

ANDRESSA ALVES CLEMENTE

TEORES DE ANTOCIANINAS, CAROTENOIDES E CLOROFILAS EM GERMOPLASMA
DE ALFACE ROXA E VERDE A PARTIR DE IMAGENS OBTIDAS COM AERONAVE
REMOTAMENTE PILOTADA

MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASIL
2021

ANDRESSA ALVES CLEMENTE

TEORES DE ANTOCIANINAS, CAROTENOIDES E CLOROFILAS EM GERMOPLASMA
DE ALFACE ROXA E VERDE A PARTIR DE IMAGENS OBTIDAS COM AERONAVE
REMOTAMENTE PILOTADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agricultura e Informações Geoespaciais da Universidade
Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como parte
das exigências para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Gabriel Mascarenhas Maciel

Coorientadora

Ana Carolina Silva Siquieroli

MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASIL

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C626 2021	<p>Clemente, Andressa Alves, 1997- Teores de antocianinas, carotenoides e clorofilas em germoplasma de alface roxa e verde a partir de imagens obtidas com aeronave remotamente pilotada [recurso eletrônico] / Andressa Alves Clemente. - 2021.</p> <p>Orientador: Gabriel Mascarenhas Maciel. Coorientadora: Ana Carolina Silva Siquieroli. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.118 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Agronomia. I. Maciel, Gabriel Mascarenhas, 1972-, (Orient.). II. Siquieroli, Ana Carolina Silva, 1982-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 631</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações
 Geoespaciais
 Rodovia LMG 746, Km 01, s/nº, Bloco 1AMC, Sala 1A202, Monte Carmelo-MG, CEP 38.500-000
 Telefone: (34) 3810-1033 - ppgaig@iciag.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agricultura e Informações Geoespaciais				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	01/03/2021	Hora de início:	10:00	Hora de encerramento:	11:58
Matrícula do Discente:	31922AIG001				
Nome do Discente:	Andressa Alves Clemente				
Título do Trabalho:	Teores de antocianinas, carotenoides e clorofila em germoplasma de alface roxa e verde a partir de imagens obtidas com aeronaves remotamente pilotada				
Área de concentração:	Informações geoespaciais e tecnologias aplicadas à produção agrícola				
Linha de pesquisa:	Sistemas integrados de produção vegetal				

Reuniu-se na sala virtual Google Meet (meet.google.com/xtu-pbvp-dut) a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, assim composta: Dr. Ana Carolina Silva Siquieroli (UFU), Dr. Ernani Clarete da Silva (UFSJ - Universidade Federal de São João del-Rei), Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel (UFU) – orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADA

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Mascarenhas Maciel, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/03/2021, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, §



1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Silva Siquieroli, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/03/2021, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ERNANI CLARETE DA SILVA, Usuário Externo**, em 01/03/2021, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2595323** e o código CRC **CBB33DF8**.

Dedico

*À Maria Santíssima, aos meus pais, Petronio e
Maria José, e aos que enfrentam diariamente os
desafios da produção agrícola.*

“Só Deus tem a cátedra nos céus e ensina a verdade na Terra; o outro homem está para a cátedra como o agricultor para a planta.” Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Maria Santíssima pela minha vida, família, amigos e professores, pelo cuidado, proteção e dons recebidos.

Aos meus pais, Petronio Davi Alves e Maria José Clemente Alves, meus irmãos, Alessandra Alves Clemente e Clayton Alves Clemente, meu cunhado Jaci Filho Alves Soares, pelo apoio e por estarem sempre comigo. À minha avó Terezinha Evaristo Moreira e meu tio João Paulo Clemente, pelo acolhimento e carinho.

Ao professor Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel pela orientação no desenvolvimento desse trabalho e por tanto colaborar com minha formação profissional. Professor, obrigada pelo apoio, incentivo e bom exemplo de servidor público.

À professora Dra. Ana Carolina Silva Siquieroli pela motivação e suporte para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Rodrigo Gallis, pela colaboração e ensinamentos.

Aos professores do PPGAIG, por contribuírem com a minha formação.

Aos membros do Grupo de Estudos em Melhoramento Genético de Hortaliças (GEN-HORT), cujo trabalho em equipe possibilitou a realização dos experimentos. Agradeço em especial aos colegas Lucas Medeiros e Jéssyca Santos pela contribuição na condução dos experimentos.

Aos funcionários da Estação Experimental de Hortaliças, em especial ao senhor José Marques Vilela, pela ajuda e atenção.

Aos colegas do PPGAIG, em especial Vinicius Silva Werneck Orlando e Thiago Fellipe Nunes de Mendonça, pelas conversas, dicas e apoio.

Aos amigos Hellen Cássia Rodrigues, Eduarda Aparecida Oliveira, Larissa Santos, Breno Presley Rocha e Danilo Tedesco pela amizade e contribuições.

Aos membros do Grupo de Oração Universitário da UFU-MC, em especial Prof. Enio Tarso de Souza Costa e Sandra Maria Figueiredo. À comunidade das Paróquias de Nossa Senhora do Carmo e de Nossa Senhora de Fátima de Monte Carmelo-MG, em especial ao Padre Olivar Constantino Peres e à Gilse Resende e família.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições para melhoria deste trabalho.

Ao PPGAIG, UFU, PROPP, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo suporte administrativo e financeiro. Muito obrigada a todos!

BIOGRAFIA

Andressa Alves Clemente nasceu no dia 30 de outubro de 1997 em Monte Carmelo, no Triângulo Mineiro. Filha dos agropecuaristas Petronio Davi Alves e Maria José Clemente Alves, cresceu na fazenda Córrego do Cavalo, área rural de sua cidade natal. cursou o ensino fundamental I, no período de 2003 a 2007, na escola rural Madre Luiza Gonzaga. De 2008 a 2011 cursou o ensino fundamental II na escola Clara Chaves. Durante os anos de 2012 a 2014 cursou o ensino médio e concomitantemente o técnico em Contabilidade, na escola Professor Vicente Lopes Perez, trabalhando na área de Contabilidade Rural. Ainda durante o ensino médio, foi aprovada no Programa de Iniciação Científica Junior (PIBIC-Jr) na Universidade Federal de Uberlândia Campus Monte Carmelo (UFU-MC), onde iniciou sua jornada de pesquisadora. Em 2015 ingressou no curso de Agronomia na UFU-MC. Participou do Grupo de Estudos em Melhoramento Genético de Hortaliças (GEN-HORT) e do grupo de pesquisa em Biotecnologia Aplicada, nos quais atuou em diversas pesquisas relacionadas a genética molecular, bioquímica, fitopatologia, entomologia e desenvolvimento de cultivares olerícolas tropicalizadas. Atuou como monitora nas disciplinas de Zoologia, Matemática I, Genética na Agropecuária e Nutrição Animal e na organização de eventos científicos e dias de campo. Graduiu-se em Agronomia em 2019. No mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, na linha de pesquisa Sistemas integrados de produção vegetal, atuando nas áreas de agricultura de precisão, sensoriamento remoto e melhoramento de plantas.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Introdução Geral	1
1. Fenotipagem de alto desempenho para detectar antocianinas, carotenoides e clorofilas em germoplasma de alface roxa	3
Resumo	3
Abstract.....	4
1.1. Introdução	5
1.2. Material e métodos.....	6
1.3. Resultados e discussão.....	11
1.4. Conclusões	22
Referências bibliográficas	22
2. Fenotipagem de alto desempenho para detectar antocianinas, carotenoides e clorofilas em germoplasma de alface roxa e verde.....	32
Resumo	32
Abstract.....	33
2.1. Introdução	34
2.2. Material e métodos.....	35
2.3. Resultados e discussão.....	39
2.4. Conclusões	50
Referências bibliográficas	50
Anexos	58

RESUMO

CLEMENTE, Andressa Alves. **Teores de antocianinas, carotenoides e clorofilas em germoplasma de alface roxa e verde a partir de imagens obtidas com aeronave remotamente pilotada**. 2021. 71p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Informações Geoespaciais) – Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.118>.¹

Dietas desequilibradas, causam a deficiência de micronutrientes (fome oculta) e são o principal fator mundial de risco de mortes. Diante disso, alimentos funcionais, ricos nutricionalmente, com efeitos benéficos à saúde humana e longevidade são buscados por consumidores, cientistas, nutricionistas e horticultores. A alface é um desses alimentos, podendo ainda ser biofortificada com compostos bioativos como antocianinas, carotenoides e clorofilas. No entanto, os custos e tempo necessário para análise desses pigmentos vegetais são obstáculos a este processo. Esta dissertação foi dividida em dois artigos, sendo o primeiro artigo para validação da fenotipagem de alto desempenho com aeronave remotamente pilotada (ARP) em germoplasma de alface roxa, utilizando índices de vegetação nos canais do vermelho, verde e infravermelho próximo. O segundo, para validação da fenotipagem de alto desempenho com ARP em germoplasma de alface roxa e verde, utilizando índices de vegetação nos canais do visível. Os experimentos foram realizados em 2019 na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia - Campus Monte Carmelo. Nos dois experimentos, método tradicional e fenotipagem de alto desempenho aérea usando ARP Phantom 4 foram usados para avaliar níveis de antocianinas, carotenoides e clorofilas de cada tratamento. Os resultados mostraram diversidade genética dentro dos bancos de germoplasma. Além disso, a fenotipagem de alto desempenho foi correlacionada com a metodologia tradicional nos dois estudos. No primeiro artigo, os índices CIG, CVI e GNDVI apresentaram maior potencial para uso visando avaliar o conteúdo de pigmentos foliares em alface roxa, especialmente antocianina. No segundo, o índice GLI obteve maiores correlações e coeficientes de determinação na previsão dos pigmentos foliares em alface roxa e verde. Portanto, ARPs e índices de vegetação podem ser usados para identificar níveis de antocianinas, carotenoides e clorofilas dentro de um banco de germoplasma ou em cultivos de larga escala.

Palavras-Chave: biofortificação; índice de vegetação; fitopigmentos; *Lactuca sativa* L.; nutrição.

¹Orientador: Gabriel Mascarenhas Maciel – UFU

ABSTRACT

CLEMENTE, Andressa Alves. **Anthocyanins, carotenoids and chlorophyll contents in germplasm of red and green lettuce from images obtained with unmanned aerial vehicle.** 2021. 71p. Dissertation (Master's Degree in Agriculture and Geospatial Information) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Available in: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.118>.¹

Imbalanced diets cause micronutrient deficiency (hidden hunger) are the main worldwide risk factor for death. Therefore, functional foods, nutritionally rich, with beneficial effects on human health and longevity are sought by consumers, scientists, nutritionists and horticulturists. Lettuce is one of those foods, and it can also be biofortified with bioactive compounds such as anthocyanins, carotenoids and chlorophylls. However, the costs and time required to analyze these plant pigments are obstacles to this process. This paper was divided into two articles, the first for the validation of high-throughput phenotyping with unmanned aerial vehicle (UAV) in red lettuce germplasm, using vegetation indexes in the red, green and near infrared channels. The second, for validating high-throughput phenotyping with UAV in red and green lettuce germplasm, using vegetation indexes in the visible channels. The experiments were carried out in 2019 at the Experimental Vegetable Station of the Federal University of Uberlandia - Monte Carmelo Campus. In both experiments, traditional method and aerial high-throughput phenotyping using UAV Phantom 4 were used to evaluate the levels of anthocyanins, carotenoids and chlorophylls on each treatment. The results showed genetic diversity within the germplasm banks. In addition, high-performance phenotyping was correlated with the traditional methodology in both studies. In the first article, the CIG, CVI and GNDVI indexes showed greater potential for use in order to evaluate the content of leaf pigments in red lettuce, especially anthocyanin. In the second, the GLI index obtained greater correlations and determination coefficients in the prediction of leaf pigments in red and green lettuce. Therefore, UAVs and vegetation indexes can be used to identify levels of anthocyanins, carotenoids and chlorophylls within a germplasm bank or on a large scale in crops.

Keywords: biofortification; *Lactuca sativa* L.; phytopigments, vegetation index; nutrition.

¹Orientador: Gabriel Mascarenhas Maciel – UFU

INTRODUÇÃO GERAL

A desnutrição é alta em todo o mundo e consiste em tripla ameaça à saúde humana: subnutrição, fome oculta (deficiências de micronutrientes) e supernutrição (Cuenca et al., 2020; Murray et al., 2021). A subnutrição contribui para 45% das mortes em crianças menores de cinco anos. Já a supernutrição, causadora da obesidade, está contribuindo para 4 milhões de mortes em todo o mundo, além de aumentar o risco de morbidade para pessoas em todas as faixas etárias (FAO et al., 2019). Entretanto, a fome oculta, causada por dietas desequilibradas, é o principal fator mundial de risco de mortes (FAO et al., 2019). Diante disso, consumidores, cientistas, nutricionistas e horticultores buscam alimentos funcionais com efeitos benéficos à saúde humana e longevidade (Giordano et al., 2019).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais importante mundialmente, sendo muito apreciada por suas propriedades organolépticas e percepção popular como alimento saudável (Camejo et al., 2020). Só no Brasil, foram produzidas 671,5 milhões de quilogramas de alface em 2017, em mais de 108 mil estabelecimentos agropecuários (IBGE, 2017).

As propriedades benéficas da alface estão associadas ao seu alto teor de fibras, vitaminas, composição mineral e compostos bioativos. Dentre os compostos bioativos estão antocianinas, carotenoides e clorofilas. Esses três compostos são pigmentos vegetais envolvidos na fotossíntese. Eles apresentam forte ação antioxidante e são associados a prevenção de doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares, além de potencializar a resposta imunológica e promover o bem-estar mental (Braga et al., 2018; Bendokas et al., 2019, Ocean, Howley e Ensor, 2019).

A alface, devido à sua popularidade e propriedades, apresenta alto potencial para biofortificação. Com a biofortificação é possível enriquecer nutricionalmente partes comestíveis das plantas, obter alimentos funcionais e assim combater a fome oculta (Finkelstein et al., 2017). Ela pode ser alcançada por meio da fertilização mineral, melhoramento genético ou abordagens biotecnológicas (Giordano et al., 2019). No entanto, independente da solução adotada para biofortificação, para validação é necessário avaliar os componentes vegetais, o que tem limitado estudos nessa linha, devido ao alto custo e demanda de tempo de análises laboratoriais de componentes vegetais (Maciel et al., 2019a).

