

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUCAS MEDEIROS PEREIRA

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACES VERDES BIOFORTIFICADAS
UTILIZANDO A FENOTIPAGEM POR IMAGEM

Monte Carmelo - MG
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUCAS MEDEIROS PEREIRA

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACES VERDES BIOFORTIFICADAS
UTILIZANDO A FENOTIPAGEM POR IMAGEM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Agronomia, Campus Monte
Carmelo, da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito necessário para a
obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Mascarenhas
Maciel

Monte Carmelo - MG
2020

LUCAS MEDEIROS PEREIRA

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACES VERDES BIOFORTIFICADAS POR MEIO
DO USO DA TÉCNICA DE FENOTIPAGEM POR IMAGEM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Agronomia, Campus Monte
Carmelo, da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito necessário para a
obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Monte Carmelo, 08 de dezembro de 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel
Orientador (a)

Profa. Dra. Ana Carolina Silva Siquieroli
Membro da Banca

Dra. Joicy Vitória Miranda Peixoto
Membro da Banca

Monte Carmelo
2020

Dedico este trabalho à Deus, que me acompanha em todos os momentos em minha vida e aos meus pais e avós, que sempre trabalharam com a agricultura familiar e puderam construir suas vidas com este trabalho digno.

“Lembre-se de que não há fracassos na vida. Há apenas resultados. Se não conseguiu os resultados que queria, aprenda com a experiência, para que no futuro tenha referências para tomar.” Tony Robbins

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido a honra de cursar a graduação em agronomia na UFU, campus Monte Carmelo e ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Iniciei esta graduação em um momento em que eu estava me recuperando de um acidente automobilístico. Mas, fui abençoado e mesmo com diversas dificuldades que enfrentei ao longo do percurso, estou concluindo esta fase em minha vida.

Aos meus pais, minha irmã e meus familiares, que são minha base, pelo apoio e incentivo ao longo da minha graduação. Eles são as minhas referências para a pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador professor doutor Gabriel Mascarenhas Maciel, por todo ensinamento, compartilhamento de experiências e ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho e ao longo da minha graduação. Sinto-me honrado pelas responsabilidades que me foram designadas, servindo como forma única de aprendizagem e treinamento.

À professora doutora Ana Carolina Silva Siqueroli, pelo incentivo e confiança depositada em mim, juntamente com o professor Gabriel, em relação à oportunidade de realizar este trabalho de grande importância e pelos ensinamentos, favorecendo com que eu desenvolvesse habilidades pessoais e profissionais que farão parte da minha vida.

Aos membros do Grupo de Estudos em Melhoramento Genético de Hortaliças (GENHORT), que participaram na realização e sucesso deste trabalho. Dentre alguns, posso citar Alisson Henrique Gama de Oliveira, Aline José da Silveira, Ana Carolina Pires Jacinto, Andressa Alves Clemente e todos os demais que ajudaram de forma direta ou indiretamente. Em especial ao senhor José Marques Vilela, com a sua imensa experiência profissional, gentileza, disposição, cuidado, ajudou na condução deste trabalho.

À minha namorada Neidiele Martins de Souza, que entrou em minha vida durante a elaboração deste trabalho. Agradeço pelo seu apoio, companheirismo e incentivo nesta fase tão importante.

À Universidade Federal de Uberlândia e aos professores que participaram da minha formação, os quais contribuíram de forma ativa na construção do meu conhecimento ao longo desta jornada acadêmica.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pela avaliação do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1 CULTURA DA ALFACE.....	12
3.2 CAROTENOIDES E VITAMINA A.....	13
3.3 FENOTIPAGEM POR IMAGEM	14
3.4 AERONAVES REMOTAMENTE PILOTADAS (ARP`s)	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 VARIÁVEIS ANALISADAS	17
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 AVALIAÇÕES AGRONÔMICAS	19
5.2 ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE OS GENÓTIPOS ANALISADOS	23
5.3 IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MEIO DA FENOTIPAGEM POR IMAGEM	28
6 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

RESUMO

A alface, entre as hortaliças folhosas, é a mais consumida no mundo e a de maior importância econômica e social no Brasil. Pelo fato da alface ser um dos alimentos mais presente na alimentação dos brasileiros, qualquer estratégia que vise potencializar a sua qualidade nutricional pode resultar em vários benefícios para a saúde. Dentre elas, pode-se citar a biofortificação obtida por melhoramento genético convencional, visando altos teores de betacaroteno, uma pró-vitamina A. No entanto, existe dificuldade na seleção de genótipos biofortificados devido às metodologias de quantificação e identificação dos compostos de interesse. Assim, esse trabalho teve como objetivo a aplicação da fenotipagem por imagem visando à seleção de genótipos de alface ricas em betacaroteno. O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, sendo avaliadas 22 linhagens provenientes do Banco de Germoplasma de alface da UFU e três cultivares convencionais como testemunha. A fenotipagem por imagem dos genótipos foi realizada com uma câmera RGB, marca Canon modelo NGB, embarcada no drone modelo Phantom 4. Após a verificação da presença de ampla variabilidade genética entre os materiais analisados por meio das avaliações agronômicas, foi realizado o processamento e análises das imagens obtidas. Como resultado, foi possível a elaboração de uma equação de regressão linear, $G = -0,442 \times SPAD + 116,390$, a qual apresentou coeficiente de determinação igual a 96,9%. Por meio da mesma, percebe-se que a resposta do índice referente aos carotenoides (SPAD) apresenta comportamento inverso ao valor expresso no canal G. Foi possível a seleção da linhagem UFU-206#3#1#1, sendo a que apresentou o maior teor de carotenoides. A utilização da técnica de fenotipagem por imagem foi satisfatória ao permitir a seleção de linhagem com alto teor de carotenoides de forma indireta, comprovando a aplicabilidade da mesma.

PALAVRAS-CHAVE: Geotecnologias; melhoramento genético; biofortificação.

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, sendo a terceira hortaliça em maior volume de produção (ABCSEM, 2014). A alface do tipo crespa possui maior importância econômica em relação aos tipos americana, lisa e romana (SALA; COSTA, 2008; SALA; COSTA, 2012; HORTI & FRUTI, 2019).

O consumo desta hortaliça possibilita uma alimentação mais saudável, visto que a mesma pode auxiliar na prevenção de diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo (MAIANI et al., 2009; ROCHA; REED, 2014).

Uma forma de enriquecer nutricionalmente a dieta alimentar é por meio da utilização de técnicas de biofortificação. Tal processo pode ser obtido em programas de melhoramento genético convencional ou com a utilização de técnicas de biotecnologia/transgenia. Na biofortificação ocorre o enriquecimento nutricional de micronutrientes e vitaminas, resultando em um alimento que atenderá melhor às exigências nutricionais (LOUREIRO et al., 2018).

Os carotenoides podem ser utilizados na biofortificação pois são responsáveis por benefícios à saúde (SOUZA et al., 2007; CASSETARI et al., 2015), e nos vegetais são os precursores da vitamina A (SILVA; MURA, 2010).

Várias pesquisas demonstram que há possibilidade de obtenção de genótipos de alface com elevados teores de carotenoides (SILVA et al., 2007; CASSETARI et al., 2015; SILVEIRA et al., 2019; MACIEL et al., 2020a, MACIEL et al., 2020b). No entanto, apesar da relevância dos alimentos biofortificados, há poucas pesquisas visando desenvolver cultivares de alfaces ricas em carotenoides no mundo. Um dos grandes entraves para o sucesso dos programas de melhoramento visando a obtenção de genótipos de alface ricos em carotenoides está relacionado ao alto custo para analisar o constituinte presente nas folhas.

Cassetari et al. (2015) observaram uma alta correlação positiva entre carotenoides e clorofila de 0,69. A determinação do teor de clorofila pode ser obtida por meio do medidor SPAD. Souza et al. (2011) elucidou que há eficiência na estimativa do teor de clorofila por meio do SPAD. Sendo assim, torna-se possível determinar o teor de carotenoides por meio da mesma técnica.

O SPAD permite a medição e leitura de forma indireta do teor de clorofila em função do cálculo da quantidade de luz transmitida pela folha nos comprimentos de ondas 650 nm e 940 nm. As moléculas de clorofila absorvem a luz no comprimento de onda de 650 nm

(SWIADER; MOORE, 2002). Em programas de melhoramento genético, são obtidos milhares de genótipos, os quais demandam um oneroso tempo para a coleta de resultados em relação ao teor de clorofila, inviabilizando o operacional para a realização de tais procedimentos. Dessa forma, é necessária uma técnica que permita a determinação de pigmentos foliares de forma rápida, objetiva e com custo acessível.

A utilização de técnicas de fenotipagem por imagem tem sido cada vez mais empregada em programas de melhoramento genético vegetal (BRISSON et. al., 2010; SOUSA et. al., 2015), e em trabalhos relacionados especificamente à cultura da alface (MACIEL et al, 2019; MACIEL et al., 2020a), possibilitando a implementação de novas tecnologias que aumentem a acurácia e a rapidez em quantificações e mensurações fenotípicas. Tais técnicas buscam determinar valores qualitativos e/ou quantitativos das características em estudo e correlacioná-las ao desempenho de um genótipo em determinado ambiente (DHONDT et al., 2013). A fenotipagem de plantas tem sido associada a análises ópticas não destrutivas de características vegetais, principalmente com o uso de imagens, (WALTER et al., 2015). As técnicas utilizadas atualmente em fenômica de plantas abrangem diversas áreas da ciência, incluindo a espectroscopia, com a geração de imagens (SOUSA et. al., 2015).

As Aeronaves Remotamente Pilotadas (ARP's), também denominadas “drones”, permitem a coleta de imagens de alta resolução espacial da vegetação e também de alta resolução temporal, possibilitando o monitoramento em tempo quase real de campos de experimentação agrícola. Essas aeronaves podem embarcar diversos tipos de câmaras com sensores que capturam desde o espectro eletromagnético visível até o espectro do infravermelho, possibilitando diversas análises das características vegetais (SOUSA et al., 2015). Essa combinação entre a alta resolução espacial e temporal é um dos principais atrativos para o emprego dessa tecnologia na fenotipagem de alfaces.

