NP, Krishnamurthy L, Johansen C. 1993. Registration of a drought-resistant Chickpea germplasm. *Crop Science*. 33(6):1424-1424. doi:10.2135/cropsci1993.0011183x003300060088x.

Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965. Sap pressure in vascular plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*. 148(3668):339-346. doi:10.1126/science.148.3668.339.

Scotti-Campos P, Pham-Thi AT, Smedo JN, Pais IP, Ramalho JC, Matos M do C. 2013. Physiological responses and membrane integrity in three vigna genotypes with contrasting drought tolerance. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 25(12):1002-1013. doi:10.9755/ejfa.v25i12.16733.

Scotti-Campos P, Smedo JN, Pais IP, Oliveira M, Passarinho J, Santos M, Almeida AS, Costa AR, Pinheiro N, Bagorro C, et al. 2015. Physiological responses to drought in four developed *Triticum aestivum* groups. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27(2):178-185. doi:10.9755/ejfa.v27i2.19277.

Sehgal A, Sita K, Kumar J, Kumar S, Singh S, Siddique KHM, Nayyar H. 2017. Effects of drought, heat and their interaction on the growth, yield and photosynthetic function of lentil (*Lens culinaris medikus*) genotypes varying in heat and drought sensitivity. *Frontiers in Plant Science*. 8:1776. doi:10.3389/fpls.2017.01776.

Sekhon HS, Singh G, Sharma P, Bains TS. 2010. Water use efficiency under stress environments. In: Yadav, S., Redden, R. (eds) *Climate Change and Management of Cool Season Grain Legume Crops*. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-90-481-3709-1\_12.

Semedo JN, Rodrigues AP, Lidon FC, Pais IP, Marques I, Gouveia D, Armengaud J, Silva MJ, Martins S, Semedo MC, et al. 2021. Intrinsic non-stomatal resilience to drought of the photosynthetic apparatus in *Coffea spp.* is strengthened by elevated air [CO<sub>2</sub>]. *Tree Physiology*. 41(5):708-727. doi:10.1093/treephys/tpaa158.

Serraj R, Sinclair TR. 2002. Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant, cell and environment*. 25(2):333-341. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00754.x.

Shanko D, Andargie M, Zelleke H. 2014. Interrelationship and path coefficient analysis of some growth and yield characteristics in cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) genotypes. *Journal of Plant Sciences*. 2(2):97-101. doi:10.11648/j.jps.20140202.13.

Shimelis EA, Rakshit SK. 2005. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris L.*) varieties grown in Ethiopia. *LWT - Food Science and Technology*. 38(4):331-338. doi:10.1016/j.lwt.2004.07.002.

Siddhuraju P, Becker K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) seed extracts. *Food Chemistry*. 101(1):10-19. doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.004.

Silim SN, Saxena MC. 1993. Adaptation of spring-sown chickpea to the Mediterranean basin. I. Response to moisture supply. *Field Crops Research*. 34(2):121-136. doi:10.1016/0378-4290(93)90001-4.

Silva VM, Nardeli AJ, Mendes NA de C, Rocha M de M, Wilson L, Young SD, Broadley MR, White PJ, Reis AR dos. 2021. Agronomic biofortification of cowpea with zinc: Variation in primary metabolism responses and grain nutritional quality among 29 diverse genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 162:378-387. doi:10.1016/j.plaphy.2021.02.020.

Silveira JAG, Melo ARB, Viégas RA, Oliveira JTA. 2001. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany*. 46(2):171-179. doi:10.1016/S0098-8472(01)00095-8.

Sílvia F. 2011. Risco cardiovascular na infância e adolescência. *Revista Fatores de Risco*. 26(6):8-13.

Singh B, Singh JP, Shevkani K, Singh N, Kaur A. 2017. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*. 54(4):858-870. doi:10.1007/s13197-016-2391-9.

Singh BB. 2014. *Cowpea: The Food Legume of the 21st Century*. Crop Science Society of America, Wiley. Vol. 164. John Wiley & Sons.

Singh BB, Mai-Kodomi Y, Terao T. 1999. A simple screening method for drought tolerance in cowpea. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 59(2):211-220.

Singh N. 2017. Pulses: an overview. *Journal of Food Science and Technology*. 54(4):853-857. doi:10.1007/s13197-017-2537-4.

Singh SK, Reddy RK. 2011. Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata [L.] Walp.*) under drought. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 105(1):40-50. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.07.001.