Diante desse cenário, a estimativa de antocianinas, carotenoides e clorofilas por imagens podem auxiliar estudos de biofortificação. Estudos demonstram o potencial de imagens obtidas

com aeronave remotamente pilotada (ARP) para monitoramento precisos da vegetação devido altas resoluções espaciais e temporais (Su et al., 2018; Guo et al., 2020). Índices de vegetação baseados em refletância, calculados a partir de imagens, têm sido amplamente usados para avaliar parâmetros fotossintéticos em culturas (Yadav, Ibaraki, Gupta, 2010; Riccardi et al., 2014; Guo et al., 2020). Entretanto, trabalhos que avaliam antocianinas, carotenoides e clorofilas por sensoriamento remoto em alface são escassos.

Diante disso, o trabalho foi realizado com o objetivo geral de validar técnica de fenotipagem de alto desempenho para antocianina, clorofila e carotenoides em alface.

1. FENOTIPAGEM DE ALTO DESEMPENHO PARA DETECTAR ANTOCIANINAS, CAROTENOIDES E CLOROFILAS EM GERMOPLASMA DE ALFACE ROXA

RESUMO

Pigmentos vegetais como antocianina, clorofila e carotenoides tem forte ação antioxidante e demonstram efeitos benéficos à saúde humana, atuando na prevenção de doenças e infecções. Para favorecer o consumo destes compostos é desejável o desenvolvimento de cultivares de alface biofortificadas, devido ao baixo custo e popularidade desta folhosa. No presente estudo, foi avaliado o conteúdo de antocianina, carotenoides, clorofila a, clorofila b e clorofila total em trinta genótipos de alface roxa, além de índice SPAD e índices de vegetação (CIG, CVI, GNDVI e NDVI), objetivando a validação da fenotipagem por alto desempenho. Os índices de vegetação foram calculados usando imagens da copa das plantas obtidas com aeronave remotamente pilotada acoplada com uma câmera nos canais vermelho, verde e infravermelho próximo. Quando as plantas atingiram o ponto comercial foi mensurado o índice SPAD e os pigmentos foliares por meio de metodologias laboratoriais tradicionais, que são onerosas e demoradas. A variabilidade genética entre os genótipos para pigmentos foliares foi confirmada pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$) e pelo dendrograma UPGMA com base na matriz de distância Euclidiana. A antocianina foi o pigmento que mais contribuiu para a diversidade genética e apresentou altas correlações com CIG, CVI e GNDVI. Estes três índices também apresentaram correlações moderadas com clorofilas e carotenoides. Genótipos com maior conteúdo de pigmentos, especialmente de antocianina, apresentaram índices CIG, CVI e GNDVI mais intensos. Portanto, a técnica de fenotipagem de alto desempenho foi correlacionada com metodologia tradicional e pode fornecer uma alternativa para seleção indireta de plantas com altos teores de pigmentos foliares, principalmente antocianina, em alface roxa.

Palavras-chave: alimentos biofortificados; fenotipagem por imagem; *Lactuca sativa* L.; melhoramento genético; método indireto; nutrição.

High-throughput phenotyping to detect anthocyanins, chlorophylls, and carotenoids in RED lettuce germplasm

ABSTRACT

Vegetable pigments such as anthocyanin, chlorophyll and carotenoids have a strong antioxidant action and demonstrate beneficial effects on human health, acting in the prevention of diseases and infections. To favor the consumption of these compounds, the development of biofortified lettuce cultivars is desirable, due to the low cost and popularity of this hardwood.. In the present study, the content of anthocyanin, carotenoids, chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll was evaluated in thirty genotypes of purple lettuce, in addition to the SPAD index and vegetation indexes (CIG, CVI, GNDVI and NDVI), aiming the validation of phenotyping for high performance. The vegetation indexes were calculated using images of the canopy of the plants obtained with a remotely piloted aircraft coupled with a camera in the red, green and near infrared channels. When the plants reached the commercial point, the SPAD index and leaf pigments were measured using traditional laboratory methodologies, which are costly and time-consuming. The genetic variability between the genotypes for leaf pigments was confirmed by the Scott-Knott test ($p < 0.05$) and by the UPGMA dendrogram based on the Euclidean distance matrix. The anthocyanin was the pigment that most contributed to genetic diversity and showed high correlations with CIG, CVI and GNDVI. These three indexes also showed moderate correlations with chlorophylls and carotenoids. Genotypes with higher pigment content, especially anthocyanin, showed more intense CIG, CVI and GNDVI indexes. Therefore, the high performance phenotyping technique was correlated with traditional methodology and can provide an alternative for indirect selection of plants with high levels of leaf pigments, mainly anthocyanin, in purple lettuce.

Keywords: biofortified foods; image-based phenotyping; indirect method; *Lactuca sativa* L.; nutrition; plant breeding.

1.1. INTRODUÇÃO

Antocianinas, carotenoides e clorofilas são pigmentos vegetais com forte ação antioxidante e estão relacionados ao status fisiológico das plantas (Lopes et al., 2017). Além da importância agrônômica, esses compostos apresentam diversos benefícios ao organismo humano (Yoo et al., 2020).

O consumo de alimentos com altas concentrações de antocianinas, carotenoides e clorofilas contribui para a proteção das células contra o estresse oxidativo, prevenindo algumas doenças degenerativas, cardiovasculares e infecções (Braga et al., 2018; Bendokas et al., 2019).

Visto a importância desses compostos para a saúde humana, o desenvolvimento de cultivares vegetais biofortificados é desejável. Para favorecer o consumo e suprir a necessidade da população, a espécie a ser biofortificada deve ter alta popularidade e custo acessível. Assim, a alface (*Lactuca sativa* L.) se destaca, sendo a folhosa mais consumida no Brasil (IBGE, 2017) e no mundo (Shatilov, Razin e Ivanova, 2019). Dentre as variedades de alface, as roxas têm maior potencial para a biofortificação, pois, naturalmente, já apresentam grande concentração de pigmentos, principalmente antocianina, o que lhes confere maior atividade antioxidante (Llorach et al., 2008).

Apesar do potencial e benefícios, poucos estudos têm buscado obter cultivares de alface com alta concentração de pigmentos foliares. Um dos entraves nessa linha de estudos está relacionado ao alto custo e demanda de tempo de análises laboratoriais de componentes foliares (Maciel et al., 2019a). Em laboratório, a concentração de pigmentos é comumente determinada fotometricamente após extração usando solventes orgânicos, como acetona, dimetil formamida e ácido clorídrico. Embora estes métodos sejam bem estabelecidos e precisos, é necessário muito tempo, mão de obra qualificada e requer o uso de reagentes químicos de alto valor comercial de alta toxicidade e/ou inflamáveis (Arnon, 1949; Francis et al., 1982; Porra et al., 1989; Cassetari et al., 2015). Adicionalmente, vale ressaltar que são métodos destrutivos, impedindo que o melhorista realize a colheita das sementes a posteriori.

Como alternativa à onerosa quantificação laboratorial de pigmentos, tem sido utilizados equipamentos portáteis não destrutivos como Minolta SPAD-502 e Minolta CR-400 (Hawkins et al., 2009; Cassetari et al., 2015; Donnelly et al., 2020). Entretanto, quando há necessidade de muitas

leituras, como acontece nos programas de melhoramento genético de alface, o método se torna demorado e o erro é aumentado devido às variações de radiação solar e radiação fotossinteticamente ativa ao longo do dia (Padilla et al., 2019).

Comparado às medições manuais tradicionais de campo e de laboratório, o sensoriamento remoto por imagem demonstra alto potencial por coletar, de maneira rápida e econômica, diversas informações da vegetação sobre uma grande área, sem a necessidade de destruir a planta (Coops et al., 2004; Belluco et al., 2006; Ling et al., 2019; Beloti et al., 2020). A fenotipagem de alto desempenho voltada a ARP (aeronave remotamente pilotada) com automação do processo de obtenção das imagens, permite reduzir o tempo e o custo de avaliação do teor de carotenoides. Adicionalmente, foi verificado, alta correlação do pigmento com a banda verde em alface roxa (Maciel et al., 2019a). Entretanto, há relatos que a vegetação pode ser melhor avaliada através de expressões matemáticas que combinam diferentes faixas espectrais (Atzberger, 2013). Essas combinações são denominadas de índices de vegetação e utilizam principalmente as faixas do visível (RGB) e infravermelho próximo (NIR) (Zang and Covacs, 2012; Chaparro et al., 2019). Esses índices capturam características essenciais dos espectros que variam com o conteúdo de classes específicas de pigmentos (antocianinas, carotenoides e clorofilas) e reduzem um grande volume de dados para um valor único e viável para facilitar a plotagem, análises estatísticas e reprodutibilidade (Hallik et al., 2017). Apesar dos índices de vegetação já viabilizarem estudos comparativos e seleção fenotípica em larga-escala em culturas como milho, soja, trigo (Shi et al., 2016; Silva Junior et al., 2018; Naser et al., 2020), isso ainda não é uma realidade para alface. Diante disso, o trabalho foi realizado com o objetivo de validar a fenotipagem de alto desempenho para teores de antocianina, clorofila e carotenoides em germoplasma de alface roxa.

1.2.MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Área Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no município de Monte Carmelo (873 m de altitude), Minas Gerais, Brasil, de junho a setembro de 2019 (Figura 1). O clima da região é do tipo Aw-tropical, caracterizado por verão quente e úmido e inverno frio e seco, segundo classificação de Köppen (1948).

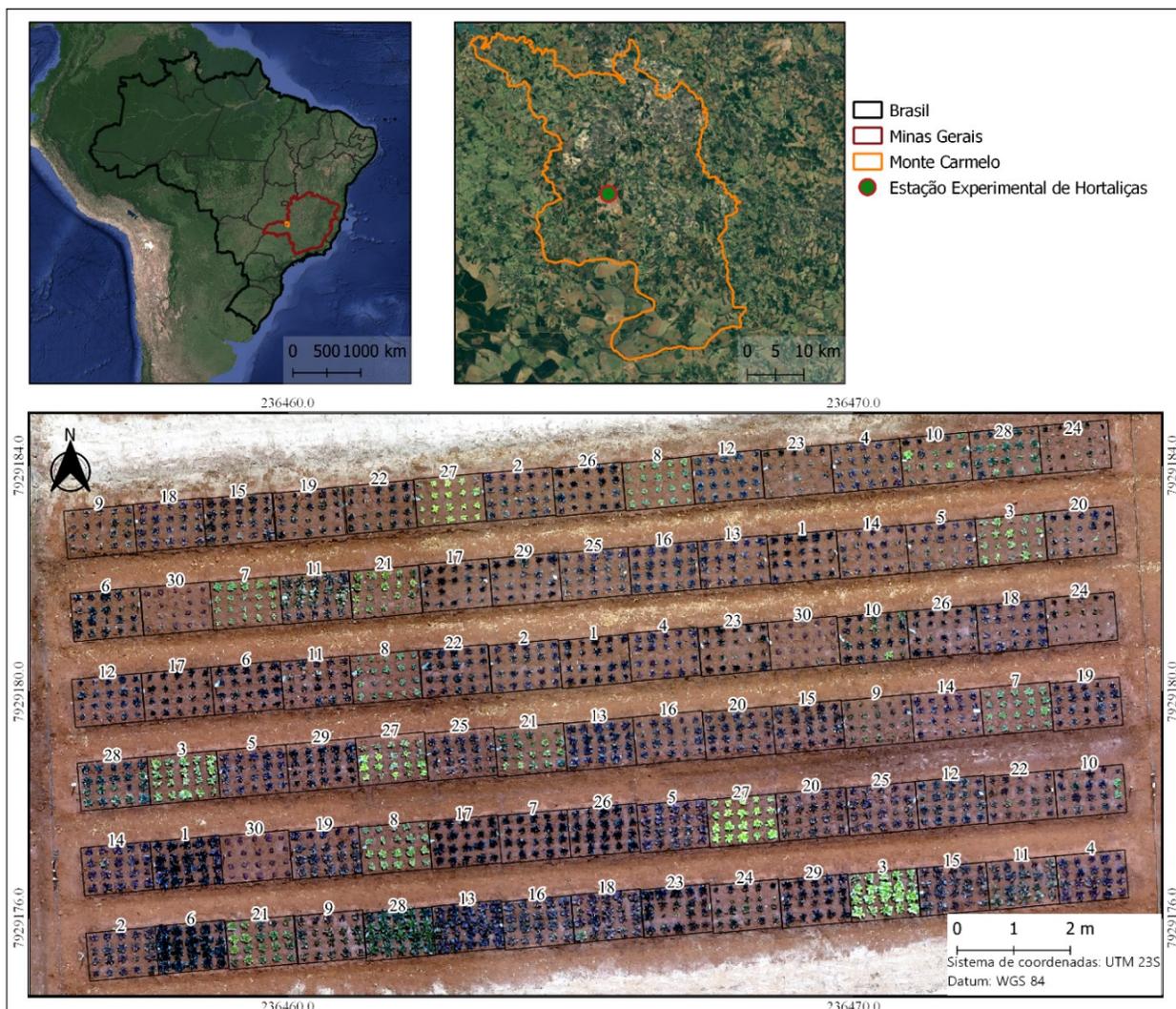


FIGURA 1. Localização do experimento e distribuição dos genótipos de alface roxa em campo. 1: UFU-199#2#2#1; 2: UFU-7#2#1#1; 3: UFU-117#1#3#1; 4: UFU-86#1#2#1; 5: UFU-75#1#1#1; 6: UFU BIOFORT199E7; 7: UFU-206#3#2#1; 8: UFU-199#2#3#1; 9: UFU-189#2#3#1; 10: UFU-184#2#5#1; 11: UFU-184#2#1#1; 12: UFU-107#1#2#1; 13: UFU-86#2#1#1; 14: UFU-75#3#2#1; 15: UFU-184#2#3#1; 16: UFU BIOFORT7E27; 17: UFU-75#2#2#1; 18: UFU-75#3#1#1; 19: UFU-190#1#2#1; 20: UFU BIOFORT75E33; 21: UFU-189#2#2#1; 22: UFU-189#2#1#1; 23: UFU BIOFORT199E38; 24: UFU BIOFORT199E40; 25: UFU-206#1#6#1; 26: UFU-206#1#3#1; 27: UFU-117#1#1#1; 28: UFU-184#2#1; 29: UFU BIOFORT199E50; 30: Pira 72.