Trabalhos relacionados com a reflectância vegetal procuraram buscar relações com características específicas de plantas como estimativa de área com plantio de soja (ANTUNES et al., 2012), estimativa e mapeamento de áreas com culturas de soja e milho (JOHANN et al., 2012), fenotipagem com o uso de índices de vegetação para a seleção de genótipos superiores de capim-elefante (OLIVEIRA et al., 2019) e uso de imagens digitais para a caracterização de progêniens de maracujazeiro azedo (ROSAS et al., 2019), entre outros. Estudos realizados por Maciel et al. (2019) e Maciel et al. (2020a) obtiveram respostas satisfatórias em relação a seleção de forma indireta de caracteres de interesse utilizando imagens em cultivares de alface. Porém, percebe-se escassez de trabalhos que relacionam tal inferência de informações com

hortaliças, evidenciando a necessidade de mais pesquisas nesta área em questão, possibilitando um maior desenvolvimento da cultura da alface.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Utilização de técnica de sensoriamento remoto para a seleção de linhagens de alface com potencial agronômico e com diferentes níveis de carotenoides por meio da fenotipagem por imagens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar parâmetros coletados em campo com o auxílio do equipamento clorofilômetro modelo Minolta SPAD-502 CFL1030 (teores de SPAD/carotenoides) com as informações espectrais das imagens coletadas com a Aeronave Remotamente Pilotada (ARP).
- Analisar os resultados do modelo gerado com as amostras coletadas para validação e verificação do nível de correlação entre as informações geradas.
- Verificar a possibilidade da utilização do modelo de fenotipagem por imagem gerado para áreas onde há uma grande produção de alface, como em campos de cultivos nos Cinturões Verdes da região metropolitana do estado de São Paulo, por exemplo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CULTURA DA ALFACE

A alface (*Lactuca sativa* L.) é originária da Bacia do Oriente Médio e pertence à família Asteraceae (VRIES, 1997). Essa hortaliça folhosa é consumida preferencialmente in natura devido às suas propriedades organolépticas (SILVEIRA, 2016), como é o caso da cor e textura crocante das folhas (CAMPO & NEGÓCIOS, 2014). Consequentemente, devido ao aumento crescente da população mundial, tem-se elevado o consumo desta folhosa, sendo que o aumento na produção deve acompanhar tal consumo, conforme aponta Silveira et al. (2015).

A alface é cultivada em grande escala no Brasil, sendo considerada a principal folhosa, ocupando uma área de aproximadamente 35000 hectares (SALA; COSTA, 2012; MOREIRA et al., 2014; SOUSA et al., 2014). Conforme o balanço apresentado pela Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2014), no cenário nacional de produção de hortaliças, a alface apresenta grande volume de produção, perdendo apenas para as culturas da melancia e do tomate, representando grande importância econômica para o setor (IBGE, 2017).

Segundo dados fornecidos pela HORTI & FRUTI (2019) as áreas com cultivo de alface em 2019 representaram cerca de 86,8 mil hectares, resultando em um volume produzido de 575,5 mil toneladas. O impacto positivo desta cultura em relação à comercialização movimenta cerca de oito bilhões de reais no varejo. A produção pode ser estimada em mais de 1,5 milhões de toneladas anuais (ABCSEM, 2015).

A cultura da alface apresenta possibilidade de cultivo ao longo de todo o ano, sendo que tal produção é viabilizada devido à disseminação de técnicas de cultivos como a hidroponia, permitindo suprir a demanda e exigências da cultura durante o ano e em diversas regiões do território brasileiro. Além disso, devido ao seu consumo em nível mundial, a mesma é produzida em todos os continentes (CARVALHO; SILVEIRA, 2017).

Quanto aos tipos de alfaces produzidas, destacam-se atualmente no mercado diversas variedades, dentre as quais: Americana, também conhecida como repolhuda crespa, que possui folhas com aspecto crespo e nervuras em destaque, formando a chamada “cabeça”; Lisa, que não apresenta a formação da “cabeça”, mas apresenta folhas macias e lisas; Crespa, com as folhas crespas e soltas; Mimosa, apresentando folhas delicadas e “arrepiadas” e a alface Romana que apresenta folhas consistentes, alongadas e nervuras protuberantes (CARVALHO; SILVEIRA, 2017). A alface do tipo crespa possui maior importância econômica em relação aos tipos americana, lisa e romana (SALA; COSTA, 2008; SALA; COSTA, 2012; HORTI & FRUTI, 2019).

3.2 CAROTENOIDES E VITAMINA A

O consumo de alface pode auxiliar na prevenção de diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo (MAIANI et al., 2009, ROCHA; REED, 2014). Os carotenoides, presentes em alimentos como cenoura, batata doce, abóbora, buriti, dentre outros, são compostos bioativos, sendo responsáveis por maior parte destes benefícios à saúde (SOUZA et al., 2007; FIEDORK; BURDA, 2014). Esses compostos são precursores da vitamina A, apresentando funções de fortalecimento do sistema imunológico e diminuição dos riscos de doenças degenerativas (SILVA; MURA, 2010).

A vitamina A de maneira geral apresenta papel importante em relação à visão. Ela participa na composição dos pigmentos maculares, que são responsáveis pela cor amarela e são protetores dos olhos (MESQUITA; TORQUILHO, 2016). Outro benefício é a redução da chance de ocorrência de doenças oculares como a catarata, que causa opacificação da região do cristalino, fazendo com que a visão se torne cada vez menos nítida (STRINGHETA, 2006).

Os carotenoides, juntamente com as vitaminas, apresentam características antioxidantes. Esses são responsáveis pelo poder curativo e preventivo de algumas doenças como distúrbios de fotossensibilidade (eritema, erupção polimorfa à luz, protoporfiria eritopoiética), doenças cardiovasculares, diabetes, câncer (cólon, esofágico, bucal, faringe e laringe), distúrbios neurológicos, dentre outros. (SKIBSTED, 2012; MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017).

Pesquisas demonstram que há possibilidade de obtenção de genótipos de alface ricos em carotenoides por meio de programas de melhoramento genético (SILVA et al., 2007; CASSETARI et al., 2015). Tal processo justifica-se pelo fato de que a folhosa apresenta elevado consumo e preço acessível, tornando viável o consumo e a produção deste alimento enriquecido. Além disso, esses programas possibilitam que a população tenha acesso a alimentos biofortificados sem exigir mudanças de seus hábitos alimentares (SALA, 2011, LOUREIRO et al., 2018), pois a melhoria nutricional é realizada no alimento habitualmente consumido na região.

A determinação do teor de carotenoides em programas de melhoramento genético apresenta dificuldades, visto que os mesmos podem sofrer processos de isomerização e oxidação durante a análise destrutiva ou durante a estocagem da amostra, para a posterior análise (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Além disso, há um alto custo para a análise do constituinte de interesse nas folhas (EMBRAPA, 2015).

A biofortificação da alface é viabilizada devido ao fato de que o controle genético dos betacarotenos em alface possui alta herdabilidade (84%) e, portanto, pode ser potencializado via melhoramento genético (CASSETARI et al., 2015). Estes mesmos autores observaram uma alta correlação entre os teores de carotenoides e os teores de clorofila, possibilitando a mensuração de forma indireta dos teores de carotenoides pelo índice SPAD. Porém, geralmente em programas de melhoramento genético, trabalha-se com uma grande quantidade de genótipos em extensas áreas, o que implica em demorada coleta de resultados, inviabilizando o operacional para esta técnica (MACIEL et al., 2019).

3.3 FENOTIPAGEM POR IMAGEM

Atualmente existe a necessidade de desenvolvimento e implementação de novas tecnologias que aumentem a acurácia e a rapidez em quantificações e mensurações fenotípicas em programas de melhoramento genético. Pesquisas demonstram que haverá aumento significativo em relação à demanda mundial por alimentos no período de 2005 a 2050, gerado pelo aumento da densidade populacional e melhorias na qualidade da alimentação da população, principalmente em países desenvolvidos (TILMAN et al. (2011).

Os programas de melhoramento genético de plantas, para acompanharem a demanda crescente de produção de alimentos, necessitam ampliar suas bases genéticas de prospecção e obter novas técnicas para uma maior rapidez em mensurações de características fenotípicas de interesse agrícola e econômico, de forma a agregar tais características em genótipos superiores. Formas tradicionais de prospecção de novos genótipos de interesse, como análise de diversidade genética entre indivíduos em um grupo, são utilizadas para a seleção de materiais de interesse (LIU et al., 2013, CORTES et al., 2017).

Técnicas tradicionais de fenotipagem estão se tornando onerosas, visto que para a obtenção de novas cultivares, trabalha-se com elevado número de indivíduos e há complexidade em relação às características avaliadas e mensuradas, dificultando a caracterização dos indivíduos de uma população. Tal fato baseia-se na informação de que as técnicas tradicionais de fenotipagem utilizam-se de mensurações individuais das características das plantas, como peso de frutos e características morfológicas (SOUZA et al., 2015).

Os programas de melhoramento genético na atualidade estão buscando a utilização de novas metodologias e técnicas que possibilitem o aumento da acurácia e rapidez das

mensurações fenotípicas. Isso permite ampla caracterização de materiais com base no fenótipo de um organismo tornando possível a seleção de genótipos superiores em menor tempo (SANTOS; YASSITEPE, 2014).

Como exemplo destas tecnologias existe a fenotipagem por imagem de plantas em larga escala e de alta precisão. Essa técnica também é chamada de fenômica. Tal ciência utiliza técnicas de aquisição de imagens de determinados fenótipos em larga escala e dimensão, reduzindo o tempo gasto nos procedimentos para a obtenção das informações e conferindo a possibilidade de ampla análise de genótipos de interesse. Esse método gera grande quantidade de dados em menor intervalo de tempo em comparação com o uso de técnicas tradicionais de fenotipagem. (FIORANI; SCHURR, 2013, SOUSA et al., 2015). Conjuntamente, há a possibilidade de determinação de valores qualitativos e/ou quantitativos das características em estudo, sem a necessidade do uso de análises destrutivas de características vegetais, podendo correlacioná-las ao desempenho do genótipo em determinado ambiente (FURBANK; TESTER, 2011; DHONDT et al., 2013; FIORANI; SCHURR, 2013; WALTER et al., 2015).

Segundo Araus et al. (2015), as técnicas de fenotipagem por imagem em grande escala requerem um caráter de conhecimento multidisciplinar, para que seja possível a obtenção de melhores resultados. Tecnologias nas áreas de robótica, sistemas para captura e processamento de imagens e a disseminação das Aeronaves Remotamente Pilotadas (ARP) permitem a intercomunicação entre estas diversas áreas englobadas pela fenotipagem da nova geração (FURBANK; TESTER, 2011; SANTOS; YASSITEPE, 2014; SOUSA et al., 2015).

3.4 AERONAVES REMOTAMENTE PILOTADAS (ARP's)

A modernização da agricultura contribuiu para o surgimento de tecnologias automatizadas, capazes de realizar inferências de informações acerca das culturas sem a necessidade de contato direto com as mesmas. Além disso, a captura remota das informações permite diminuição no tempo da aquisição de dados e redução no emprego de técnicas de caráter destrutivo das plantas (ANSELMI, 2012; LAJÚS, 2018).

O surgimento das Aeronaves Remotamente Pilotadas (ARP's) possibilitou a aquisição de imagens de extensas áreas com maior rapidez em relação às técnicas convencionais (PRIMICERIO, 2012). O uso das ARP's se fortaleceu pelos avanços na tecnologia da

computação e desenvolvimento de sistemas globais de navegação e geoprocessamento, além do embarque de sensores e recursos de imagem eficientes e precisos, permitindo a captura de imagens para o posterior processamento e aferimento de informações de interesse (ANDRADE, 2016).