Smith LC, Haddad L. 2015. Reducing child undernutrition: Past drivers and priorities for the post-MDG Era. *World Development*. 68(1):180-204. doi:10.1016/j.worlddev.2014.11.014.

Spehar CR, Costa AM. 2012. Conservação de recursos genéticos no Brasil - Biodiversidade e recursos genéticos. In: Costa AM, Spehar CR, Sereno JRB, editors. Vol. 2. Embrapa. Brasília. p. 66–98.

Sreerama YN, Sashikala VB, Pratape VM. 2012. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. *Food Chemistry*. 133(1):156-162. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.011.

Sridhar KR, Seena S. 2006. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* - A comparative study. *Food Chemistry*. 99(2):267-288. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.049.

Stagnari F, Maggio A, Galieni A, Pisante M. 2017. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 4(1):1-13. doi:10.1186/s40538-016-0085-1.

Stoilova T, Pereira G. 2013. Assessment of the genetic diversity in a germplasm collection of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) using morphological traits. *African Journal of Agricultural Research*. 8(2):208-215. doi:10.5897/AJAR12.1633.

Sugimoto M, Goto H, Otomo K, Ito M, Onuma H, Suzuki A, Sugawara M, Abe S, Tomita M, Soga T. 2010. Metabolomic profiles and sensory attributes of edamame under various storage duration and temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(14):8418-8425. doi:10.1021/jf101471d.

Taiz L, Zeiger E. 2002. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany*. 91(6):750–751. doi:10.1093/aob/mcg079.

Taiz L, Zeiger E. 2010. Fisiología vegetal. Cell. doi:10.4995/WRS.2010.7744.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. 2015. *Plant Physiology and Development*, Sixth Edition. Sinauer Associates Incorporated.

Tanan TT, Nascimento MN do, Leite RDS, Guimarães DS. 2017. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in *Physalis angulata* L. leaves using different methodologies. *Journal of Agricultural Science*. 9(11):117. doi:10.5539/jas.v9n11p117.

Tankari M, Wang C, Ma H, Li X, Li L, Soothar RK, Cui N, Zaman-Allah M, Hao W, Liu F, et al. 2021. Drought priming improved water status, photosynthesis and water productivity of cowpea during post-anthesis drought stress. *Agricultural Water Management*. 245. doi:10.1016/j.agwat.2020.106565.

Tchiagam N, Baptiste J, Youmbi E, Njintang NY. 2011. Generation means analysis of seed sucrose content in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.). 3(6):475-480. <https://www.researchgate.net/publication/287823196>.

Teixeira AI, Ribeiro LF, Rezende ST, Barros EG, Moreira MA. 2012. Development of a method to quantify sucrose in soybean grains. *Food Chemistry*. 130(4):1134-1136. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.128.

Timko MP, Ehlers JD, Roberts PA. 2007. Cowpea. In: Schreck S, editor. *Pulses, sugar and tuber crops*. Vol. 3. Chittaranjan Kole. Berlin: Springer -Verlag. p. 49–67.

Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research*. 91(1):37-46. doi:10.1007/s11120-006-9077-5.

Ulemale CS, Mate SN, Deshmukh D v. 2013. Physiological indices for drought tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). World J Agric Sci. 9(2):123-131. doi: 10.5829/idosi.wjas.2013.9.2.1706.

United Nations. 2019. World population prospects 2019 - Highlights. Department of Economic and Social Affairs World Population Prospects 2019. (141).

Valentine AJ, Benedito VA, Kang Y. 2018. Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: From physiology to genomics and beyond. In book: Annual Plant Reviews. Volume 42: Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-Genomic Era. pp. 207-248 doi:10.1002/9781119312994.apr0456.

Vasconcelos IM, Maia FMM, Farias DF, Campello CC, Carvalho AFU, de Azevedo Moreira R, de Oliveira JTA. 2010. Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. Journal of Food Composition and Analysis. 23(1):54-60. doi:10.1016/j.jfca.2009.05.008.

Vasconcelos MW, Gomes AM, Pinto E, Ferreira H, Vieira EDF, Martins AP, Santos CS, Balázs B, Kelemen E, Hamann KT, et al. 2020. The push, pull, and enabling capacities necessary for legume grain inclusion into sustainable agri-food systems and healthy diets. World Review of Nutrition and Dietetics. 121:193-211. doi:10.1159/000507498.