Antes da instalação do experimento, foi realizada amostragem de solo na profundidade de 0 a 20 cm, seguida de análise química e física do solo. O solo apresentou os seguintes características: textura argilosa; pH em CaCl₂ = 4.9; MO = 3.9 dag kg⁻¹; P_{meh} = 79.1 mg dm⁻³; K = 0.29 cmol dm⁻³; Ca = 3.3 cmoldm⁻³; Mg = 1.3 cmol dm⁻³; H + Al = 4.9 cmol dm⁻³; SB =

4.90 cmol dm⁻³; T = 9.80 cmol dm⁻³; e V% = 50. Dada a análise de solo, foi realizado o manejo conforme preconizado para o cultivo de alface (Filgueira, 2013).

Foram avaliadas vinte e três linhagens e seis cultivares de alface do Programa de Melhoramento Genético de Alface Biofortificada da UFU, cadastradas no Software BG α BIOFORT INPI BR512019002403-6 (Maciel et al., 2019b). Os genótipos avaliados foram obtidos após hibridação entre as cultivares Pira 72 versus Uberlândia 10000, rica em carotenoide (Sousa et al., 2007) seguido de sete sucessivas autofecundações realizadas entre 2013 a 2018. Adicionalmente, foi utilizado como testemunha comercial, cultivar Pira 72, totalizando 30 tratamentos no experimento (Figura 1).

As etapas metodológicas para a aquisição e processamento das imagens, quantificação dos pigmentos foliares e análise dos dados estão descritas no fluxograma da Figura 2.

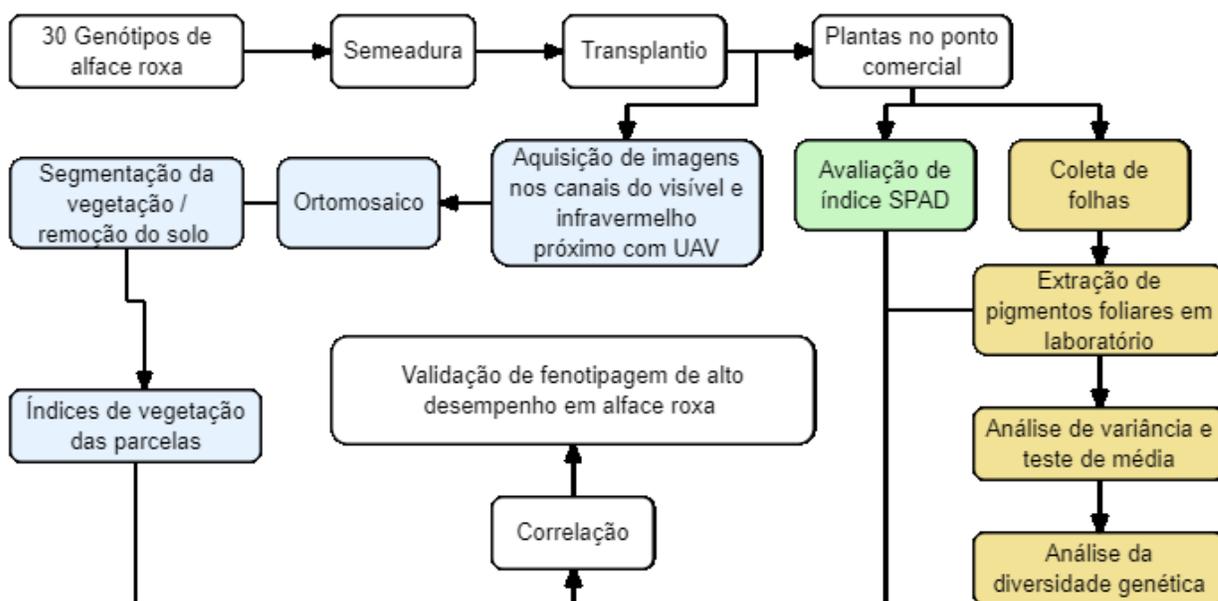


FIGURA 2. Fluxograma das etapas de aquisição e processamento das imagens, quantificação dos pigmentos foliares e análise dos dados em germoplasma de alface roxa.

A sementeira foi realizada em 29 de junho de 2019 em bandejas de poliestireno expandido com 200 células preenchidas com substrato comercial a base de fibra de coco. Após sementeira, as bandejas permaneceram em casa de vegetação do tipo arco, com dimensões de 5 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 branco anti-afídeos. Trinta e sete dias após a semeadura (DAS), foi realizado o transplântio para o campo. O espaçamento adotado foi 0,25 x 0,25 m. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições de vinte plantas, no total de 90 parcelas (Figura 1)

Decorridos dezoito dias após o transplântio no campo, foi realizado o voo para obtenção das imagens. Os parâmetros utilizados no voo foram: altura de 20 metros, sobreposição longitudinal de 80% e sobreposição lateral de 75%. O voo foi realizado de modo automático com o software proprietário DroneDeploy. As imagens coletadas foram processadas no software Pix4Dmapper para geração da ortoimagem. A calculadora raster do software Quantum GIS 3.10.0 (QGIS Development Team, Open Source Geospatial Foundation) foi utilizada para calcular os índices de vegetação (Tabela 1). Para o cálculo do índice médio de cada parcela, as imagens foram segmentadas, removendo os valores dos pixels referentes ao solo no software ImageJ®. Os índices de vegetação testados (Tabela 1) derivaram de imagens capturadas por uma câmera de canais RGN (vermelho + verde + infravermelho próximo) (Survey3 MAPIR) acoplada a um drone DJI Phantom 4 Advanced.

TABELA 1. Índices de vegetação testados para fenotipagem em alface roxa.

Índice de vegetação	Equação ¹	Referência
<i>Chlorophyll Index Green</i> (CIG)	$N/G-1$	Gitelson et al. (2003)
<i>Chlorophyll vegetation index</i> (CVI)	$N*R/G^2$	Vincini et al. (2008)
<i>Green Normalized Difference Vegetation Index</i> (GNDVI)	$(N-G)/(N+G)$	Gitelson et al. (1996)
<i>Normalized Difference Vegetation Index</i> (NDVI)	$(N-R)/(N+R)$	Rouse et al. (1974)

¹R= vermelho; G= verde; N= infravermelho próximo.

Trinta e sete dias após o transplântio foi avaliado o Índice *Soil Plant Analysis Development* (SPAD), no período da manhã. Foram realizadas três leituras por planta nas quatro plantas centrais da parcela, obtendo-se assim a média da parcela. O equipamento utilizado foi o medidor de clorofila modelo Minolta SPAD-502 CFL1030. O dispositivo portátil é composto por dois diodos emissores de luz e um receptor de fotodiodo de silício, que mede a transmitância das folhas em vermelho (650 nm, comprimento de onda absorvido pela clorofila) e infravermelho (940 nm; comprimento

de onda praticamente não absorvido pela clorofila, usado de referência para ajustar diferenças não específicas entre amostras) do espectro eletromagnético (Minolta, 1989).

Para a avaliação do conteúdo dos pigmentos antocianina (AT), carotenoides (CN), clorofila a (CA), clorofila b (CB) e clorofila total (CT) foram utilizadas sistematicamente as mesmas plantas utilizadas para leitura SPAD da etapa antecedente. Este cuidado foi importante por se tratar de um método destrutível. Foram coletadas três folhas do terço médio de quatro plantas centrais de cada parcela e encaminhadas ao laboratório. As folhas ainda frescas foram lavadas e trituradas após remoção da nervura central. Para AT, foi adicionada ao tecido vegetal uma solução composta por etanol 95% e ácido clorídrico (85:15). Já para CN, CA, CB e CT, foi adicionada uma solução de éter de petróleo e acetona (1:1). Após 24 horas de reação em ausência de luz, foi realizada a leitura da absorbância do extrato sobrenadante em espectrofotômetro digital modelo UV-5100. Os comprimentos de onda empregados foram: 535nm para AT; 645, 652 e 663nm para CA CB, CT e 470 nm para carotenoide. A partir das absorbâncias, foram calculados os teores de pigmentos foliares ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido fresco), conforme Francis (1982) e Cassetari et al. (2015).

Os dados obtidos foram avaliados por meio da 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 baseadas na distância Euclidiana. A dissimilaridade genética foi representada por dendrograma obtido pelo método hierárquico pelo método da ligação média entre grupos não ponderado (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages* – UPGMA). O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi calculado para testar a eficiência do agrupamento UPGMA e a importância relativa das variáveis foi analisada pelo método de Singh (1981).

Foi calculada a matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros dos ensaios laboratoriais, os valores inferidos pelo sensor SPAD-502 e os índices de vegetação derivados de registros de reflectância com sensor embarcado em aeronave remotamente pilotada (ARP), a 5% de significância. Correlação com coeficiente r menor que 0,30 foi considerada fraca, 0,30 a 0,59 moderada, 0,60 a 0,89 forte e 0,90 a 1,00 muito forte.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software R 3.6 (RStudio Team, 2020) nos pacotes ExpDesp.pt (Ferreira et al., 2013), hclust (Murtagh, 2012) e NbClust (Charrad et al., 2014).

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a condução do experimento (junho a setembro), foram observadas altas temperaturas, em média 29 °C e máxima de 36 °C (Figura 3). Esses valores estão acima da faixa ideal para o desenvolvimento da cultura da alface que está entre 15,5 °C a 18,3 °C, apesar de tolerarem faixas entre 26,6 °C a 29,4 °C, por alguns dias, desde que as temperaturas noturnas sejam baixas (Radin et al., 2004, Resende et al., 2017). A amplitude térmica diária foi em média 14°C, o que favoreceu o desenvolvimento da cultura. A umidade relativa do ar (UR) foi baixa, chegando ao extremo de 17%, mas em média esteve em 61%. Embora não sejam os mais adequados, esses valores de UR corroboram para uma boa sanidade das plantas. Não houve ocorrência de precipitação e a demanda hídrica foi atendida via irrigação.

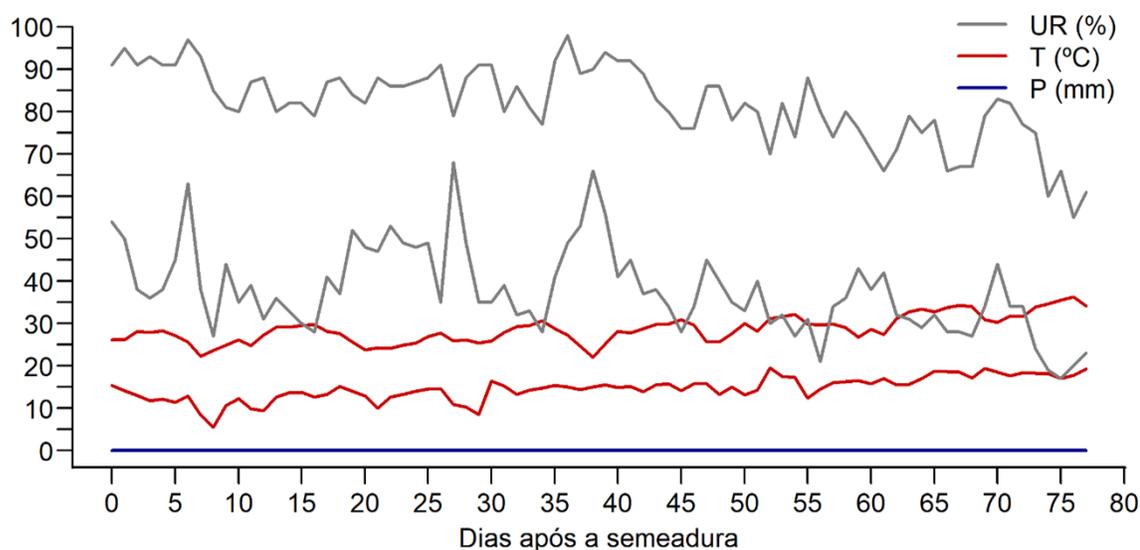


FIGURA 3. Umidade relativa do ar (UR) máxima e mínima, temperatura do ar (T) máxima e mínima e precipitação (P) diárias durante a condução do experimento.

1.3.1. Caracterização do germoplasma e confirmação da diversidade genética para pigmentos foliares

Com base na ANOVA, houve diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$) entre as linhagens para todos os pigmentos foliares (Figura 4).