Dentre algumas vantagens apresentadas pelos ARP's, pode-se citar a flexibilidade de uso em frente à diversas situações e a capacidade do sobrevoo mais próximo à superfície terrestre. Essa característica permite maior detalhamento dos alvos de interesse e maior segurança do operador. Esta segurança deve-se ao fato de que o mesmo consegue realizar a pilotagem da aeronave remotamente (JORGE et al., 2011; EID et al., 2013; SILVA et al., 2015; ANAC, 2017).

As aeronaves podem embarcar diversos tipos de câmaras com sensores que capturam desde o espectro eletromagnético visível até o espectro do infravermelho, possibilitando diversas análises das características vegetais (SOUZA et al., 2015). A combinação entre a alta resolução espacial e temporal é um dos principais atrativos para o emprego dessa tecnologia na fenotipagem de alfaces.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo (18°42'43,19" S; 47°29'55,8" O; 873 m de altitude). Os genótipos caracterizados fazem parte do Programa de Melhoramento Genético de Alface Biofortificada da UFU.

Foram avaliadas 22 linhagens de alface provenientes da hibridação entre as cultivares Pira 72 *versus* Uberlândia 10000, rica em carotenoides (SOUZA et al., 2007), seguido de seis sucessivas autofecundações realizadas entre 2013 a 2017. O método de melhoramento utilizado para a obtenção das linhagens foi o genealógico. Foram utilizadas como testemunhas as cultivares: cv. Grand Rapids, UFU-Biofort e Uberlândia 10000 (SOUZA et al., 2007) totalizando 25 tratamentos.

A semeadura foi realizada em março de 2018. As mudas foram produzidas em bandejas de poliestireno expandido com 200 células preenchidas com substrato comercial a base de fibra de coco. Após a semeadura, as bandejas permaneceram em casa de vegetação do tipo arco, com dimensões de 5 m x 6 m e pé direito de 3,5 metros coberta com filme de polietileno transparente

de 150 micra, aditivado contra raios ultravioleta, e cortinas laterais de tela branca anti-afídeos. Aos 30 dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para canteiros definitivos em campo. Os canteiros foram formados, utilizando rotoencanteirador, com 1,30 m de largura. Os tratos culturais foram realizados conforme preconizado para o cultivo de alface (FILGUEIRA, 2013).

Cada parcela do experimento foi composta por 16 plantas, separadas em quatro fileiras por canteiro em espaçamento de 0,25 m x 0,25 m, sendo avaliadas as oito plantas centrais. A colheita ocorreu aos 35 dias após o transplantio e as plantas foram levadas para o laboratório.

4.1 VARIÁVEIS ANALISADAS

A massa fresca total foi obtida pela pesagem de todas as folhas externas. O diâmetro do caule foi avaliado com auxílio de um paquímetro. O número de folhas comerciais foi determinado a partir da contagem de folhas superiores a 5 cm de comprimento. O diâmetro da planta foi avaliado por meio de uma régua e expresso em centímetros. A temperatura foliar foi obtida a partir do posicionamento de um termômetro infravermelho (modelo 4000.4GL, Everest Interscience, Tucson, AZ, USA), sendo amostradas as folhas superiores e procurando-se apontar o sensor na posição central da superfície foliar.

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método descrito por Francis (1982). Foram coletadas folhas do terço médio de quatro plantas da parte central de cada parcela e as mesmas foram processadas. Posteriormente, pesou-se 0,5 g de amostra triturada e homogeneizada, transferiu-se para um balão volumétrico de 25 ml e adicionou-se uma solução extratora de etanol 95% e ácido clorídrico 1,5 N na proporção 85:15. A amostra foi homogeneizada e os balões foram envolvidos com papel alumínio e posteriormente colocados numa incubadora B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) Limatec a temperatura constante de 25 °C por 24 horas. Na sequência, foi feita a leitura da absorbância no comprimento de onda de 535 nm. A concentração de pigmentos antociânicos foi realizada baseada na absorbância, segundo a equação: $At = (Ab * f) / \varepsilon$. Em que At: antocianinas, mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹ de massa fresca; Ab: absorbância; f: fator de diluição (0,02); ε: coeficiente de absorvividade molar da cianidina (98,2). Os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo 100⁻¹ massa fresca.

O índice SPAD/carotenoides (CASSETARI et al., 2015) foi obtido pelo valor médio após coletar os dados das quatro plantas centrais de cada parcela. Para tal procedimento, foi utilizado o equipamento clorofilômetro modelo Minolta SPAD-502 CFL1030. Também foi realizada a contagem dos dias para pendoamento após semeadura (DPS).

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F ($p \leq 0,05$). As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Em seguida, foram realizadas análises multivariadas de dissimilaridade genética entre os genótipos pela distância generalizada de Mahalanobis (D_{II}^2). A divergência genética foi representada por um dendrograma obtido pelo método hierárquico *Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA) e pelo método de otimização Tocher. A validação do agrupamento pelo método UPGMA foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (CCC) calculado pelo teste de Mantel (1967). A contribuição relativa dos caracteres quantitativos foi calculada segundo critério de Singh (1981). Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se o *software* Genes (CRUZ, 2016).

Além de realizar a metodologia convencional para determinar o teor de carotenoides proposta por Cassetari et al. (2015) a partir do índice SPAD/carotenoides, foi realizado a fenotipagem por imagem dos mesmos genótipos com a utilização de imagens aéreas. Essas imagens foram coletadas por uma Aeronave Remotamente Pilotada (ARP), modelo Phantom 4 Advanced, com uma câmara de 20 megapixels. Os parâmetros utilizados no voo foram: altura de 20 m, sobreposição longitudinal de 80% e sobreposição lateral de 75%. O voo foi realizado de modo automático com o software proprietário DroneDeploy. Com as imagens obtidas foi gerada uma ortofoto com GSD (Ground Sample Distance- relação entre a altura de voo e o nível de detalhamento do terreno) de 1 cm, com o programa Pix4d.

Em cada parcela foi realizada a segmentação manual das alfaces e separado o canal verde com o software ImageJ v. 1.52. Dessa segmentação, foi calculada a média dos valores de intensidade do canal verde (G) e realizada a correlação com os valores de SPAD utilizando o software SIGMA PLOT, ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÕES AGRONÔMICAS

Conforme pode ser observado na Tabela 1, por meio do teste F ($p \leq 0,05$), verificou-se diferença significativa para as variáveis respostas analisadas, exceto para temperatura foliar e teor de antocianina.

Tabela 1. Médias referentes à massa fresca (MF), diâmetro de caule (DC), número de folhas (NF), diâmetro de planta (DP), temperatura foliar (TF), teor de antocianina (TAC), dias para pendoamento após semeadura (DPS) e índice SPAD/carotenoides (SPAD), em linhagens de alface do tipo crespa.

Linhagens ¹	MF (g)	DC (cm)	NF	DP (cm)	TF (°C)	TAC	DPS (dias)	SPAD	SR ² (%)
UFU-206#1#6#1	220,1 b	2,0 b	18,0 c	25,4 c	20,0 a	19,1 a	68,7 c	22,8 c	30,87
UFU-189#3#1#1	180,8 c	2,3 a	25,1 a	24,4 c	19,5 a	22,1 a	88,0 b	26,6 b	52,29
UFU-197#3#1#1	144,2 c	2,3 a	16,9 c	24,6 c	18,4 a	20,1 a	81,7 b	22,8 c	30,76
UFU-125#1#1#1	196,2 c	2,5 a	22,1 b	24,9 c	19,9 a	14,5 a	82,7 b	17,0 f	-2,52
UFU-7#1#2#1	196,4 c	1,9 b	24,4 b	24,2 c	20,3 a	16,8 a	94,7 a	23,4 c	34,19
UFU-155#1#1#1	277,7 a	2,5 a	26,0 a	30,5 a	19,3 a	16,6 a	64,0 d	16,8 f	-4,01
UFU-120#1#1#1	165,6 c	2,2 b	17,3 c	25,2 c	19,1 a	12,3 a	71,0 c	15,0 f	-14,15
UFU-189#1#2#1	139,0 c	2,1 b	26,3 a	23,6 c	18,5 a	13,1 a	87,0 b	26,8 b	53,26
UFU-197#2#1#1	134,8 c	2,3 a	23,2 b	24,2 c	19,8 a	19,4 a	104,0 a	23,2 c	32,93
UFU-199#3#1#1	127,3 c	1,9 b	20,5 c	22,7 c	20,6 a	19,2 a	87,3 b	23,1 c	32,30
UFU-206#1#1#1	172,2 c	2,0 b	18,4 c	23,1 c	19,4 a	16,9 a	80,0 b	21,3 d	21,76
UFU-206#3#1#1	220,7 b	2,5 a	27,7 a	24,3 c	20,9 a	12,4 a	77,0 c	29,7 a	69,93
UFU-197#1#1	148,2 c	2,3 a	25,4 a	23,3 c	20,9 a	13,7 a	94,7 a	26,6 b	52,06
UFU-197#2#2#1	155,3 c	2,5 a	22,0 b	24,1 c	20,3 a	20,2 a	96,0 a	24,1 c	37,86
UFU-155#1#2#1	244,0 b	2,5 a	19,8 c	26,2 b	20,9 a	17,0 a	89,3 b	16,1 f	-8,08
UFU-189#3#4#1	172,9 c	2,5 a	24,3 b	23,7 c	18,1 a	21,0 a	85,7 b	26,1 b	49,54
UFU-206#1#4#1	186,9 c	2,4 a	15,9 c	23,2 c	19,9 a	15,7 a	78,3 c	20,5 d	17,30
UFU-125#2#2#1	143,3 c	2,0 b	23,7 b	22,2 c	20,6 a	14,7 a	89,7 b	22,5 c	28,75
UFU-206#1#2#1	164,9 c	2,0 b	14,9 c	21,5 c	19,5 a	17,5 a	74,0 c	21,4 d	22,62
UFU-189#3#2#1	185,6 c	2,3 a	25,1 a	25,9 b	21,2 a	17,5 a	90,7 b	24,1 c	37,86
UFU-206#1#5#1	239,8 b	2,6 a	17,2 c	23,7 c	19,4 a	20,0 a	72,0 c	25,4 b	45,70
UFU-040#5#5#1	176,3 c	2,3 a	18,5 c	27,5 b	19,0 a	15,2 a	53,0 e	18,9 e	8,02
UFU-Biofort	267,2 a	2,0 b	16,1 c	27,7 b	21,2 a	19,8 a	81,0 b	28,6 a	63,46
cv. Grand Rapids	313,4 a	2,6 a	17,5 c	29,8 a	19,9 a	23,0 a	64,0 d	17,5 f	0,00
cv. Uberlândia 10000	275,4 a	2,2 a	28,5 a	26,9 b	20,2 a	18,2 a	83,0 b	19,0 e	8,53
Média geral	193,9	2,3	21,4	24,9	19,9	17,4	81,5	22,4	30,87
CV(%)	18,86	12,27	9,77	7,98	8,38	28,84	6,76	6,27	
Ks	0,20	0,06	0,20	0,20	0,20	0,20	0,01	0,20	
F	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	
F''	0,02	0,09	0,85	0,93	0,12	0,07	0,49	0,25	

¹Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 0,05 de significância. ²(SR) Superioridade relativa das linhagens em relação à testemunha cv. Grand Rapids quanto à variável índice SPAD/carotenoides. Ks, F, F": pressuposições dos testes Kolmogorov- Smirnov, Levene e Aditividade de Blocos; valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal, variâncias homogêneas e efeitos aditivos.