Verbree DA, Singh BB, Payne WA. 2015. Genetics and heritability of shoot drought tolerance in cowpea seedlings. Crop Science. 55(1):146-153. doi:10.2135/cropsci2014.02.0137.

Vogt J v., Naumann G, Masante D, Spinoni J, Cammalleri C, Erian W, Pischke F, Pulwarty R, Barbosa P. 2018. Drought risk assessment and management. A conceptual framework. EUR 29464 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018. doi:10.2760/057223, JRC113937.

Wagg C, O'Brien MJ, Vogel A, Scherer-Lorenzen M, Eisenhauer N, Schmid B, Weigelt A. 2017. Plant diversity maintains long-term ecosystem productivity under frequent drought by increasing short-term variation. Ecology. 98(11):2952-2961. doi:10.1002/ecy.2003.

Wahid A, Rasul E. 2005. Photosynthesis in leaf, stem, flower, and fruit. In: Handbook of photosynthesis. Edited by Mohammad Pessaraki.-2nd ed. Section VIII Photosynthesis in Different Plant Parts. 26

Wang HM, He HC, Wang ZQ. 2013. Biodiversity and ecoadaptability of legumes. In: Advanced Materials Research. Vol. 610–613. Trans Tech Publications, Ltd., pp. 3488-3494. doi:10.4028/www.scientific.net/amr.610-613.3488.

Wang X, Cai X, Xu C, Wang Q, Dai S. 2016. Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. International Journal of Molecular Sciences. 17(10). doi:10.3390/ijms17101706.

Wells ML, Potin P, Craigie JS, Raven JA, Merchant SS, Helliwell KE, Smith AG, Camire ME, Brawley SH. 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. Journal of Applied Phycology. 29(2):949-982. doi:10.1007/s10811-016-0974-5.

Weng Y, Ravelombola WS, Yang W, Qin J, Zhou W, Wang Y-J, Mou B, Shi A. 2018. Screening of Seed Soluble Sugar Content in Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). American Journal of Plant Sciences. 09(07):1455-1466. doi:10.4236/ajps.2018.97106.

Willett W, Rockström J, Loken B, Springmann M, Lang T, Vermeulen S, Garnett T, Tilman D, DeClerck F, Wood A, et al. 2019. Food in the anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. The Lancet. 393(10170):447-492. doi:10.1016/S0140-6736(18)31788-4.

Xing H, Liu DL, Li G, Wang B, Anwar MR, Crean J, Lines-Kelly R, Yu Q. 2017. Incorporating grain legumes in cereal-based cropping systems to improve profitability in southern New South Wales, Australia. *Agricultural Systems*. 154:112-123. doi:10.1016/j.agsy.2017.03.010.

Xiong S, Yao X, Li A. 2013. Antioxidant properties of peptide from cowpea seed. *International Journal of Food Properties*. 16(6):1245–1256. doi:10.1080/10942912.2011.582976.

Xu B, Chang SKC. 2012. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry*. 134(3):1287-1296. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.212.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*. 57:781-803. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444.

Yousif AM. 2014. Soybean grain storage adversely affects grain testa color, texture and cooking quality. *Journal of Food Quality*. 37(1):18-28. doi:10.1111/jfq.12064.

Zegaoui Z, Planchais S, Cabassa C´ ecile, Djebbar R, Belbachir OA, Carol P. 2017. Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. *Journal of Plant Physiology*. 128:26-34. doi:10.1016/j.jplph.2017.07.009

Zhu J, Tremblay N, Liang Y. 2012. Comparing SPAD and at LEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science*. 92(4):645-648. doi:10.4141/CJSS2011-100.

## Anexos

### Publicações:

**Moreira, R.;** Nunes, C.; Pais, I.; Smedo, J.; Guimarães, J.B.; Simões, F.; Veloso, M.M.; Scotti-Campos, P. How to Improve Already Improved Cowpea—Terminal Drought. *Biol. Life Sci. Forum* **2022**, *11*, 45. <https://doi.org/10.3390/IECPS2021-11967>

Nunes, C.; **Moreira, R.;** Pais, I.; Smedo, J.; Simões, F.; Veloso, M.M.; Scotti-Campos, P. Cowpea Physiological Responses to Terminal Drought—Comparison between Four Landraces and a Commercial Variety. *Plants* **2022**, *11*, 593. <https://doi.org/10.3390/plants11050593>