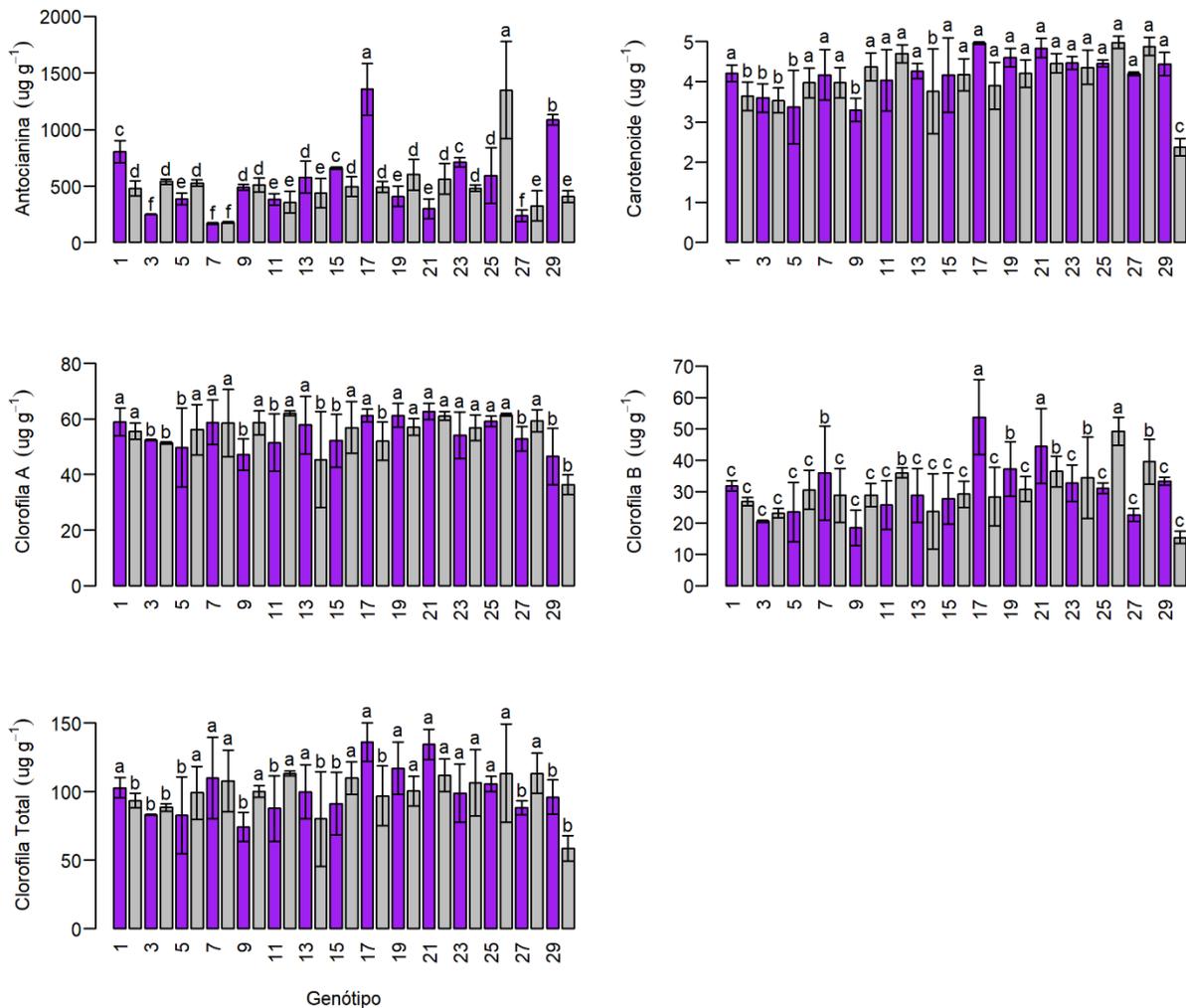


FIGURA 4. Médias referentes à concentração de antocianina, clorofila a, clorofila b e clorofila em trinta genótipos de alface roxa.

Genótipos: 1 = UFU-199#2#2#1; 2 = UFU-7#2#1#1; 3 = UFU-117#1#3#1; 4 = UFU-86#1#2#1; 5 = UFU-75#1#1#1; 6 = UFU BIOFORT199E7; 7 = UFU-206#3#2#1; 8 = UFU-199#2#3#1; 9 = UFU-189#2#3#1; 10 = UFU-184#2#5#1; 11 = UFU-184#2#1#1; 12 = UFU-107#1#2#1; 13 = UFU-86#2#1#1; 14 = UFU-75#3#2#1; 15 = UFU-184#2#3#1; 16 = UFU BIOFORT7E27; 17 = UFU-75#2#2#1; 18 = UFU-75#3#1#1; 19 = UFU-190#1#2#1; 20 = UFU BIOFORT75E33; 21 = UFU-189#2#2#1; 22 = UFU-189#2#1#1; 23 = UFU BIOFORT199E38; 24 = UFU BIOFORT199E40; 25 = UFU-206#1#6#1; 26 = UFU-206#1#3#1; 27 = UFU-117#1#1#1; 28 = UFU-184#2#1; 29 = UFU BIOFORT199E50; 30 = Pira 72. Letras distintas diferem entre si pelo teste scott-knott a 0,05 de significância.

Em relação ao teor de antocianina (AT), os genótipos UFU-75#2#2#1 e UFU-206#1#3#1 se destacaram, diferenciando significativamente dos demais, inclusive da testemunha comercial cv.

Pira 72 (Figura 4), a qual foi 3,3 vezes menor. Os resultados desses genótipos foram superiores aos encontrados por Islam et al. (2019) em ambiente de baixa temperatura e limitação de fósforo e por Park et al. (2012) com alta concentração de CO₂, ambientes que favoreceram o acúmulo de antocianina nas folhas de alface roxa, indicativo que neste trabalho há genótipos de alface roxa biofortificadas para teores elevados de antocianina.

Todos os genótipos no presente estudo e especialmente UFU-206#1#3#1 e UFU-75#2#2#1 foram superiores em relação a cv. Pira 72 para o teor de carotenoides (Scott-knott, $p \leq 0,05$) (Figura 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Souza et al. (2019) para a cultivar Crocantela em cultivo hidropônico em solo em Santa Catarina, Brasil e Song et al. (2020) ao avaliar a cultivar Italy em diferentes intensidades de luz e níveis de concentração da solução de nutrientes no sul da China.

Os genótipos UFU-199#2#2#1, UFU-7#2#1#1, UFU BIOFORT199E7, UFU-206#3#2#1, UFU-199#2#3#1, UFU-184#2#5#1, UFU-107#1#2#1, UFU-86#2#1#1, UFU BIOFORT7E27, UFU-75#2#2#1, UFU-190#1#2#1, UFU BIOFORT75E33, UFU-189#2#2#1, UFU-189#2#1#1, UFU BIOFORT199E38, UFU BIOFORT199E40, UFU-206#1#6#1, UFU-206#1#3#1, UFU-184#2#1 se destacaram quanto ao teor de clorofila a (CA) se diferenciando significativamente da cv. Pira 72 (Scott-knott, $p \leq 0,05$) (Figura 4). Adicionalmente, os genótipos UFU-75#2#2#1, UFU-206#1#3#1 e UFU-189#2#2#1, também se destacaram dos demais e apresentaram teores de clorofila b (CB) 3,5, 3,2 e 2,9 vezes, respectivamente, superiores em relação a testemunha cv. Pira 72 (Figura 4). Valores similares para CA e CB foram encontrados por Caldwell e Britz, 2006.

Para o teor de clorofila total, dezoito genótipos provenientes do programa de melhoramento de alface da UFU se destacaram em relação à testemunha. Em magnitude, as diferenças entre os valores médios para teor de clorofila total variaram de um mínimo de 58,5 ug. g⁻¹ de tecido fresco, para a cv. Pira 72 até um máximo de 136,1 ug. g⁻¹, para a UFU-75#2#2#1 (Figura 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Xue, Hartikainen e Piironen (2001) e Park et al. (2012).

As clorofilas são moléculas de porfirina, tendo como átomo central o magnésio (Borah e Bhuyan, 2017). A clorofila a é o principal componente responsável pela coloração verde das plantas e pela realização da fotossíntese. Já a clorofila b é uma molécula de porfirina contendo Mg e não possui um papel tão essencial no processo de fotossíntese quanto à clorofila a, sua função na planta

consiste na ampliação da faixa de luz utilizada pela fotossíntese e regulação da antena fotossintética (Tanaka e Tanaka, 2000; Kume, Akitsu e Nasahara, 2018). De modo geral, maiores teores de clorofila total potencializam a atividade fotossintética podendo levar a incrementos relacionados a características agronômicas (Pane et al., 2014; Liu et al., 2019). Devido suas propriedades bioativas, as clorofilas tem sido muito usadas na indústria alimentícia e farmacêutica (Queiroz et al., 2017). Cultivares de alface naturalmente ricos em clorofilas são desejados.

Para validar de forma eficiente o uso da fenotipagem de alto desempenho, faz-se necessário avaliar muitos genótipos e comprovar a existência de variabilidade genética no germoplasma (Maciel et al., 2019a). Na presente pesquisa foi confirmada ampla variabilidade genética para pigmentos foliares no germoplasma de alface roxa avaliado. As distâncias variaram de 0,29 (UFU-86#2#1#1 e UFU BIOFORT75E33) a 9,63 (UFU-75#2#2#1 e Pira 72), indicativo de forte dissimilaridade genética. Os grupos formados no dendrograma UPGMA (Figura 4) apresentaram coeficiente de correlação cofenética de 0,858 (teste t, $p < 0,01$). Assim, o dendrograma reflete satisfatoriamente os dados da matriz e os agrupamentos subsequentes. Os grupos foram estabelecidos conforme indicado pela maioria dos índices do estudo de Milligan e Cooper (1985).

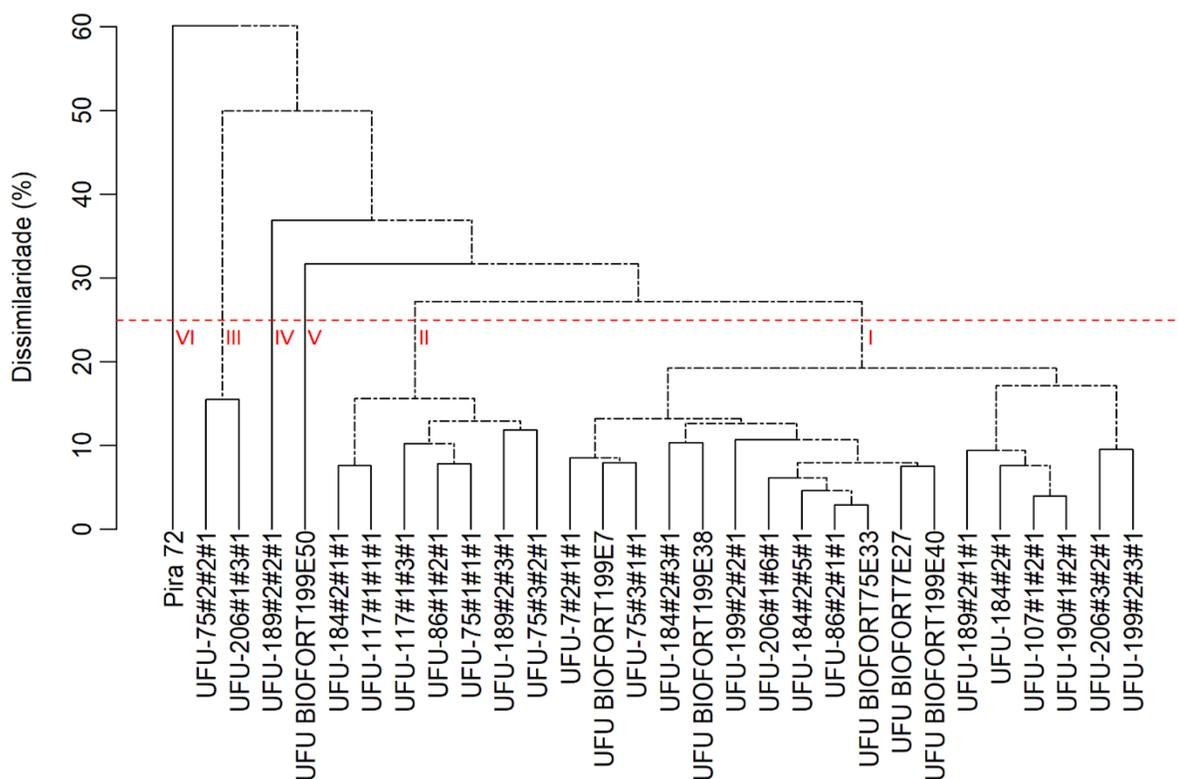


FIGURA 5. Dendrograma da diversidade genética entre trinta genótipos de alface roxa, obtido pelo método de agrupamento ligação média entre grupo - UPGMA.

O grupo I foi composto por 18 genótipos, grupo II- por 7 genótipos, grupo III- 2 genótipos, grupo IV- 1 genótipo, grupo V- 1 genótipo e grupo VI- cultivar comercial Pira 72.

A distância Euclidiana também permitiu quantificar as contribuições relativas de cada um dos pigmentos na diversidade genética dos genótipos de alface de coloração roxa ao partir do critério proposto por Singh (1981). Antocianina foi o composto de maior contribuição para a dissimilaridade genética no germoplasma de alface roxa (37,5%), seguido pela clorofila b (20,0%), carotenoide (14,8%) e clorofila total (14,6%). A clorofila a apresentou a menor contribuição (13,1%).

1.3.2. Validação da fenotipagem de alto desempenho para alface roxa

A Fenotipagem de alto desempenho, além de preservar as plantas do estudo, o que pode ser fundamental para o programa de melhoramento, reduziu o tempo e mão-de-obra de avaliação. Além disso, com a técnica é possível obter dados de todas as plantas da parcela ou individualizá-las, o que seria inviável nas outras metodologias testadas, sendo, portanto, ainda mais eficiente.

Neste contexto, a fenotipagem de alto desempenho pode ser uma excelente alternativa para determinar a quantidade de pigmentos foliares, visando obter resultados de forma rápida, acreditada e com custo extremamente baixo.

A quantificação do teor de antocianina, carotenoide, clorofila a, clorofila b, clorofila total pelo método laboratorial padrão foi demorada, laboriosa e consumiu um grande volume de reagentes químicos de alto custo e toxicidade (3,51 l para trinta tratamentos com três repetições). Para o procedimento de coleta, extração e quantificação dos compostos foram necessárias vinte e sete horas de trabalho com cinco pessoas envolvidas. Já para a estimativa do teor dos pigmentos foliares com o medidor de clorofila SPAD-502, foi necessário um sexto desse tempo (4,5 horas) e apenas duas pessoas. Enquanto isso, para a fenotipagem de alto desempenho, uma única pessoa, em duas horas, fez do planejamento ao voo ao cálculo dos índices de vegetação, o que equivale a 7,4% do tempo do procedimento padrão e 44,4% da estimativa indireta pelo índice SPAD.

Em trabalhos de melhoramento, altas correlações entre características de interesse permitem seleção indireta utilizando a característica mais simples e de menor custo a ser avaliada (Reis et al., 2017; Nascimento-Junior et al., 2018). Assim, para verificar a possibilidade de selecionar genótipos de alface roxa ricos em pigmentos foliares a partir de índices de vegetação, foi calculado a matriz de correlação entre os caracteres (Figura 5).