Em relação à variável massa fresca, observou-se que a linhagem UFU-155#1#1#1 (277,7 g) se destacou em relação às demais, assemelhando-se às testemunhas UFU-Biofort (267,2 g), cv. Grand Rapids (313,4 g) e cv. Uberlândia 10000 (275,4 g). Adicionalmente, as linhagens UFU-206#1#6#1 (220,1 g), UFU-206#3#1#1 (220,7 g), UFU-155#1#2#1 (244,0 g) e UFU-206#1#5#1 (239,8 g) apresentaram valores medianos em relação às demais linhagens que apresentaram os menores valores de massa fresca (Tabela 1). Estes resultados foram superiores aos encontrados por Mógor & Câmara (2007) e Santos et al. (2009) e similares a diversas pesquisas já realizadas (Blat et al., 2011; Diamante et al., 2013; Suinaga et al., 2013; Ziech et al., 2014; Brzezinski et al., 2017). Esse resultado é indicativo de que as linhagens apresentam padrão comercial. Porém, no trabalho realizado por Sousa et al. (2018), foram encontrados valores superiores em relação ao atual trabalho (350,3; 354,0; 370,3 g planta⁻¹ de massa fresca, respectivamente, para as cultivares Isabela, Thaís e Vanda). Essas variações podem ser reflexo de formas diferentes de expressão do potencial genético em função de condições ambientais presentes nas áreas em que os trabalhos foram realizados (NESPOLI et al., 2009; QUEIROZ et al., 2014) ou devido à época de cultivo adotada (et al., 2016).

Para o diâmetro de caule, as linhagens UFU-189#3#1#1 (2,3 cm), UFU-197#3#1#1 (2,3 cm), UFU-125#1#1#1 (2,5 cm), UFU-155#1#1#1 (2,5 cm), UFU-197#2#1#1 (2,3 cm), UFU-206#3#1#1 (2,5 cm), UFU-197#1#1 (2,3 cm), UFU-197#2#2#1 (2,5 cm), UFU-155#1#2#1 (2,5 cm), UFU-189#3#4#1 (2,5 cm), UFU-206#1#4#1 (2,4 cm), UFU-189#3#2#1 (2,3 cm), UFU-206#1#5#1 (2,6 cm), UFU-040#5#5#1 (2,3 cm), juntamente com as testemunhas cv. Grand Rapids (2,6 cm) e cv. Uberlândia 10000 (2,2 cm) apresentaram os maiores diâmetros em relação às demais. A testemunha UFU-Biofort (2,0 cm) apresentou o menor diâmetro de caule, assemelhando-se às demais linhagens que não foram citadas anteriormente (Tabela 1).

Valores médios de diâmetro de caule (2,4 cm e 2,5 cm) semelhantes aos obtidos neste estudo foram observados no trabalho desenvolvido por Brzezinski et al. (2017). Já Sousa et al. (2018), avaliaram cultivares onde foi observado que o diâmetro médio das mesmas foi em torno de 2,7 cm. Adicionalmente, Lima et al. (2016) verificaram que os diâmetros das cultivares Brida e Cristal na região de Jataí – GO, assumiram valores de 2,9 e 3,0 cm, respectivamente. O fato

de ocorrer diferenças em relação ao diâmetro do caule está relacionado às variações das condições genéticas e ambientais, como em relação à temperatura ou disponibilidade hídrica, que influenciam nesta variável e também em outros caracteres como massa fresca, número de folhas e diâmetro de plantas e também potencial e expressão genética (NESPOLI et al., 2009; QUEIROZ et al., 2014; SOUSA et al., 2018).

As linhagens UFU-189#3#1#1 (25,1), UFU-155#1#1#1 (26,0), UFU-189#1#2#1 (26,3), UFU-206#3#1#1 (27,7), UFU-197#1#1 (25,4), UFU-189#3#2#1 (25,1) e a testemunha cv. Uberlândia 10000 (28,5) apresentaram os maiores valores em relação ao número de folhas em comparação as testemunhas UFU-Biofort (16,1) e cv. Grand Rapids (17,5) (Tabela 1). Cometti; Galon; Bremenkamp (2019); Rech et al. (2019) verificaram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para o número de folhas em cultivares de alface avaliadas. Os primeiros autores obtiveram valores para a cultivar Babá de Verão (26,5 folhas), Vitória de Santo Antão (29,0 folhas) e Salad Bowl (25,0 folhas), enquanto os segundos observaram 30,2 folhas na cultivar Lucy Brown.

Cada cultivar de alface apresenta seu próprio potencial de expressão para o número de folhas, portanto, diferenças em relação à esta variável podem ser observadas (OLIVEIRA et al. 2004). Vale destacar que a variável é importante devido ao fato de que esta é a parte de interesse consumida e a mesma apresenta papel fundamental na produção de fotoassimilados, dentre outras funções para a planta.

Em relação ao diâmetro de planta, foi observado que apenas a linhagem UFU-155#1#1#1 (30,5 cm), apresentou o maior diâmetro comparando-se com as demais, exceto para a testemunha cv. Grand Rapids (29,8 cm), que estatisticamente apresentou valor semelhante (Tabela 1). Sousa et al. (2018) avaliaram a produção de alface crespa na região de Jataí-GO, observaram diâmetros médios de planta em torno de 23,9 cm. Esse valor médio obtido foi inferior ao valor de 24,9 cm observado no presente estudo. Valores semelhantes de diâmetros também foram observados por Maciel et al. (2019), porém, foi possível verificar que o maior diâmetro de planta encontrado foi de 27,2 cm referente à linhagem UFU-199#6#1#1, diferindo do valor de 30,5 cm observado na linhagem UFU-155#1#1#1 neste estudo. O diâmetro de planta pode ser influenciado por fatores externos como a intensidade de radiação solar incidida sobre as folhas, pela temperatura e pelo espaçamento de plantio (KOEFENDER et al., 2016; NEVES et al., 2016).

A temperatura foliar aferida nas linhagens, não apresentou diferenças (Tabela 1), visto que as linhagens foram cultivadas no mesmo ambiente. O cultivo de alface em regiões onde ocorrem a incidência de altas temperaturas e excesso de radiação solar pode ocasionar estresse

fisiológico nas plantas, impactando no seu potencial produtivo (BEZERRA-NETO et al., 2005). Variações de temperatura foliar podem ser influenciadas por níveis de exposição à radiação solar, temperatura do ambiente, umidade do ar e velocidade do vento (KONIS, 1950; GATES, 1968). Em condições de cultivo em campo, há uma variação de temperatura ao longo do dia. O uso de sombreamento por meio de telas e plásticos pode reduzir essa variação de temperatura, favorecendo positivamente o comportamento estomático, resultando em uma maior eficiente energética (GERRA; COSTA; TAVARES, 2017).

Para o teor de antocianina também não foi identificado diferença entre os genótipos de alface estudados (Tabela 1). Células que apresentam uma maior quantidade deste pigmento apresentam uma coloração mais arroxeadas e folhas mais claras apresentam menores quantidades de antocianina. Este pigmento está associado à coloração de diversas partes das plantas e a expressão do mesmo pode ser influenciada por diversos fatores, como pH, relação com o teor de clorofila e controle genético (HARBORNE; GRAYER, 1988; MARKAKIS, 1982; BROUILLARD, 1983; ZHANG et al., 2016). Cassetari et al. (2015) observaram que as alfaces de coloração roxa ou avermelhada apresentaram os maiores teores de antocianinas. Já a coloração verde está associada a uma maior presença de clorofila, a qual confere o caráter em tom de verde. No presente trabalho, pelo fato das linhagens apresentarem coloração verde, a quantificação de antocianina não apresentou resultado expressivo.

Quanto ao número de dias para pendoamento após a semeadura, as linhagens UFU-7#1#2#1 (94,7), UFU-197#2#1#1 (104,0), UFU-197#1#1 (94,7) e UFU-197#2#2#1 (96,0) destacaram-se por apresentarem um maior tempo até atingirem a fase de pendoamento, podendo ser consideradas tropicalizadas. Vale destacar que a linhagem UFU-040#5#5#1 apresentou o menor tempo para atingir tal fase (53 dias) em relação à testemunha cv. Grand Rapids e a linhagem UFU-155#1#1#1, ambas tiveram pendoamento aos 64 dias. No trabalho realizado por Morales et al. (2017), observaram que a linhagem SCS 374 Litorânea apresentou baixa suscetibilidade ao pendoamento precoce, sendo que a mudança para a fase reprodutiva ocorreu em média aos 50 dias. O pendoamento precoce não é uma característica almejada, visto que nesta fase ocorre a produção de látex, que confere sabor amargo e há perda do valor comercial da folhosa. Além disso, parte dos fotoassimilados são direcionados para a formação da estrutura floral, influenciando na produção de folhas.

A linhagem UFU-206#3#1#1 (29,7) apresentou o maior valor para o índice SPAD/carotenoides, juntamente com a testemunha UFU-Biofort (28,6), em relação aos demais genótipos analisados. Além disso, a linhagem UFU-206#3#1#1 apresentou superioridade relativa de 69,93% quando comparada a testemunha cv. Grand Rapids (17,5) para o índice

SPAD/carotenoides. Adicionalmente, vale ressaltar que as linhagens UFU-189#3#1#1 (26,6), UFU-189#1#2#1 (26,8), UFU-197#1#1 (26,6), UFU-189#3#4#1 (26,1) e UFU-206#1#5#1 (25,4) também apresentaram superioridades quanto ao índice SPAD/carotenoides (52,29%; 53,26%; 52,06%; 49,54% e 45,70%, respectivamente) em relação à cv. Grand Rapids, evidenciando o caráter das mesmas em relação à biofortificação quando comparadas a testemunha comercial.

Segundo Cassetari et al. (2015), é possível inferir a concentração de carotenoides em cultivares de alface por meio do índice SPAD. Maciel et al. (2019), Sousa et al. (2019) e Maciel et al. (2020a) utilizaram tal referência em seus trabalhos, sendo possível a seleção de genótipos com altos teores de carotenoides. Portanto, verificou-se que os maiores valores para o índice SPAD caracterizados nas linhagens do presente trabalho, implicam em maiores concentrações de carotenoides.

5.2 ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE OS GENÓTIPOS ANALISADOS

Além da comparação de desempenho individual das linhagens, verifica-se que é importante o uso de medidas de dissimilaridade genética. Essas auxiliam os melhoristas na seleção de genitores em programas de melhoramento (Araujo et al., 2016).

As medidas de dissimilaridade genética estimadas pela distância generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2) entre os 25 tratamentos variaram entre 2,5 (UFU-189#3#1#1) a 227,3 (UFU-197#1#1), indicando ampla diversidade genética. O dendrograma (Figura 1) formado pelo método UPGMA apresentou coeficiente de correlação cofenético de 0,83, sendo significativo ao teste t ($p < 0,01$). Portanto, é correto afirmar que o dendrograma reproduziu de forma satisfatória a informação contida na matriz e consequentemente na formação dos grupos.

Para a definição do ponto de corte no dendrograma em 30%, utilizou-se o princípio da ocorrência de mudanças abruptas nas ramificações, conforme proposto por Cruz et al. (2012). Com este corte, houve a formação de sete grupos distintos entre si, demonstrando que há diversidade genética entre os genótipos analisados. Observou-se que o primeiro grupo foi composto por 40% das linhagens, o segundo e o terceiro por 4% cada, o quarto por 24%, o quinto e o sexto por 12% cada um e o último grupo foi composto pela testemunha cv. Grand Rapids.

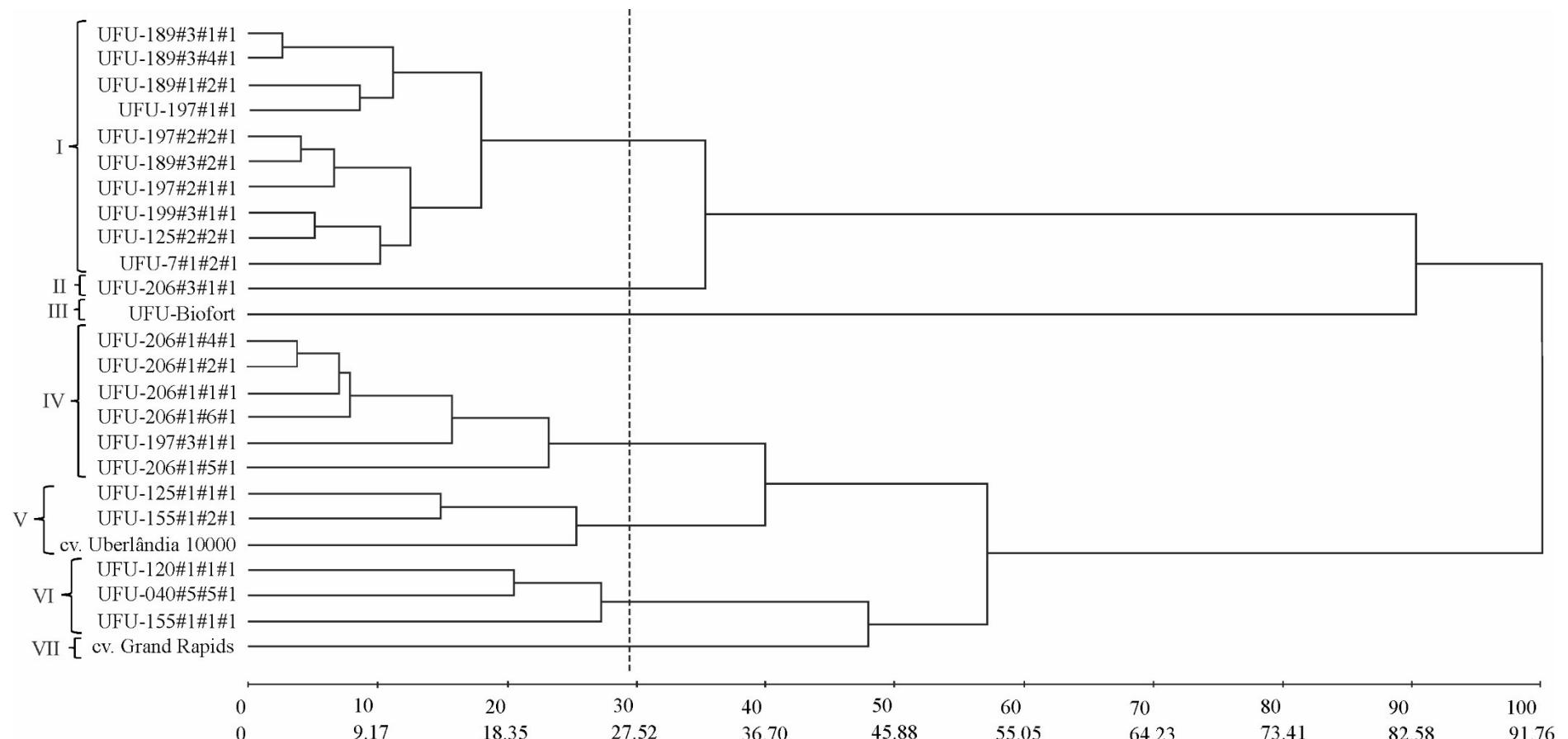


Figura 1. Dendrograma da divergência genética entre linhagens de alface obtido pelo Método Hierárquico de ligação média “UPGMA” como medida de dissimilaridade. Monte Carmelo, UFU. 2020.

Outro método de análise multivariada utilizado no trabalho foi o de otimização de Tocher, o qual permitiu a formação de oito grupos distintos entre si (Tabela 2), comprovando novamente a variabilidade genética entre os genótipos. Entretanto, não houve coerência entre este método e o método UPGMA em relação à composição dos grupos.

Tabela 2. Representação do agrupamento gerado pelo método de Otimização de Tocher com base na distância de Mahalanobis, estimada a partir de oito características agronômicas.

Grupos	Indivíduos
I	UFU-206#1#1#1, UFU-206#1#2#1, UFU-206#1#4#1, UFU-206#1#6#1, UFU-199#3#1#1, UFU-125#2#2#1, UFU-7#1#2#1, UFU-197#2#1#1, UFU-197#2#2#1, UFU-189#3#2#1, UFU-189#3#1#1, UFU-197#1#1
II	UFU-125#1#1#1, UFU-155#1#2#1, cv. Uberlândia 10000
III	UFU-197#3#1#1, UFU-189#3#4#1, UFU-206#1#5#1
IV	UFU-120#1#1#1, UFU-040#5#5#1
V	UFU-155#1#1#1, cv. Grand Rapids
VI	cv. UFU-Biofort
VII	UFU-206#3#1#1
VIII	UFU-189#1#2#1
Total	25

Adicionalmente, foi calculada a contribuição relativa de cada variável na diversidade genética entre os genótipos existentes no banco de germoplasma (Tabela 3). Pode-se observar que a variável que mais contribuiu para esta diversidade foi o índice SPAD/carotenoides, correspondendo a 35,84%. Na Tabela 1, pôde-se observar que o valor para o índice SPAD/carotenoides oscilou na faixa de 15,0 à 29,7, demonstrando a variabilidade existente entre os genótipos para essa característica. O número de folhas apresentou valor de 23,81%, sendo a segunda variável de maior contribuição na divergência genética. A variável referente ao número de dias para pendoamento também apresentou porcentagem considerável em relação à variabilidade (22,26%). As variáveis massa fresca, diâmetro de caule, diâmetro de planta, temperatura foliar e teor de antocianina apresentaram as menores porcentagens de contribuição (11,39%, 1,76%, 1,83%, 1,77% e 1,30%, respectivamente), sendo que o teor de antocianina foi o que apresentou a menor contribuição.

Tabela 3. Contribuição relativa de oito caracteres agronômicos na divergência genética de 25 linhagens de alface de coloração verde, segundo critério de Singh (1981). Monte Carmelo, UFU, 2020.

Características ¹	S.j	S.j (%)
MF	2182,06	11,39
DC	338,56	1,76
NF	4559,97	23,81
DP	351,38	1,83
TF	340,08	1,77
SPAD/carotenoides	6864,18	35,84
TAC	249,56	1,30
DPS	4264,71	22,26

¹MF: massa fresca (g); DC: diâmetro do caule (cm); NF: número de folhas; DP: diâmetro de planta (cm); TF: temperatura foliar (°C); TAC: teor de antocianina; DPS: dias para pendoamento após semeadura; SPAD: índice SPAD/carotenoides.

Para verificar a importância destas variáveis caracterizadas no trabalho, foi realizada uma análise por meio de rede de correlação (Figura 2). Foi possível observar nesta análise que a variável massa fresca e diâmetro de planta apresentaram correlação genotípica positiva igual a 0,77. Esta correlação foi a que apresentou maior valor em módulo quando comparada as demais. Correlação positiva também foi observada no trabalho desenvolvido por Uzzo (2002), em que o peso e o comprimento de plantas mostraram-se relacionados com altura e diâmetro de planta.

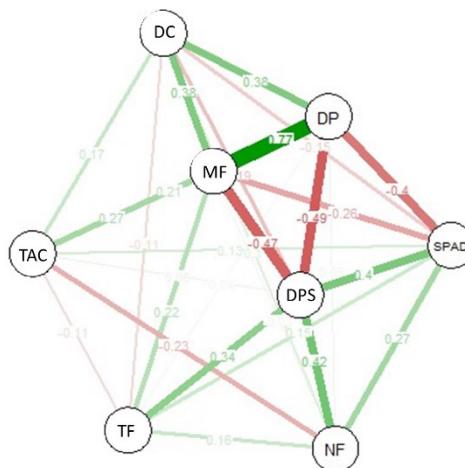


Figura 2: Rede de correlações das variáveis respostas de linhagens de alface (massa fresca (MF), diâmetro de caule (DC), número de folhas (NF), diâmetro de planta (DP), temperatura foliar (TF), teor de antocianina (TAC), dias para pendoamento após a semeadura (DPS) e índice SPAD/carotenoides (SPAD). As linhas verdes representam correlações positivas entre as variáveis e as vermelhas representam correlações negativas. A espessura de cada linha é proporcional à magnitude da correlação.

A variável número de dias para pendoamento apresentou correlação negativa com peso verde (-0,47) e diâmetro da planta (-0,49) (Figura 2). Esse resultado evidencia que conforme a planta inicia a formação e desenvolvimento de suas estruturas reprodutivas, há um direcionamento de parte dos fotoassimilados e nutrientes para o processo de reprodução. Com isso, ao invés da planta investir na formação de folhas com maiores tamanhos e densidade, a mesma direciona este crescimento para a formação do pendão floral, por exemplo. Esse alongamento do pendão floral está intimamente relacionado com a diminuição do número de folhas, influenciando na parte comercial da alface, além da produção de uma substância (látex) que confere sabor amargo (COCK et al., 2002; FILGUEIRA, 2013).

Também houve correlação positiva entre o número de folhas e número de dias para pendoamento (0,42) (Figura 2). Esse resultado sugere que a maior quantidade de folhas existentes na planta promove incremento em dias para pendoamento. As folhas estão relacionadas com a área foliar e quanto maior a atividade fotossintética, maior será a produção de fotoassimilados que serão utilizados no desenvolvimento da planta (ZUFFO et al., 2016). Alfaces não tropicalizadas podem sofrer indução floral precocemente em função de altas temperaturas e o pendão floral atua como dreno de parte dos fotoassimilados produzidos (CARON et al., 2004). Souza et al. (2008) verificaram correlação negativa (-0,0337) para estas variáveis, indicando que, conforme ocorre a emissão do pendão floral, há uma redução no número de folhas.