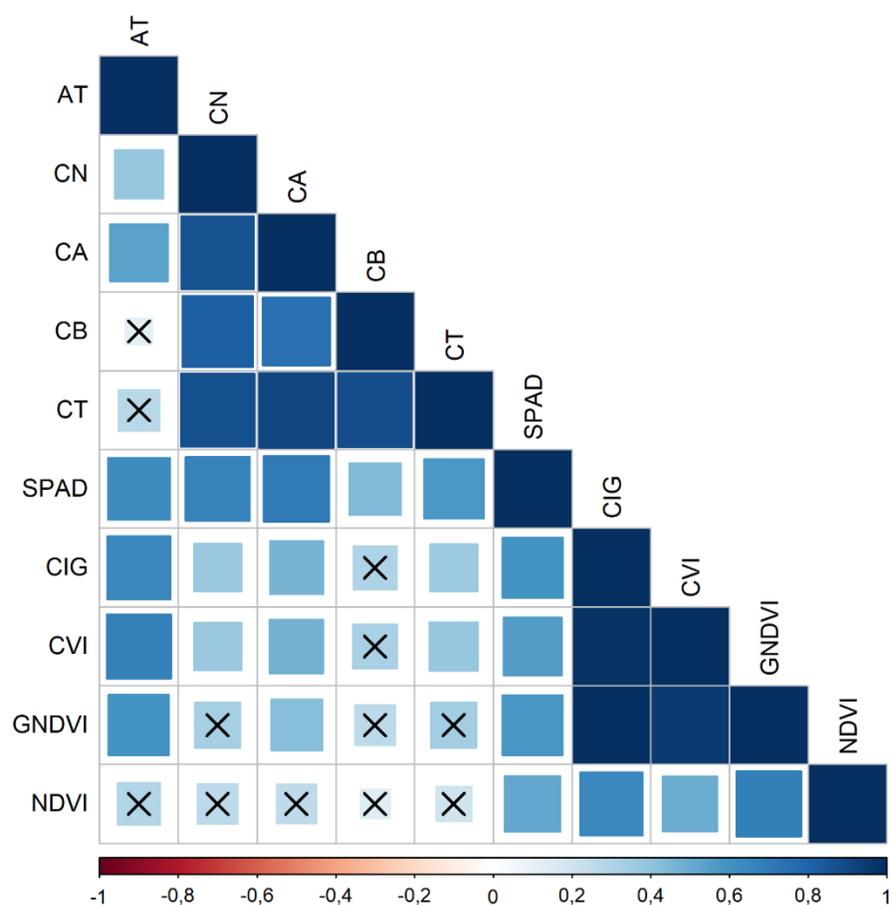


FIGURA 6. Matriz de correlação (r de pearson) para teor de antocianina (AT), carotenoide (CN), clorofila a (CA), clorofila b (CB), clorofila total (CT), índice spad e índices de vegetação (CIG; CVI; GNDVI; NDVI). Correlações positivas são exibidas em tons de azul e as insignificantes pelo teste de pearson a 5% são riscadas.

A antocianina, pigmento que mais contribuiu para o desempenho fenotípico dos genótipos, apresentou alta correlação com os índices CIG, CVI e GNDVI. As antocianinas absorvem a radiação na região espectral verde (com um pico de absorção em torno de 540-560 nm), por isso os índices de vegetação que usam o canal verde em sua formulação tendem a exibir maior sensibilidade à sua presença (Viña e Gitelson, 2011). Plantas com presença de antocianina relativamente alta tendem a exibir reflectância reduzida de verde (Falcioni et al., 2020). Isso explica o fato dos índices CIG, CVI e GNDVI tenderem a aumentar com o incremento do teor de AT.

Apesar de haver estudos que correlacionam o teor de clorofila com todos os índices testados em diferentes espécies vegetais (Jones et al., 2007; Hatfield et al., 2008; Su et al., 2018; Liu et al., 2018), a clorofila total se correlacionou apenas com o CIG e o CVI (Figura 5). Isso acontece porque a relação dos índices de vegetação com o teor de clorofila varia de acordo com as espécies de vegetação, tipo de folha e nível de observação (ou seja, folha ou dossel) e por isso é importante estudos para cada situação (Croft e Chen, 2017). A clorofila a, apresentou correlação significativa moderada com os índices CIG, CVI e GNDVI. Já a clorofila b, não apresentou correlação significativa com os índices testados. O conteúdo de clorofilas A, B e total foi proporcional aos valores medidos por transmitância com o clorofilômetro Minolta SPAD-502, o que está de acordo com o observado em diversos trabalhos (Loh et al., 2002; Jifon et al., 2005; Lión et al., 2007; Coste et al., 2010; Cassetari et al., 2015; Mendoza-Tafolla et al., 2019).

É importante ressaltar, que o conteúdo foliar de antocianina apresentado nos 30 genótipos de alface roxa não está diretamente relacionado à quantidade de conteúdo de clorofila total (Figura 5). Portanto, o conteúdo de ambos os pigmentos deve ser avaliado independente.

O teor de carotenoides foi significativamente correlacionado com os índices CIG e CVI ($p < 0.05$). Cassetari et al. (2015) também encontraram fortes correlações entre carotenoides e SPAD para alface verde.

O NDVI é amplamente usado na agricultura para avaliar o conteúdo de pigmentos, sanidade e estresses por reflectância em diversas espécies vegetais (Skakun et al., 2017). Entretanto, nos genótipos de alface roxa esse índice não se correlacionou com os pigmentos avaliados. Isso pode ter acontecido devido ao fato de que esse índice é significativamente afetado pelas antocianinas acumuladas nas folhas com teor relativamente alto (Hlavinka, Nauš e Špundová, 2013).

Para avaliar a aplicabilidade da fenotipagem de alto desempenho a partir do uso de índices de vegetação, primeiramente foram demonstradas a existência de variabilidade entre os pigmentos foliares (Figura 4) e de variabilidade genética dentro do banco de germoplasma (Figura 5). A variação dos pigmentos foliares é notável, especialmente antocianina, variando de um mínimo de 170 ug.g^{-1} de tecido fresco por UFU-206#3#2#1 a um máximo de 1356 ug.g^{-1} por UFU-75#2#2#1. A antocianina também foi o pigmento que mais contribuiu para o teor total de pigmentos e para a dissimilaridade dos genótipos. A possibilidade de seleção indireta por índices de vegetação foi

demonstrada pelas correlações significativas com os pigmentos foliares (Figura 6). O comparativo da imagem no visível (RGB) com a imagem contendo os canais do vermelho, verde e infravermelho próximo (RGN) que originou os índices de vegetação e os próprios índices para as parcelas que apresentaram teores menores, intermediários e maiores de pigmentos foliares foram obtidos (Figura 7).Figura 7

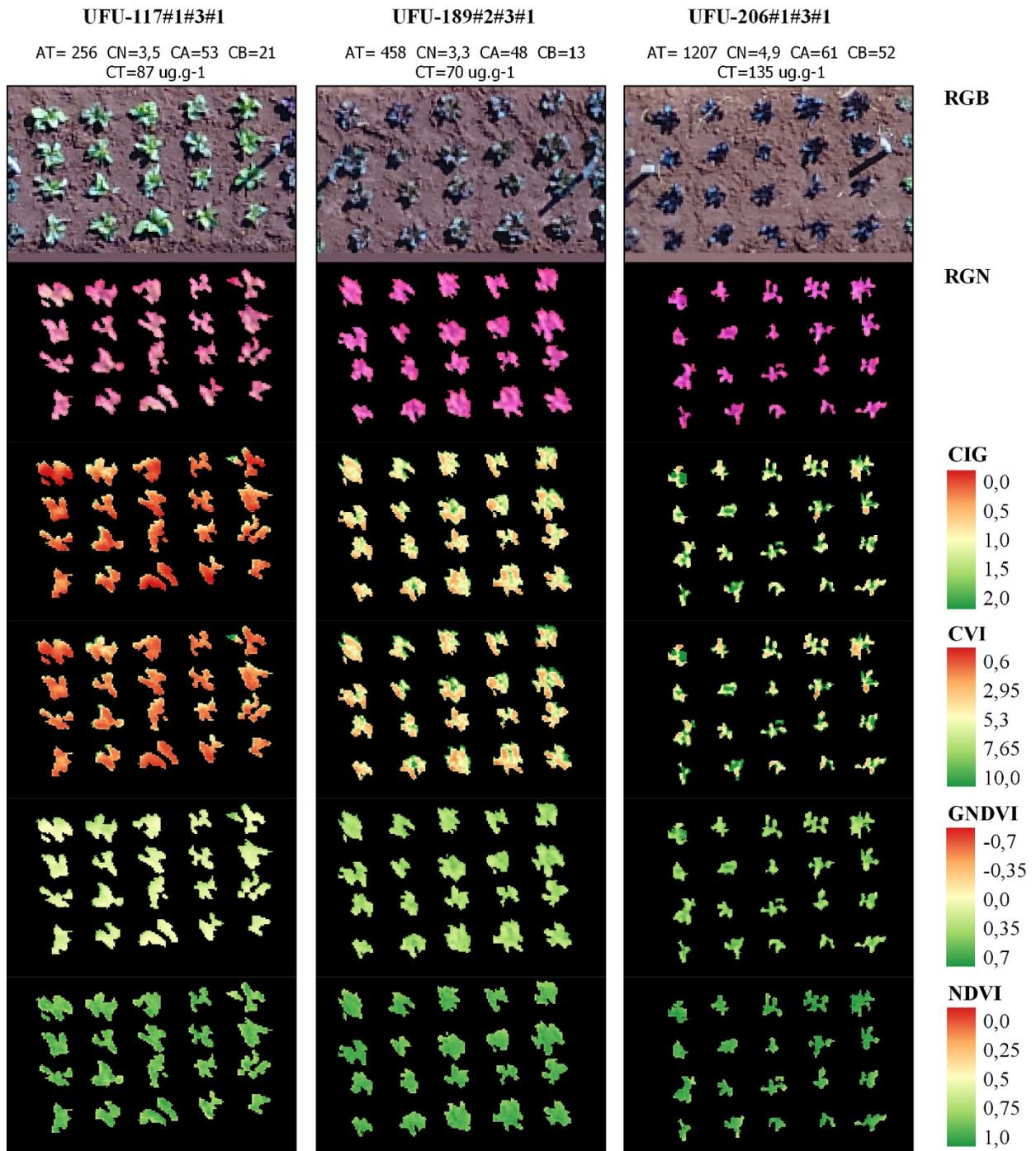


FIGURA 7. Imagem RGB, RGN e dos índices de vegetação CIG, CVI, GNDVI e NDVI das parcelas com teores menores (UFU-117#1#3#1), intermediários (UFU-189#2#3#1) e maiores (UFU#206#1#3#1) de pigmentos foliares (ug.g^{-1} de tecido fresco).
AT = antocianina, CN = carotenoide, CA = clorofila a, CB = clorofila b, CT = clorofila total.

Ficou evidente que as parcelas cujo genótipo apresentou maior conteúdo de pigmentos, especialmente de antocianina, demonstraram índices CGM, CVI e GNDVI mais intensos (Figura 7).

Os valores dos pigmentos foliares, índice SPAD e índices de vegetação, padronizados e centralizados na média foram comparados para cada genótipo (Figura 8).

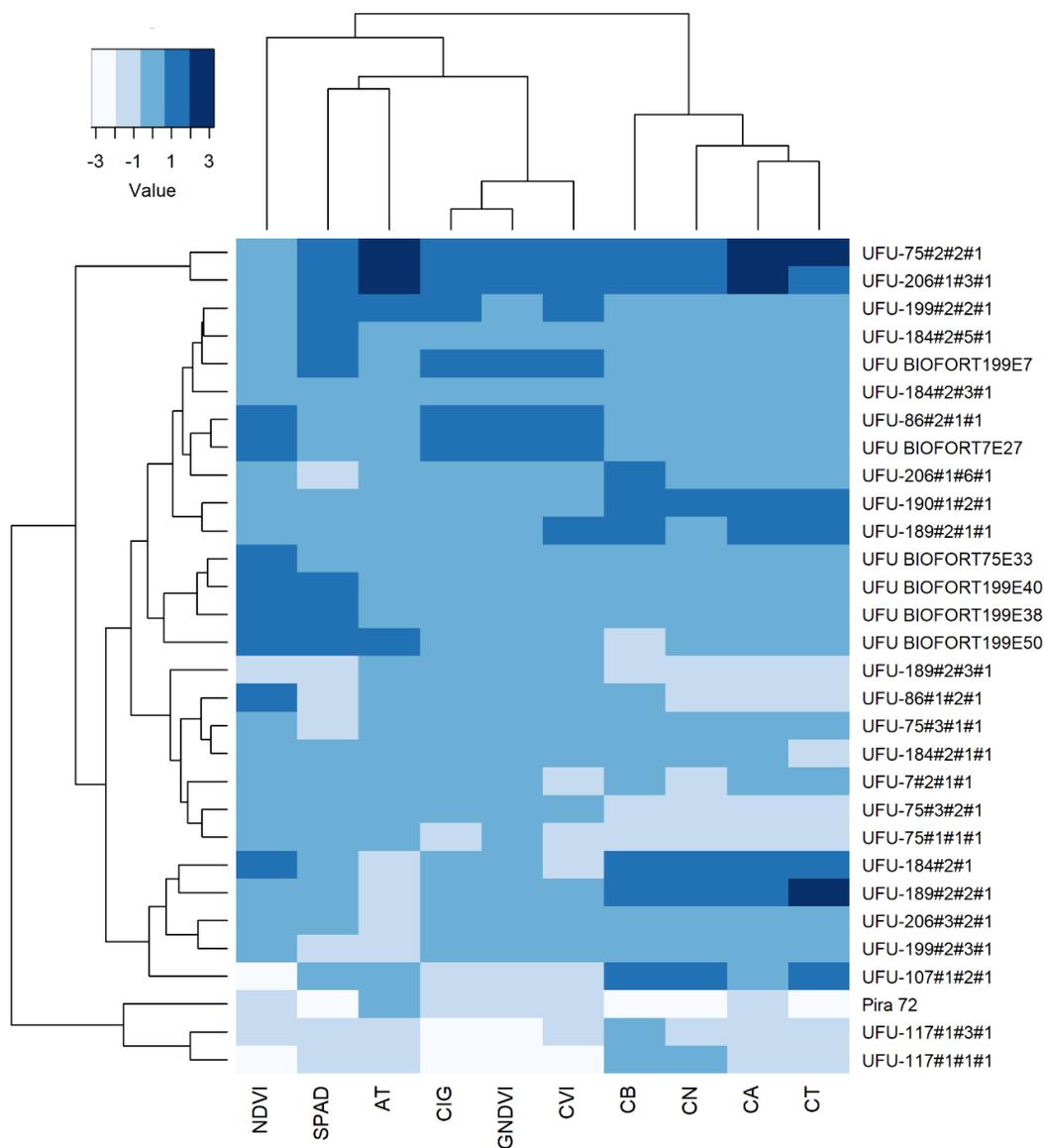


FIGURA 8. Mapa de calor para teor de antocianina (AT), carotenoide (CN), clorofila a (CA), clorofila B (CB), clorofila total (CT), índice SPAD e índices de vegetação (CIG; CVI; GNDVI; NDVI) de 30 genótipos de alface roxa.

Os genótipos que se destacaram para antocianina e clorofila a, UFU-75#2#2#1 e UFU-206#1#3#1, também apresentaram índices CIG, GNDVI e CVI acima da média (Figura 8). Antocianina foi agrupada com os índices SPAD, CIG, GNDVI e CVI, confirmando eficiência em discriminar genótipos com altos teores desse pigmento. Assim, o teor de pigmentos foliares, especialmente antocianina, pode ser avaliado a partir dos índices de vegetação CIG, CVI e GNDVI.

Diversos estudos demonstram que o aumento no conteúdo de antocianina está fortemente correlacionado com maior atividade antioxidante (Prior et al., 1998; Alasalvar et al., 2001; Yoo et al., 2020). Assim, a seleção em alface roxa amparada por estes índices pode resultar em plantas que proporcionam maiores benefícios à saúde.

Sugere-se que a técnica de fenotipagem de alto desempenho permitiu o monitoramento dos aspectos nutricionais da alface. Além disso, viabiliza selecionar plantas biofortificadas em programas de melhoramento genético de alface por se tratar de um método rápido, acreditado e econômico.

1.4. CONCLUSÕES

O uso da fenotipagem de alto desempenho, utilizando índices espectrais, visando seleção de plantas biofortificadas foi eficiente para seleção indireta de plantas com altos teores de pigmentos.

Os índices de vegetação CIG, CVI e GNDVI apresentaram maior potencial para uso visando avaliar o conteúdo de pigmentos foliares em alface roxa, especialmente antocianina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASALVAR, C.; GRIGOR, J. M.; ZHANG, D.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 49, n. 3, p. 1410-1416, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf000595h>

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, vol. 24, n. 1, p. 1, 1949. DOI: <https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.24.1.1>

ATZBERGER, C. Advances in remote sensing of agriculture: Context description, existing operational monitoring systems and major information needs. **Remote sensing**, vol. 5, n. 2, p. 949-981, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/rs5020949>.

BELLUCO, E.; CAMUFFO, M.; FERRARI, S.; MODENESE, L.; SILVESTRI, S.; MARANI, A.; MARANI, M. Mapping salt-marsh vegetation by multispectral and hyperspectral remote sensing. **Remote sensing of environment**, vol. 105, n. 1, p. 54-67, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2006.06.006>

BELOTI, I. F.; MACIEL, G. M.; GALLIS, R. B. A.; FINZI, R. R.; CLEMENTE, A. A.; SIQUIEROLI, A. C. S.; JULIATTI, F. C. Low-altitude, high-resolution aerial imaging for field crop phenotyping in summer squash (*Cucurbita pepo*). **Genetics and Molecular Research**, vol. 19, n. 3. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr18598>.

BENDOKAS, V.; SKEMIENE, K.; TRUMBECKAITE, S.; STANYS, V.; PASSAMONTI, S.; BORUTAITE, V.; LIObIKAS, J. Anthocyanins: From plant pigments to health benefits at mitochondrial level. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 60, p. 1–14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1687421>.

BRAGA, A. R. C.; MURADOR, D. C.; SOUZA, M. DE, L. M.; ROSSO, V. V. DE. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 68, p. 31-40, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.031>.

BORAH, K. D. e BHUYAN, J. Magnesium porphyrins with relevance to chlorophylls. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 20, p. 6497-6509, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7DT00823F>

CALDWELL, C. R.; BRITZ, S. J. Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 19, n. 6-7, p. 637-644, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.016>.

CASSETARI, L. S.; GOMES, M. S.; SANTOS, D. C.; SANTIAGO, W. D.; ANDRADE, J.; GUIMARÃES, A. C.; SOUZA, J. A.; CARDOSO, M. G.; MALUF, W. R.; GOMES, L. A. β -Carotene and chlorophyll levels in cultivars and breeding lines of lettuce. **Acta Horticulturae**, n. 1083, p. 469-473, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.60>.

CHAPARRO, D.; DUVEILLER, G.; PILES, M.; CESCATTI, A.; VALL-LLOSSERA, M.; CAMPS, A.; ENTEKHABI, D. Sensitivity of L-band vegetation optical depth to carbon stocks in tropical forests: a comparison to higher frequencies and optical indices. **Remote sensing of environment**, vol. 232, p. 111303, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111303>.

CHARRAD, M.; GHAZZALI, N.; BOITEAU, V.; NIKNAFS, A.; CHARRAD, M. M. Package “NbClust”. *Journal of Statistical Software*, vol. 61, n. 6, p. 1-36, 2014. Disponível em: <http://cran.rediris.es/web/packages/NbClust/NbClust.pdf>. Acesso em: 01/10/2019.

COOPS, N. C.; STONE, C.; CULVENOR, D. S.; CHISHOLM, L. Assessment of crown condition in eucalypt vegetation by remotely sensed optical indices. **Journal of environmental quality**, vol. 33, n. 3, p. 956-964, 2004. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0956>.

COSTE, S.; BARALOTO, C.; LEROY, C.; MARCON, É.; RENAUD, A.; RICHARDSON, A. D.; ROGGY, J.; SCHIMANN, H.; UDDLING, J.; HÉRAULT, B. Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. **Annals of Forest Science**, vol. 67, n. 6, p. 607-607, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1051/forest/2010020>.

CROFT, H.; CHEN, J. M. Leaf pigment content. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Oxford: Elsevier Inc, p. 1-22, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10547-0>.

DONNELLY, A.; YU, R.; REHBERG, C.; MEYER, G.; YOUNG, E. B. Leaf chlorophyll estimates of temperate deciduous shrubs during autumn senescence using a SPAD-502 meter and calibration with extracted chlorophyll. **Annals of Forest Science**, vol. 77, n. 2, p. 1-12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13595-020-00940-6>.

FALCIONI, R.; MORIWAKI, T.; PATTARO, M.; HERRIG FURLANETTO, R.; NANNI, M. R.; CAMARGOS ANTUNES, W. High resolution leaf spectral signature as a tool for foliar pigment estimation displaying potential for species differentiation. **Journal of plant physiology**, vol. 249, p. 153161, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153161>.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental Designs Package. R Package Version 1.1.2., 2013. Disponível em: < <http://CRAN.R-project.org/package=ExpDes>>.

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

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. **Anthocyanins as food colors**, vol. 1, p. 280, 1982.

GITELSON, A.A.; GRITZ, Y.; MERZLYAK, M.N. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. **Journal of Plant Physiology**, vol. 160, n. 3, p. 271-282, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>.

GITELSON, A.A.; MERZLYAK, M.N.; LICHTENTHALER, H.K., 1996. Detection of red edge position and Chlorophyll. **Journal Plant of Physiology**, vol. 148, n.3-4, p. 501-508, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80285-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80285-9).

HALLIK, L.; KAZANTSEV, T.; KUUSK, A.; GALMÉS, J.; TOMÁS, M.; NIINEMETS, Ü. Generality of relationships between leaf pigment contents and spectral vegetation indices in Mallorca (Spain). **Regional Environmental Change**, vol. 17, n. 7, p. 2097-2109, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10113-017-1202-9>.

HATFIELD, J. L.; GITELSON, A. A.; SCHEPERS, J. S.; WALTHALL, C. L. Application of spectral remote sensing for agronomic decisions. **Agronomy Journal**, vol. 100, p. S-117-S-131, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2006.0370c>.

HAWKINS, T. S.; GARDINER, E. S.; COMER, G. S. Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. **Journal for Nature Conservation**, vol. 17, n. 2, p. 123-127, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2008.12.007>.

HLAVINKA, J.; NAUS, J.; SPUNDOVÁ, M. Anthocyanin contribution to chlorophyll meter readings and its correction. **Photosynthesis research**, vol. 118, n. 3, p. 277-295, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9934-y>.

IBGE. **Censo Agropecuário 2017**: Tabela 6973. 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6953>. Acesso em: 05 de jan. 2020.

ISLAM, M. Z.; LEE, Y. T.; MELE, M. A.; CHOI, I. L.; KANG, H. M. The effect of phosphorus and root zone temperature on anthocyanin of red romaine lettuce. **Agronomy**, vol. 9, n. 2, p. 47, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9020047>.

JIFON, J. L.; SYVERTSEN, J. P.; WHALEY, E. Growth environment and leaf anatomy affect nondestructive estimates of chlorophyll and nitrogen in Citrus sp. leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, vol. 130, n. 2, p. 152-158, 2005. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.152>.

JONES, C. L.; WECKLER, P. R.; MANESS, N. O.; JAYASEKARA, R., STONE, M. L.; CHRZ, D. Remote sensing to estimate chlorophyll concentration in spinach using multi-spectral plant reflectance. **Transactions of the ASABE**, vol. 50, n. 6, p. 2267-2273, 2007. DOI: <https://doi.org/10.13031/2013.24079>.

KUME, A.; AKITSU, T.; NASAHARA, K. N. Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems?. **Journal of Plant research**, vol. 131, n. 6, p. 961-972, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10265-018-1052-7>.

LING, B.; GOODIN, D. G.; RAYNOR, E. J.; JOERN, A. Hyperspectral analysis of leaf pigments and nutritional elements in tallgrass prairie vegetation. **Frontiers in plant science**, vol. 10, p. 142, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00142>.

LIU, L.; YANG, X.; ZHOU, H.; LIU, S.; ZHOU, L.; LI, X.; YANG J.; HAN, X.; WU, J. Evaluating the utility of solar-induced chlorophyll fluorescence for drought monitoring by comparison with NDVI derived from wheat canopy. **Science of the Total Environment**, vol. 625, p. 1208-1217, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.268>.

LIU, C.; LIU, Y.; LU, Y.; LIAO, Y.; NIE, J.; YUAN, X.; CHEN, F. Use of a leaf chlorophyll content index to improve the prediction of above-ground biomass and productivity. **PeerJ**, vol. 6, p. e6240, 2019. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.6240>.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food chemistry**, vol. 108, n. 3, p. 1028-1038, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>.

LOH, F. C.; GRABOSKY, J. C.; BASSUK, N. L. Using the SPAD 502 meter to assess chlorophyll and nitrogen content of benjamin fig and cottonwood leaves. **HortTechnology**, vol. 12, n. 4, p. 682-686, 2002. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.12.4.682>.

LOPES, D. DE C.; MOURA, L. DE O.; STEIDLE NETO, A. J.; FERRAZ, L. DE C. L.; CARLOS, L. DE A.; MARTINS, L. M. Spectral indices for non-destructive determination of lettuce pigments. **Food Analytical Methods**, vol. 10, n. 8, p. 2807-2814, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0853-y>.

MACIEL, G. M.; GALLIS, R. B. DE A.; BARBOSA, R. L.; PEREIRA, L. M.; SIQUIEROLI, A. C. S.; PEIXOTO, J. V. M. Image phenotyping of inbred red lettuce lines with

genetic diversity regarding carotenoid levels. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, vol. 81, p. 154-160, (2019a). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jag.2019.05.016>.

MACIEL, G. M.; SIQUIEROLI, A. C. S.; GALLIS, R. B. A.; PEREIRA, L. M.; SALES, V. F. Programa de computador BG a Biofort. Depositante: Universidade Federal de Uberlândia. BR512019002403-6. Depósito: 01 fev. 2019. Concessão: 23 out. 2019b.

MENDOZA-TAFOLLA, R. O.; JUAREZ-LOPEZ, P.; ONTIVEROS-CAPURATA, R. E.; SANDOVAL-VILLA, M.; ALIA-TEJACAL, I.; ALEJO-SANTIAGO, G. Estimating nitrogen and chlorophyll status of romaine lettuce using SPAD and at LEAF readings. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, vol. 47, n. 3, p. 751-756, 2019. DOI: <https://doi.org/10.15835/nbha47311525>.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, vol. 50, n. 2, p. 159-179, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02294245>.

MINOLTA. **Chlorophyll meter SPAD-502**. Instruction manual. Minolta Co., Osaka, Japan. 22 p, 1989.

MURTAGH F. **Multivariate Data Analysis Software and Resources**. The Classification Society, 2012. URL <http://www.classification-society.org/csna/mda-sw/>

NASCIMENTO-JÚNIOR, I.; MORO, G. V.; MORO, F. V. Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. **Chilean journal of agricultural research**, vol. 78, n. 1, p. 39-47, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-58392018000100039>.

NASER, M. A.; KHOSLA, R.; LONGCHAMPS, L.; DAHAL, S. Characterizing variation in nitrogen use efficiency in wheat genotypes using proximal canopy sensing for sustainable wheat production. **Agronomy**, vol. 10, n. 6, p. 773, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10060773>.

PADILLA, F. M.; DE SOUZA, R.; PENA-FLEITAS, M. T.; GRASSO, R.; GALLARDO, M.; THOMPSON, R. B. Influence of time of day on measurement with chlorophyll meters and canopy reflectance sensors of different crop N status. **Precision Agriculture**, vol. 20, n. 6, p. 1087-1106, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11119-019-09641-1>.