A variável SPAD/carotenoides, a qual apresentou maior contribuição para a divergência genética, apresentou correlação positiva em relação ao pendoamento (0,40), mas negativa em relação ao diâmetro de planta (-0,40). Trabalho realizado por Moura et al. (2016) corrobora este resultado, indicando que ocorre um aumento na concentração de carotenoides aos 40 dias após o transplantio. Conforme ocorre um incremento gradual no estádio de maturação da folha, há uma maior degradação de moléculas de clorofila ocorrendo um escurecimento da folha (ANDRADE-JÚNIOR; ANDRADE 2012). Com a maturação da folha, ocorre um aumento de cerca de três a quatro vezes na concentração de carotenoides, indicando relação entre o teor de carotenoides e o pendoamento (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA E AMAYA-FARFAN, 2008).

A relação entre a variável SPAD/carotenoides e o diâmetro de planta é resultante da interação entre as clorofilas e a atividade fotossintética (GUERRA; COSTA; TAVARES, 2017). Plantas de sol expostas em ambientes de sombra, favorecem à uma redução na produção de fotoassimilados, impactando na produção de área foliar e no diâmetro das plantas (TAIZ; ZIEGER, 2002). Quadros (2010) verificou que o acréscimo no fornecimento de nitrogênio para

plantas de rabanete promoveu aumento linear em relação ao teor de clorofila. A área foliar de rúcula apresentou comportamento diferente quando comparada ao teor de clorofila presente na folha. Não foi observado incremento de área foliar com o aumento nas doses de nitrogênio (SPIES et al., 2012). Tal fato sugere que o teor de clorofila, que se relaciona aos carotenoides no processo de foto-oxidação (HENDRY & PRICE, 1993), não apresenta correlação positiva com a área foliar, que está diretamente associada ao diâmetro de planta. As demais correlações apresentaram correlações positivas ou negativas abaixo de 0,40 em módulo.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MEIO DA FENOTIPAGEM POR IMAGEM

Por meio da utilização dos métodos estatísticos anteriores, foi possível verificar que há uma expressiva variabilidade genética entre os genótipos analisados. Verificou-se também que a variável resposta, índice SPAD/carotenoides, foi a que mais contribuiu para tal fato. Consequentemente, tendo essas informações como ponto de referência, é possível testar a aplicabilidade da técnica de fenotipagem por imagem na identificação dos materiais que apresentaram os maiores teores de carotenoides.

Após o processamento das imagens realizadas em campo, obteve-se uma ortoimagem (Figura 3), podendo-se observar a disposição de cada parcela do experimento em campo.

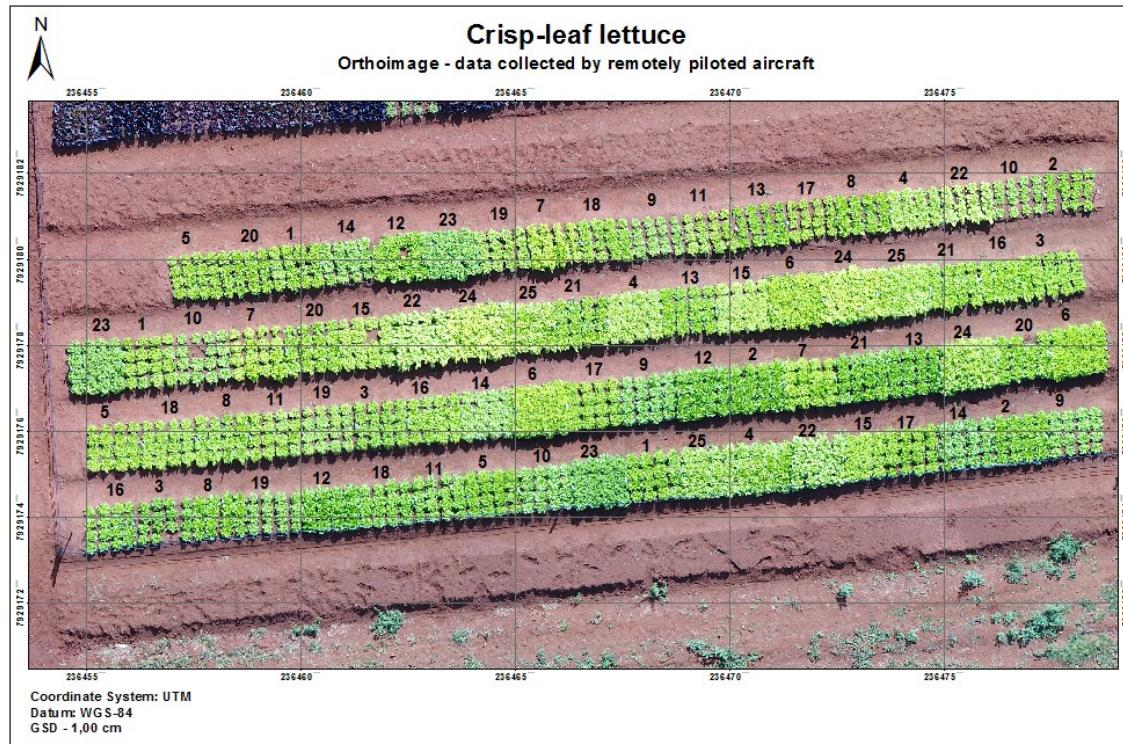


Figura 3 – Ortoimagem aérea do experimento. 1: UFU-206#1#6#1; 2: UFU-189#3#1#1; 3: UFU-197#3#1#1; 4: UFU-125#1#1#1; 5: UFU-7#1#2#1; 6: UFU-155#1#1#1; 7: UFU-120#1#1#1; 8: UFU-189#1#2#1; 9: UFU-197#2#1#1; 10: UFU-199#3#1#1; 11: UFU-206#1#1#1; 12: UFU-206#3#1#1; 13: UFU-197#1#1; 14: UFU-197#2#2#1; 15: UFU-155#1#2#1; 16: UFU-189#3#4#1; 17: UFU-206#1#4#1; 18: UFU-125#2#2#1; 19: UFU-206#1#2#1; 20: UFU-189#3#2#1; 21: UFU-206#1#5#1; 22: UFU-040#5#5#1; 23: UFU Biofort; 24: Grand Rapids; 25: Uberlândia 10000.

Os valores do índice SPAD/carotenoides foram utilizados para a elaboração do mapa de calor (Figura 4) por meio da interpolação dos valores pela ponderação IDW (Inverso da Distância Ponderada) usando a função Kernel. O mapa de calor informa a magnitude de diferença das informações por meio de escalas diferentes de coloração. Neste caso, as cores que tendem ao vermelho (cores quentes) representam os maiores valores dos teores de carotenoides e os tons mais claros (cores frias), representados por tons de azul, são referentes aos menores valores.

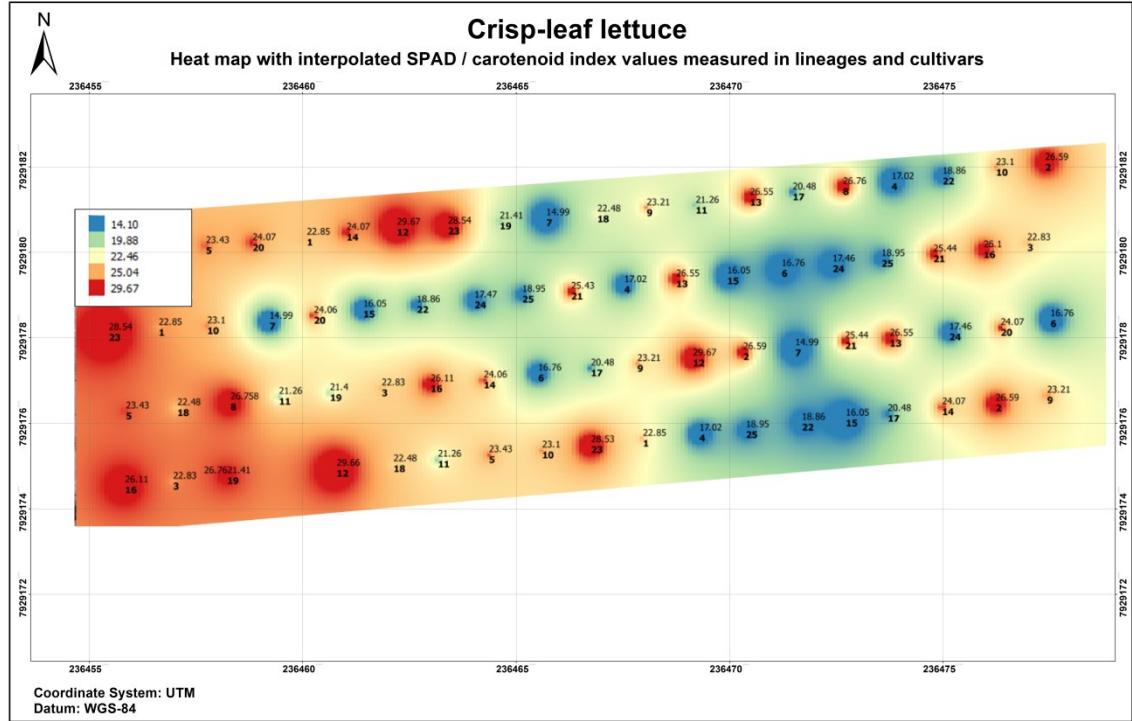


Figura 4 – Mapa de calor com os valores interpolados de índice SPAD/carotenoides medidos nas linhagens e cultivares do experimento. 1: UFU-206#1#6#1; 2: UFU-189#3#1#1; 3: UFU-197#3#1#1; 4: UFU-125#1#1#1; 5: UFU-7#1#2#1; 6: UFU-155#1#1#1; 7: UFU-120#1#1#1; 8: UFU-189#1#2#1; 9: UFU-197#2#1#1; 10: UFU-199#3#1#1; 11: UFU-206#1#1#1; 12: UFU-206#3#1#1; 13: UFU-197#1#1; 14: UFU-197#2#2#1; 15: UFU-155#1#2#1; 16: UFU-189#3#4#1; 17: UFU-206#1#4#1; 18: UFU-125#2#2#1; 19: UFU-206#1#2#1; 20: UFU-189#3#2#1; 21: UFU-206#1#5#1; 22: UFU-040#5#5#1; 23: UFU Biofort; 24: Grand Rapids; 25: Uberlândia 10000

A apresentação de informação nesta disposição facilita uma rápida visualização e identificação, por exemplo, onde estão localizadas as linhagens ou testemunhas que se destacaram em quantidade de carotenoides em relação aos demais. Como o mapa de calor mantém as mesmas informações de localização da ortoimagem, é possível localizar visualmente os genótipos no campo.

A câmera utilizada para obter as imagens possui a capacidade de captura de imagens nos canais R, G e B. Neste trabalho, o canal G (green, verde), foi o que apresentou a melhor resposta em função do índice SPAD/carotenoides. Este fato é comprovado pelos trabalhos de Sims e Gamon (2002) e Maestrin et al. (2009), o qual cita que a luz é absorvida pelas plantas em grande parte nas regiões do vermelho e do azul, sendo que a coloração verde predominante é resultante da reflectância na região do verde no espectro eletromagnético. Portanto, o canal G foi o mais adequado a ser utilizado no trabalho. Dessa forma, a imagem foi submetida ao programa ImageJ e os valores de cada parcela foram coletados visando obter o modelo de

regressão linear entre os valores médios do canal G e o índice SPAD/carotenoides. Foi obtida a equação de regressão linear $G = -0.442 \times SPAD + 116.390$, a qual apresentou coeficiente de determinação igual a 96,9%. Na equação é possível observar que o maior valor do índice SPAD implica em menor valor referente ao canal G. Logo, a resposta do índice SPAD referente aos carotenoides apresenta comportamento inverso ao valor expresso no canal G. Esse resultado é evidenciado nos histogramas gerados em relação às linhagens de maior e menor valor em relação ao índice SPAD/carotenoides, obtidos no programa ImageJ.

Na Figura 5, referente à linhagem UFU-206#3#1#1 que apresentou o maior valor de carotenoides (29,7), observou-se que o maior pico de resposta no histograma ocorreu em 192,4 na escala de verde.

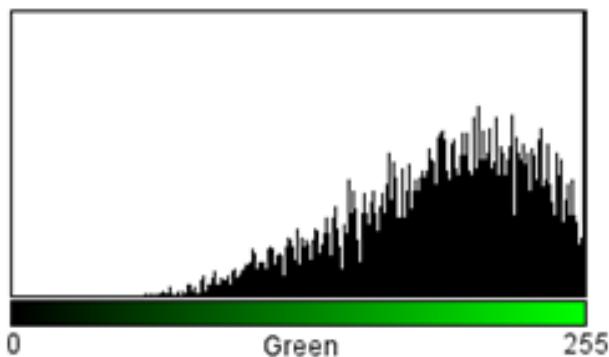


Figura 5– Histograma para índice SPAD/carotenoides em relação à linhagem rica em carotenoides, UFU-206#3#1#1.

Quando se observa o histograma referente à linhagem UFU-120#1#1#1 que apresentou o menor valor de carotenoides (15,0) (Figura 6), nota-se que o pico de resposta no canal G ocorreu próximo de 224,6. Logo, maiores valores de carotenoides implicam em uma menor resposta no canal verde G quando comparado à linhagem de menor valor de carotenoides e vice-versa.

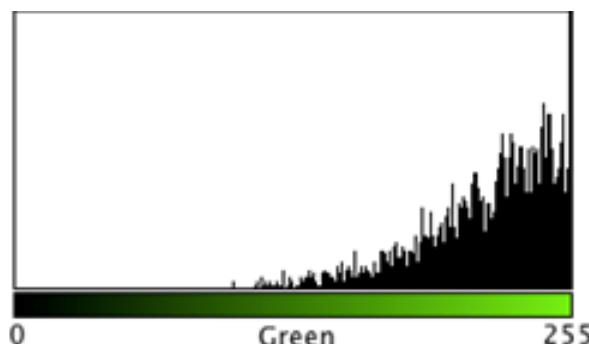


Figura 6 – Histograma para índice SPAD/carotenoides em relação à linhagem com menor valor de carotenoides, UFU-120#1#1#1.

No trabalho desenvolvido por Riccardi et al. (2014), os autores utilizaram a captura de imagens nos canais R, G e B para a quantificação do teor de clorofila em folhas vegetais. Como resultado, os mesmos concluíram que foi possível quantificar de forma satisfatória o teor de clorofila por este método de avaliação de forma não destrutiva. Em outro trabalho, foi realizada a determinação dos teores de clorofila com base em informações obtidas pela captura de imagens nos canais RGB, a qual apresentou coeficiente de correlação em torno de 0,82 no canal G (RIGON et al., 2016). Conforme já evidenciado por Cassetari et al. (2015), há uma estreita correlação entre o teor de clorofila quantificada pelo índice SPAD e o teor de carotenoides, possibilitando a inferência destes compostos de forma indireta por meio do SPAD.

O procedimento de coleta e análise de informações relacionadas às moléculas de clorofila e outras, pode ser um processo oneroso e demandar um grande número de medições para que haja representatividade. Portanto, técnicas que otimizem essas quantificações, conforme a apresentada neste trabalho, pode reduzir o tempo de avaliação de extensas áreas de pesquisas relacionadas à cultura da alface, por exemplo. O emprego da fenotipagem por imagem, na escala do experimento avaliado, demonstrou correlação entre as informações obtidas em campo e as obtidas pelo sensoriamento remoto, sendo eficiente na seleção da linhagem com maior quantidade de carotenoides.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que os materiais genéticos pertencentes ao banco de germoplasma da UFU apresentam considerável variabilidade genética, permitindo o emprego da técnica de fenotipagem por imagem.

A linhagem UFU-206#3#1#1 apresenta boas propriedades agronômicas e o maior teor de carotenoides, sendo considerada um alimento biofortificado, sendo possível a seleção pela técnica de fenotipagem por imagem.

Novos estudos devem ser realizados com o uso de câmeras multiespectrais, sendo fundamental a verificação da eficiência desta técnica em grandes áreas que contam com o cultivo de alfaces ou em campos de pesquisa e desenvolvimento de cultivares.

REFERÊNCIAS

ANAC - Agência Nacional de Aviação Civil. **Curso de Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** 2017.

ANDRADE, R. O. **Drones sobre o campo - Avanços tecnológicos ampliam as possibilidades do uso de aeronaves não tripuladas na agricultura.** ed. 239. Janeiro, 2016. Disponível em:<<http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/01/12/drones-sobre-o-campo/>>. Acesso em 19 out. 2018.

ANDRADE-JÚNIOR, M. C; ANDRADE, J. S. Physicochemical changes in cubiu fruits (*Solanum sessiliflorum* Dunal) at different ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 250-254, 2012

ANSELMI, A. A. **Adoção da agricultura de precisão no Rio Grande do Sul.** 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em:<www.bibliotecadigital.ufrgs.br/>. Acesso em: 08 nov. 2018.

ANTUNES, J. F.G. et al. Estimativa de área de soja por classificação de imagens normalizada pela matriz de erros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47, n. 9, p.1288 -1294, 2012.

ARAUJO, J.C. et al. Univariate and multivariate procedures for agronomic evaluation of organically grown tomato cultivars. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista, vol. 34, n. 3, p. 374-380, 2016.

ARAUS, J. L. et al. **Fenômica: como a fenotipagem de próxima geração está revolucionando o melhoramento de plantas.** Viçosa, MG, 2015, p. 11- 29.

ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas 2014. **2º levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil.** Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%20-%202014.pdf>. Acesso em: 19 out. 2018.

ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. 2015. **Alface é a folhosa mais consumida no Brasil.** Disponível em:

<http://www.grupocultivar.com.br/noticias/alface-e-a-folhosa-mais-consumida-no-brasil>.

Acesso em: 28 out. 2018.

BEZERRA-NETO, F. et al. Produtividade de alface em função de condições de sombreamento e temperatura e luminosidade elevadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 189-192, 2005.

BLAT, S. F. et al. Desempenho de cultivares de alface crespa em dois ambientes de cultivo em sistema hidropônico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n1, p. 135-138, 2011.

BRISSON, N. et al. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. **Field Crops Research**, v. 119, n. 1, p. 201-212, 2010.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanins colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 311-323, 1983.

BRZEZINSKI, C. R. et al. Produção de cultivares de alface americana sob dois sistemas de cultivo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 64, n. 1, p. 83-89, 2017.

CAMPO & NEGÓCIOS. **Alfaces especiais em lançamento pela Isla.** 2014. Disponível em: <<https://revistacampoenegocios.com.br/alfaces-especiais-em-lancamento-pela-isla/>>. Acesso em: 9 dez. 2020.

CARON, B. O. et al. Crescimento da alface em diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 3, n. 2, p. 97-104, 2004.

CARVALHO, S. P.; SILVEIRA, G. S. R. **Cultura da alface.** Departamento Técnico da Emater, 2017. Disponível em: <<http://atividaderural.com.br/artigos/4eaaa5d4f4a8.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2018.

CASSETARI, L. S. et al. β -Carotene and chlorophyll levels in cultivars and breeding lines of lettuce. **Acta Horticulturae**, Lisboa, v. 1083, p. 469-474, 2015.

CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, Madison, v. 89, n.1, p. 557-562, 1997

COCK, W. R. S. et al. Biometrical analysis of phosphorus use efficiency in lettuce cultivars adapted to high temperatures. **Euphytica: Netherlands Journal of Plant Breeding**, v. 126, n.3, p. 299-308, 2002.

COMETTI, N.N.; GALON, K.; BREMENKAMP, D.M. Comportamento de quatro cultivares de alface em cultivo hidropônico em ambiente tropical. **Revista Eixo**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 114-122, 2019.

CORTES, D. F. M. et al. Model-assisted phenotyping by digital images in papaya breeding program. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 74, n. 4, p. 294-302, 2017.

CRUZ, C. D. GENES. Programa Genes - Ampliado e integrado aos aplicativos R, Matlab e Selegen. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.38, n.4, p.547-552, 2016.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. 514p. 2012.

DHONDT, S.; WUYTS, N.; INZÉ, D. Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. **Trends in Plant Science** v. 18, n. 8, p. 428-439, 2013.

DIAMANTE, M. S. et al. Produção e resistência ao pendoamento de alfaces tipo lisa cultivadas sob diferentes ambientes. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 1, p. 133-140, 2013.

EID, B. M.; et al. **Challenges of Integrating Unmanned Aerial Vehicles**. In: Civil Application. 5th International Conference on Mechatronics (ICOM'13) IOP Publishing. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering v. 53, n. 1, p. 1-7, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Alimentos biofortificados buscam reduzir a desnutrição da população.** 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3254365/alimentos-biofortificados-buscam-reduzir-a-desnutricao-da-populacao>>. Acesso em: 30 out. 2018.

FIEDORK, J.; BURDA, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3 ed. Viçosa: UFV. 2013. 421p.

FIORANI, F.; SCHURR, U. Future scenarios for plant phenotyping. **Annual review of plantbiology**, v. 64, n. 1, p. 267-291, 2013.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: **Anthocyanins as food colors**, p. 181-207, 1982.

FURBANK, R. T.; TESTER, M. Phenomics - technologies to relieve the phenotyping bottleneck. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 635-644, 2011.

GATES, D. M. Transpiration and leaf temperature. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 19, p. 211-239, 1968.

GUERRA, A. M. N. M; COSTA, A. C. M; TAVARES, P. R. F. Atividade fotossintética e produtividade de alface cultivada sob sombreamento. **Revista Agropecuária Técnica**, Areia, v. 38, n. 3, p. 125-132, 2017.