PANE, C.; PALESE, A. M.; CELANO, G.; ZACCARDELLI, M. Effects of compost tea treatments on productivity of lettuce and kohlrabi systems under organic cropping management. **Italian Journal of Agronomy**, vol. 9, n. 3, p. 153-156, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4081/ija.2014.596>.

PARK, Y. G.; PARK, J. E.; HWANG, S. J.; JEONG, B. R. Light source and CO₂ concentration affect growth and anthocyanin content of lettuce under controlled environment. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, vol. 53, n. 6, p. 460-466, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-012-0821-9>

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, vol. 975, n. 3, p. 384-394, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0).

PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol. 46, n. 7, p. 2686-2693, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf980145d>.

QUEIROZ, M. I.; FERNANDES, A. S.; DEPRÁ, M. C.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Introductory Chapter: Chlorophyll Molecules and Their Technological Relevance Chlorophyll. **IntechOpen**, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5772/67953>

RADIN, B.; REISSER JÚNIOR, C.; MATZENAUER, R.; BERGAMASCHI, H. Crescimento de cultivares de alface conduzidas em estufa e a campo. **Horticultura brasileira**, vol. 22, n. 2, p. 178-181, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362004000200003>.

REIS, M. C.; CARDOSO, D. B. O.; JÚNIOR, E. S.; GOMES, B. C.; PEREIRA, L. T. G.; GOMES, D. A.; SOUSA, L. B. Correlation among traits as criterion of cotton genotypes indirect selection. **Genet. Mol. Res**, vol. 16, p. 3-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16039805>.

RESENDE, G. M.; COSTA, N. D.; YURI, J. E.; MOTA, J. H. Adaptação de genótipos de alface crespa em condições semiáridas. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado**

(ALICE), 2017. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1068535>. Acesso em: 30 out. 2020.

ROUSE, J.W.; HAAS, R.H.; SCHELL, J.A.; DEERING, D.W. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. **NASA special publication**, v. 351, n. 1974, p. 309, 1974.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. DA. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura brasileira**, vol. 30, n. 2, p. 187-194, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000200002>

SKAKUN, S.; JUSTICE, CO; VERMOTE, E.; ROGER, JC. Transição de MODIS para VIIRS: uma análise da interconsistência de conjuntos de dados NDVI para monitoramento agrícola. **Jornal internacional de sensoriamento remoto**, v. 39, n. 4, pág. 971-992, 2018. <https://doi.org/10.1080/01431161.2017.1395970>

SHATILOV, M. V.; RAZIN, A. F.; IVANOVA, M. I. Analysis of the world lettuce market. In **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, vol. 395, n. 1, p. 012053, 2019. IOP Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/395/1/012053>.

SHI, T.; LIU, H.; CHEN, Y.; WANG, J.; WU, G. Estimation of arsenic in agricultural soils using hyperspectral vegetation indices of rice. **Journal of hazardous materials**, vol. 308, p. 243-252, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.022>.

SILVA JUNIOR, C. A.; NANNI, M. R.; SHAKIR, M.; TEODORO, P. E.; DE OLIVEIRA-JÚNIOR, J. F.; CEZAR, E.; GOISF, G.; LIMA, M.; WOJCIECHOWSKI, J. C.; SHIRATSUCHI, L. S. (Soybean varieties discrimination using non-imaging hyperspectral sensor. **Infrared Physics & Technology**, vol. 89, p. 338-350, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2018.01.027>.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, vol. 41, n. 1, p. 237-245, 1981.

SONG, J.; HUANG, H.; HAO, Y.; SONG, S.; ZHANG, Y.; SU, W.; LIU, H. Nutritional quality, mineral and antioxidant content in lettuce affected by interaction of light intensity and nutrient solution concentration. **Scientific reports**, vol. 10, n. 2796, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59574-3>.

SOUSA, C. S. D.; BONETTI, A. M.; GOULART FILHO, L. R. MACHADO, J. R. D. A.; LONDE, L. N.; BAFFI, M. A.; ... & KERR, W. E. Divergência genética entre genótipos de alface

por meio de marcadores AFLP. **Bragantia [online]**, v. 66, n. 1, p. 11-16, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052007000100002>.

SOUZA, P. F. DE; BORGHEZAN, M.; ZAPPELINI, J.; CARVALHO, L. R. DE; REE, J.; BARCELOS-OLIVEIRA, J. L.; PESCADOR, R. Physiological differences of ‘Crocantela’ lettuce cultivated in conventional and hydroponic systems. **Horticultura Brasileira**, vol. 37, n. 1, p. 101-105, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-053620190116>.

SU, J.; LIU, C.; COOMBES, M.; HU, X.; WANG, C.; XU, X.; LI, Q.; GUO, L.; CHEN, W.-H. Wheat yellow rust monitoring by learning from multispectral UAV aerial imagery. **Computers and electronics in agriculture**, vol. 155, p. 157-166, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.10.017>.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll b is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyryns*, vol. 9, n. 1, p. 240-245, 2000.

VIEIRA, D. A. D. P.; PORTES, T. D. A.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; TEIXEIRA, J. B. Fluorescence and levels of chlorophyll in pineapple plants cv. perola submitted to different concentration of ammonium sulphate. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 32, n. 2, p. 360-368, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452010005000061>.

VIÑA, A.; GITELSON, A. A. Sensitivity to foliar anthocyanin content of vegetation indices using green reflectance. **IEEE Geoscience and Remote Sensing Letters**, vol. 8, n. 3, p. 464-468, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1109/LGRS.2010.2086430>.

VINCINI, M.; FRAZZI, E.; D’ALESSIO, P. A broad-band leaf chlorophyll index at the canopy scale. **Precis. Agric.**, vol. 9, p. 303-319, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11119-008-9075-z>

XUE, T.; HARTIKAINEN, H.; PIIRONEN, V. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. **Plant and soil**, vol. 237, n. 1, p. 55-61, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1013369804867>.

YOO, K. S.; BANG, H.; PIKE, L.; PATIL, B. S.; LEE, E. J. Comparing carotene, anthocyanins, and terpenoid concentrations in selected carrot lines of different colors. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00225-6>.

ZHANG, C.; KOVACS, J. M. The application of small unmanned aerial systems for precision agriculture: a review. **Precision agriculture**, vol. 13, n. 6, p. 693-712, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11119-012-9274-5>.

2. FENOTIPAGEM DE ALTO DESEMPENHO PARA DETECTAR ANTOCIANINAS, CAROTENOIDES E CLOROFILAS EM GERMOPLASMA DE ALFACE ROXA E VERDE

RESUMO

A fome oculta (deficiência de micronutrientes) é um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Visando superar esse problema, a busca por alimentos funcionais e ricos nutricionalmente tem aumentado. A alface está entre esses alimentos saudáveis, tendo em sua composição compostos bioativos como os pigmentos antocianinas, carotenoides e clorofilas, os quais tem forte ação antioxidante e trazem muitos benefícios ao organismo humano. Para favorecer o consumo destes compostos é desejável a obtenção de plantas biofortificadas. Entretanto, alto custo e a demora das análises laboratoriais da composição vegetal tem limitado trabalhos nesta linha. No presente estudo, foi avaliado o conteúdo de antocianina, carotenoides, clorofila a, clorofila b e clorofila total em quinze genótipos de alface roxa e verde além de índice SPAD e índices de vegetação em imagem nos canais do visível (RGB) para fenotipagem de alto desempenho. Foi confirmada a variabilidade para teores de pigmentos foliares entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$) e pelo dendrograma UPGMA com base na matriz de distância Euclidiana. Os índices de vegetação, principalmente o GLI, foram correlacionados com os pigmentos avaliados. Foram geradas regressões lineares entre o GLI (índice de folha verde) e os pigmentos foliares. O GLI foi um bom preditor para estimar o teor de antocianina ($r = -0,83$; $r^2 = 0,75$), carotenoide ($r = -0,59$; $r^2 = 0,43$), clorofila a ($r = -0,69$; $r^2 = 0,48$), clorofila b ($r = -0,62$; $r^2 = 0,39$) e clorofila total ($r = -0,77$; $r^2 = 0,65$) em alface roxa e verde. Portanto, a técnica de fenotipagem de alto desempenho pode ser empregada para avaliar pigmentos foliares em programas de melhoramento, bem como em cultivos para o monitoramento de níveis de biofortificação.

Palavras-chave: alimentos biofortificados; imagem RGB; *Lactuca sativa* L.; melhoramento genético; método indireto; nutrição.

High-throughput phenotyping to detect anthocyanins, chlorophylls, and carotenoids in red and green lettuce germplasm

ABSTRACT

Hidden hunger (micronutrient deficiency) is a major public health problem worldwide. In order to overcome this problem, the search for functional and nutritionally rich foods has increased. Lettuce is among these healthy foods, having in its composition bioactive compounds such as anthocyanin pigments, carotenoids and chlorophylls, which have a strong antioxidant action and bring many benefits to the human body. To favor the consumption of these compounds, it is desirable to obtain biofortified plants. However, high cost and the delay in laboratory analysis of plant composition has limited work in this line. In the present study, the content of anthocyanin, carotenoids, chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll was evaluated in fifteen genotypes of red and green lettuce in addition to the SPAD index and vegetation indexes in the image in the visible channels (RGB) for high-throughput phenotyping technique. The variability for leaf pigment content between treatments was confirmed by the Scott-Knott test ($p < 0.05$) and by the UPGMA dendrogram based on the Euclidean distance matrix. The vegetation indexes, mainly the GLI, were correlated with the pigments evaluated. Linear regressions were generated between GLI (green leaf index) and leaf pigments. The GLI was a good predictor to estimate the content of anthocyanin ($r = -0.83$; $r^2 = 0.75$), carotenoid ($r = -0.59$; $r^2 = 0.43$), chlorophyll a ($r = -0.69$; $r^2 = 0.48$), chlorophyll b ($r = -0.62$; $r^2 = 0.39$) and total chlorophyll ($r = -0.77$; $r^2 = 0.65$) in red and green lettuce. Therefore, the high-throughput phenotyping technique can be used to evaluate leaf pigments in breeding programs, as well as in crops for monitoring biofortification levels in red and green lettuce.

Keywords: biofortified foods; genetical enhancement; indirect method; *Lactuca sativa* L.; nutrition; RGB image.

2.1.INTRODUÇÃO

A fome oculta (deficiência de micronutrientes) é um sério problema em todo o mundo (Cuenca et al., 2020; Murray et al., 2021) e sua principal causa são dietas desequilibradas. Atualmente, esse é o principal fator mundial de risco de mortes (FAO et al., 2019). Esse problema tem estimulado a população a buscar alimentos ricos nutricionalmente e com efeitos benéficos à saúde humana e longevidade (Giordano et al., 2019). A biofortificação é um dos meios para enriquecer nutricionalmente partes comestíveis das plantas e obter alimentos funcionais (Finkelstein et al., 2017). A Alface (*Lactuca sativa* L.) é uma cultura promissora para biofortificação devido sua popularidade em todo o mundo (Camejo et al., 2020).

A maioria das variedades de alface cultivadas possuem coloração verde, mas um pequeno grupo apresenta coloração roxa devido ao alto acúmulo de antocianinas (Zhang et al., 2016). Antocianinas e outros pigmentos vegetais como as clorofilas e carotenoides apresentam forte ação antioxidante e são essenciais na fisiologia das plantas (Lopes et al., 2017).

Pesquisas anteriores revelaram que antocianinas, carotenoides e clorofilas podem prevenir o aparecimento de doenças crônicas como câncer ou doenças cardiovasculares, além de aumentar a resposta imunológica (Braga et al., 2018; Bendokas et al., 2019). Além da relação com o bem-estar físico, esses pigmentos vegetais promovem o bem-estar mental quando fazem parte de uma dieta saudável regular (Ocean, Howley e Ensor, 2019). Desde a divulgação dessas pesquisas, verduras e frutas coloridas ganharam maior atenção.

Entretanto, cultivares de alface têm características genéticas, fenotípicas e comerciais significativamente diferentes e a qualidade nutricional é uma das características com grande variabilidade (Yang et al., 2018). O conhecimento sobre a composição de cada cultivar é muito limitado. Entre os fatores que limitam a caracterização nutricional de cultivares de alface e trabalhos de biofortificação estão o alto custo e a demora das análises laboratoriais (Maciel et al., 2019a).

Diversos estudos demonstram o potencial de índices de vegetação calculados a partir de imagens no espectro do visível (RGB) para avaliar parâmetros fotossintéticos em culturas (Yadav, Ibaraki, Gupta, 2010; Riccardi et al., 2014; Guo et al., 2020). Entretanto, trabalhos que avaliam antocianinas, carotenoides e clorofilas por sensoriamento remoto em germoplasma de alface com diversidade de cores são escassos.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi validar a estimativa de antocianina, clorofila e carotenoides em germoplasma de alface roxa e verde a partir de imagens RGB.

2.2.MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia (Figura 9), no município de Monte Carmelo (873 m de altitude), Minas Gerais, Brasil, de junho a setembro de 2019. O clima da região é do tipo Aw-tropical, caracterizado por verão quente e úmido e inverno frio e seco, segundo classificação de Köppen (1948).