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J., The anthocyanins. In: **The flavonoids: advances in research since 1980**. Chapman & Hall, London, 1988, p. 1-20.

HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME J.P. (Eds.) **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, 1993. p.148-152.

HORTI & FRUTI. **Anuário brasileiro de horti&fruti 2019**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2019. 96 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 set. 2020.

JOHANN, J. A. et al. Estimativa de áreas com culturas de verão no Paraná, por meio de imagens multitemporais EVI/Modis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47, n.9, p.1295-1306, 2012.

JORGE, L. A. C.; INAMASU, R. Y.; CARMO, R. B. **Desenvolvimento de um VANT totalmente configurado para aplicações em agricultura de precisão no Brasil**. In: XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto-SBSR, 2011, Curitiba. Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto-SBSR, 2011.

KOEFENDER, J. et al. Consociação entre alface e cebola em diferentes espaçamentos. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista , v. 34, n. 4, p. 580-583, 2016.

KONIS, E. The effect of leaf temperature on transpiration. **Ecology**, Washington, D.C., v. 31, n. 1, p. 147-148, 1950.

LAJÚS, C. R. et al. Agricultura de precisão via aeronave remotamente pilotada: uma alternativa para o homem do campo. **Revista de Computação Aplicada Ao Agronegócio**, Medianeira, v. 1, n. 1, p.1-23, 2018.

LIMA, J. C. S. et al. Desempenho de cultivares de alface do grupo crespa em Jataí-GO. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20, 2016, São José dos Campos. **Anais....** São José dos Campos: UNIVAP, 2016. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/159646/1/Milanez-2016.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2021.

LIU, S. et al. Genome-Wide Analysis of ZmDREB Genes and Their Association with Natural Variation in Drought Tolerance at Seedling Stage of Zea mays L. **Plos Genetics**, v.9, n. 9, p. 1-17, 2013.

LOUREIRO, M.P. et al. Biofortificação de alimentos: problema ou solução?. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 66-84, 2018.

MACIEL, G. M. et al. Image phenotyping of inbred red lettuce lines with genetic diversity regarding carotenoid levels. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v. 81, p. 154-160, 2019.

MACIEL, G. M. et al. Image phenotyping of lettuce germplasm with genetically diverse carotenoid levels. **Bragantia**, Campinas, v. 79, n. 2, p. 224-235, 2020a.

MACIEL, G.M. et al. Linhagens avançadas de mini alface biofortificadas com resistência ao nematóide-das-galhas. **Revista Brasileira de Ciencias Agrárias**, Recife, v.15, n.2, p. 1-6, 2020b.

MAESTRIN, A. P. J. et al. Extração e purificação de clorofila a, da alga Spirulina maxima: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.

MAIANI, G. et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular nutrition e foodresearch**, Weinheim, v.53, n.2, p.194-218, 2009.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MARKAKIS, P. Stability of Anthocyanins in foods. In: Markakis P (Ed) **Anthocyanins in color foods**. New York, Academic Press. p. 163-180. 1982.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.

MÓGOR, A.F.; CÂMARA, F.L.A. Produção de alface no sistema orgânico em sucessão a aveia preta, sobre a palha, e diferentes coberturas do solo. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.3, p.239-245, 2007.

MORALES, R. G. F. et al. SCS374 Litorânea: novo cultivar de alface lisa selecionado no sistema orgânico de produção. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.30, n.3, p.45-49, 2017.

MOREIRA, M. et al. Lettuce production according to different sources of organic matter and soil cover. **Agricultural Science**, v. 5, n. 2, p. 99-105, 2014.

MOURA, L. O. et al. Physicochemical characteristics of purple lettuce harvested at different ages. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 2, p. 489 –495, 2016.

NESPOLI, A. et al. Desempenho de cultivares de alface tipo crespa sob altas temperaturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 49, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília: ABH, 2009. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/EventosX/Trabalhos/EV_3/A2153_T3324_Comp.pdf>. Acesso em: 16 set. 2020.

NEVES, J. F. et al. Produção de cultivares de alface americana sob diferentes ambientes em condições tropicais. **Revista Agro@mbiente On-line**, Boa Vista, v. 10, n. 2, p. 130 - 136, 2016.

OLIVEIRA, E. Q. et al. Desempenho agroeconômico do bicultivo de alface em sistema solteiro e consorciado com cenoura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.712-717, 2004.

OLIVEIRA, J. C. et al. Fenotipagem de Alto Rendimento em Capim-elefante: Perspectivas de Uso de Índices de Vegetação Obtidos de Bandas Espectrais do Visível na Seleção de Genótipos Superiores. In: **XXIII WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE**, 2019, Juiz de Fora: Embrapa, 2019.

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: Edur. 1998. 150 p.

PRIMICERIO, J. A flexible unmanned aerial vehicle for precision agriculture. **Precision Agriculture**, v. 13, n. 4, p. 517-523, 2012.

QUEIROZ, J. P. S. et al. Estabilidade fenotípica de alfaces em diferentes épocas e ambientes de cultivo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p.276-283, 2014.

RECH, L. L. et al. Influência de telas de sombreamento de diferentes colorações no desenvolvimento da alface americana. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, Paraná, v. 13, n. 4, p. 324-329, 2019.

RIGON, J. P. G. et al. A novel method for the estimation of soybean chlorophyll content using a smartphone and image analysis. **PHOTOSYNTHETICA**, v. 54, n. 4, p. 559-566, 2016.

ROCHA, D. S.; REED, E. Pigmentos naturais em alimentos e sua importância para a saúde. **Estudos**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 76-85, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2008. 99p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimento**. 1. ed. Brasília, DF: MMA/SBF, 2008. 101 p.

ROSAS, J. T. F. et al. POTENCIAL DO USO IMAGENS DIGITAIS NA CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PROGÊNIES DE MARACUJAZEIRO AZEDO. In: **Anais de Semana Acadêmica do Curso de Agronomia do CCAE/UFES**. Alegre: Seagro, v. 3, n.1, 2019.

SALA, F. C. Melhoramento genético de alface. In: Congresso brasileiro de olericultura, 51. **Horticultura Brasileira**, Viçosa: ABH, v. 29, n. 2. 2011.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. ‘GLORIOSA’: Cultivar de alface americana tropicalizada. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.26, n.3, p.409–410, 2008.

SALA, F. C; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p.187-194, 2012.

SANTOS, C.L. et al. Desempenho de cultivares de alface tipo crespa sob altas temperaturas em Cáceres-MT. **Agrarian**, v. 2, n. 3, p. 87-98, 2009.

SANTOS, T. T.; YASSITEPE, J. E. C. T. Fenotipagem de plantas em larga escala: um novo campo de aplicação para a visão computacional na agricultura. Cap. 5. In: MASSRUHÁ, S. M. F. S.; LEITE, M. A. de A.; LUCHIARI JUNIOR, A.; ROMANI, L. A. S. (Ed.). **Tecnologias da informação e comunicação e suas relações com a agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

RICCARDI, M. et al. Non-destructive evaluation of chlorophyll content in quinoa and amaranth leaves by simple and multiple regression analysis of RGB image components. **Photosynthesis Research**, v. 120, n. 3, p. 263–272, 2014.

SCHUELTER, A. R. et al. Avaliação dos níveis de clorofila em folhas de tomateiro da cultivar Santa Clara, do mutante ‘firme’ e do híbrido F1. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 183-187, 2003.

SILVA, J. F. et al. **VANT como ferramenta auxiliar na análise da cobertura e uso da terra**. 2015. In: Congresso Brasileiro de Agroinformática, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SILVA, J. M. et al. Métodos de determinação de clorofila em alface e cebolinha minimamente processadas. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, Hermosillo, v. 8 n. 2, p. 53-59, 2007.

SILVA, S. M. C.; MURA, J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2010. 1256 p.

SILVEIRA, F. C. G. **Desempenho de genótipos de alface-crespa em diferentes ambientes de cultivos, no município de Igarapava-SP.** 2016. 23 f. (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

SILVEIRA, P. D. et al. Doses de fósforo para a produção de alface americana com e sem aplicação foliar de zinco. **Biotemas**, Florianópolis, v.28, n.1, p.31-35, 2015.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, n. 2-3, p. 337-354, 2002.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding**, v.41, n. 2, p.237-245, 1981.

SKIBSTED, L. H. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 10, p. 2409-2417, 2012.

SOUZA, V. S. et al. Desempenho de alfaces do grupo solta crespa cultivadas no verão em Jataí-GO. **Revista de Ciências Agronômicas**, Ilha Solteira, v.27, n.3, p.288-296, 2018.

SOUZA, C. A. F. et al. Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas (New approach for plant phenotyping: concepts, current tools and perspectives). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 660-672, 2015.

SOUZA, L. A. et al. Agronomic potential of biofortified crisphead lettuce ('*Lactuca sativa*') and its reaction to root-knot nematodes. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 5, p. 773 - 779, 2019.

SOUZA, T. P. et al. Produção de alface (*Lactuca sativa L.*), em função de diferentes concentrações e tipos de biofertilizantes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 9, n. 4, p. 168–172, 2014.

SOUZA M.C.M. et al. Variabilidade genética para características agronômicas em progêneres de alface tolerantes ao calor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 354-358, 2008.

SOUZA, S. R. et al. Produção de mudas de alface em sistema floating sob tela de sombreamento e cobertura plástica. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 191-197, 2007.

SOUZA, T. R. et al. Medida indireta da clorofila e sua relação com o manejo da adubação nitrogenada em plantas cítricas fertirrigadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal – SP. v. 33, n. 3, p. 993-1003, 2011.

SPIES, G. et al. Avaliação da influência de diferentes doses de nitrogênio no teor de clorofila e na área foliar da rúcula. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 6691-6696, 2012.

SUINAGA, F. A. et al. **Métodos de avaliação do florescimento precoce e identificação de fontes de tolerância ao calor em cultivares de alface do grupo varietal crespa**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 4p. 2013. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 89). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/956376/1/cot89.pdf>>. Acesso em 16 set. 2019.

SWIADER, J. M.; MOORE, A. SPAD - chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n.5, p.1089-1100, 2002.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Plant Physiology**, 3º ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 2002, 690p.

TILMAN, D. et al. **Global food demand and the sustainable intensification of agriculture**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, p. 20260-20264, 2011.

UZZO, R. P. et al. Correlações fenotípicas entre caracteres vegetativos e de produção de palmito da palmeira real australiana. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 505-511, 2002.

VRIES, I.M. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, p. 165-174, 1997.

WALTER, A.; LIEBISCH, F.; HUND, A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. **Plant Methods**, v.11, n. 14, p. 1-11, 2015.

ZHANG, Y. Z. et al. Transcriptome analysis and anthocyanin-related genes in red leaf lettuce. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n.1, p. 1-11, 2016.

ZIECH, A. R. D. et al. Cultivo de alface em diferentes manejos de cobertura do solo e fontes de adubação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 9, p. 948-954, 2014.

ZUFFO, A. M. et al. Análise de crescimento em cultivares de alface nas condições do sul do Piauí. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 2, p. 145-153, 2016.