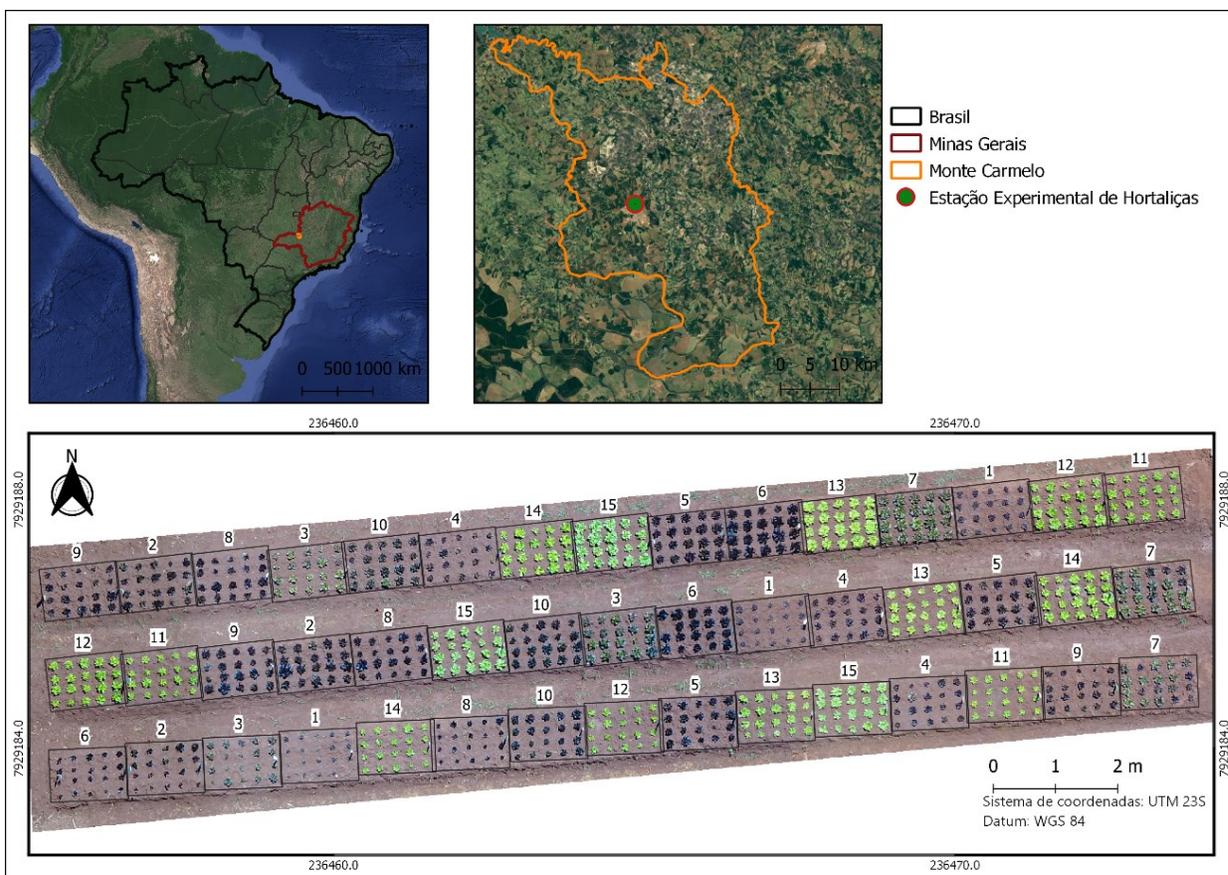


FIGURA 9. Localização do experimento e distribuição dos genótipos de alface roxa e verde em campo. 1: Purpurita; 2: UFU-215#2#2; 3: UFU-215#3#2; 4: UFU-104#1#1; 5: UFU-215#6#5; 6: UFU-215#1#2; 7: UFU-215#7#3; 8: UFU MC MINIBIOFORT2; 9: UFU-215#10#2; 10: UFU-215#13#1; 11: UFU-66#4#2; 12: UFU-66#3#1; 13: UFU-66#8#1; 14: UFU-66#7; 15: Vitória.

Foram avaliados treze genótipos de minialface do Programa de Melhoramento Genético

de Alface Biofortificada da UFU, cadastradas no Software BG α BIOFORT INPI BR512019002403-6 (Maciel et al., 2019b). Os genótipos avaliados foram obtidos após hibridação entre as cultivares Pira 72 versus Uberlândia 10000, biofortificada (Sousa et al., 2007) seguido de sete sucessivas autofecundações realizadas entre 2013 a 2018. Adicionalmente, foram utilizadas como testemunhas comerciais, as cultivares Purpurita e Vitória, totalizando 15 tratamentos no experimento (Figura 9).

A semeadura foi realizada em junho de 2019 em bandejas de poliestireno expandido com 200 células preenchidas com substrato comercial a base de fibra de coco. Após semeadura, as bandejas permaneceram em casa de vegetação do tipo arco, com dimensões de 5 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 branco anti-afídeos. Trinta e sete dias após a semeadura (DAS), foi realizado o transplântio para o campo. O espaçamento adotado foi 0,25 x 0,25 m. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições de vinte plantas, no total de 45 parcelas (Figura 9).

As etapas metodológicas para a quantificação dos pigmentos foliares, processamento das imagens e análise dos dados estão apresentadas no fluxograma da Figura 10.

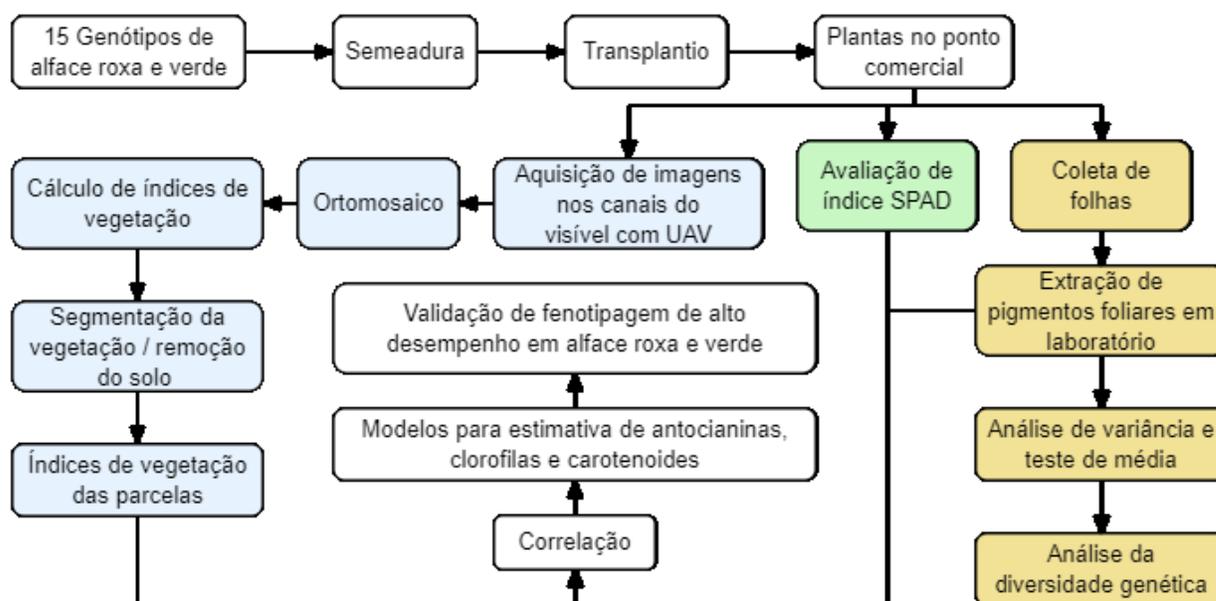


FIGURA 10. Fluxograma das etapas de aquisição e processamento das imagens, quantificação dos pigmentos foliares e análise dos dados em germoplasma de alface roxa e verde.

Decorridos trinta e dois dias após o transplante no campo, foi realizado o voo para obtenção das imagens. Os parâmetros utilizados no voo foram: altura de 20 metros, sobreposição longitudinal de 80% e sobreposição lateral de 75%. O voo foi realizado de modo automático com o software proprietário DroneDeploy. As imagens coletadas foram processadas e ortorretificadas no software Pix4Dmapper para geração do ortomosaico.

Dois dias após a coleta das imagens foi avaliado o conteúdo foliar de antocianinas (AT), carotenoides totais (CR), clorofila a (CA), clorofila b (CB) e clorofila total (CT). Foram coletadas três folhas do terço médio de quatro plantas centrais de cada parcela e encaminhadas ao laboratório. As folhas ainda frescas foram lavadas e trituradas após remoção da nervura central. Para AT, foi adicionada ao tecido vegetal uma solução composta por etanol 95% e ácido clorídrico (85:15). Já para CN, CA, CB e CT, foi adicionada uma solução de éter de petróleo e acetona (1:1). Após 24 horas de reação em ausência de luz, foi realizada a leitura da absorbância do extrato sobrenadante em espectrofotômetro digital modelo UV-5100. Os comprimentos de onda empregados foram: 535nm para AT; 645, 652 e 663nm para CA CB, CT e 470 nm para CN. A partir das absorbâncias, foram calculados os teores de pigmentos foliares ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido fresco), conforme Francis (1982) e Cassetari (2012).

O Índice *Soil Plant Analysis Development* (SPAD) foi avaliado na manhã seguinte à extração de pigmentos foliares em laboratório. Foram realizadas três leituras por planta nas quatro plantas centrais da parcela, obtendo-se assim a média da parcela. Foi utilizado o medidor de clorofila modelo Minolta SPAD-502 CFL1030, que mede a transmitância das folhas nos comprimentos de onda do vermelho e infravermelho (Minolta, 1989).

No processamento de imagem foram testados índices de vegetação (Tabela 2) nas quarenta e cinco parcelas para criação de camada máscara e segmentação da vegetação. O principal resultado do processo de segmentação é uma imagem binária (camada máscara), onde a vegetação é separada dos demais objetos (Hassanein, Lari e El-Sheimy, 2018). Este procedimento objetivou a remoção dos pixels referentes ao fundo da imagem (solo) para melhor estudo do comportamento da vegetação (Figura 11).

TABELA 2. Índices de vegetação testados para fenotipagem em alfaces roxas e verdes.

Índice de Vegetação	Equação ¹	Referências
<i>Brightness Index</i> (BI)	$\sqrt{((R^2+G^2+B^2)/3)}$	Richardson and Wiegand (1977)
<i>Blue Green Pigment Index</i> (BGI)	B/G	Zarco-Tejada et al. (2005)
<i>Green Leaf Index</i> (GLI)	$(2G-R-B)/(2G+R+B)$	Louhaichi, Borman e Johnson (2001)
<i>Primary Colors Hue Index</i> (HI)	$(2*R-G-B)/(G-B)$	Escadafal et al. (1994)
<i>Overall Hue Index</i> (HUE)	$\text{atan}(2*(B-G-R)/30,5*(G-R))$	Escadafal et al. (1994)
<i>Normalized Green Red Difference Index</i> (NGRDI)	$(G-R)/(G+R)$	Tucker (1979)
<i>Soil Color Index</i> (SCI)	$(R-G)/(R+G)$	Mathieu et al. (1998)
<i>Spectral Slope Saturation Index</i> (SI)	$(R-B)/(R+B)$	Escadafal et al. (1994)
<i>Visible Atmospherically Resistant Index</i> (VARI)	$(G-R)/(G+R-B)$	Gitelson et al. (2002)

¹ R= banda do vermelho; G= banda do verde; B= banda do azul.

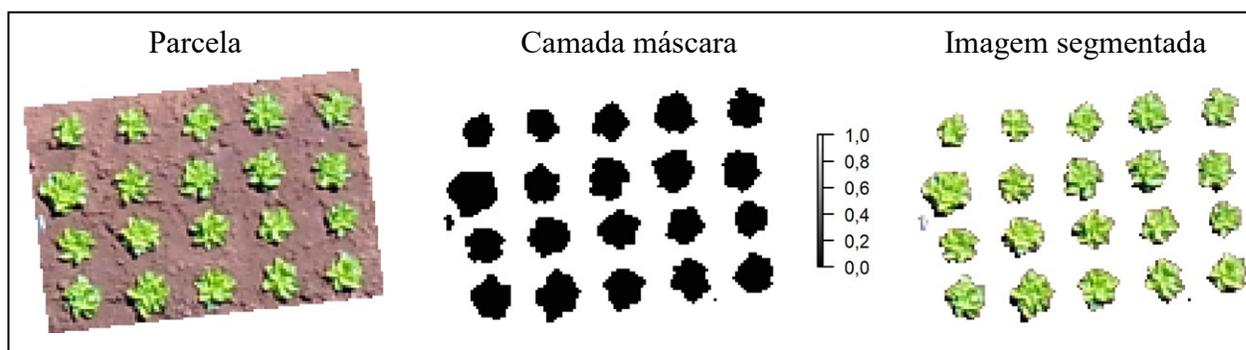


FIGURA 11. Processo de segmentação da vegetação. Na camada máscara, valores 0 referem-se à vegetação e 1 ao solo.

Após a segmentação foram calculados os índices de vegetação descritos na Tabela 2 e extraído o índice médio de cada parcela para análise do teor de pigmentos foliares por imagem.

As análises de imagem foram realizadas no software R versão 3.6.3 (R Core Team, 2020), utilizando o pacote R FieldImageR (Matias et al., 2020). Os dados foram analisados estatisticamente no software R versão 3.6.3 (R Core Team, 2020). A significância estatística das diferenças dos dados obtidos foi avaliada por meio da análise de variância, pelo teste F ($p \leq 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando o pacote R ExpDesp.pt (Ferreira et al., 2013).

As análises multivariadas de dissimilaridade genética entre os genótipos foram baseadas na distância Euclidiana. A dissimilaridade genética foi representada por dendrograma obtido pelo método hierárquico pelo método da ligação média entre grupos não ponderados (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages – UPGMA). O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi calculado para testar a eficiência do agrupamento UPGMA e a importância relativa das variáveis foi analisada pelo método de Singh (1981). Para essas análises foram utilizados os pacotes R Vegan (Oksanen et al., 2019), NbClust (Charrad et al., 2014), Bitools (da Silva, Malafaia e Menezes, 2017).

Foi calculada a matriz de correlação de Pearson a 5% de significância entre os pigmentos foliares avaliados em laboratório, índice SPAD medido em campo e os índices de vegetação obtidos via sensoriamento remoto. Para isso, foi utilizado o pacote R Hmisc (Harrell Jr e Dupont, 2019).

Com o índice de vegetação que apresentou maior correlação com os teores de pigmentos foliares foram calculados os modelos de estimativa de antocianina, carotenoide, clorofila a, clorofila b e clorofila total.

2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Caracterização do germoplasma e confirmação da diversidade genética para pigmentos foliares

Com base na análise de variância (ANOVA) houve diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$) entre os genótipos de alface para os teores de antocianina, carotenoide, clorofila a, clorofila b e clorofila total. As médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) estão apresentadas na Figura 12.

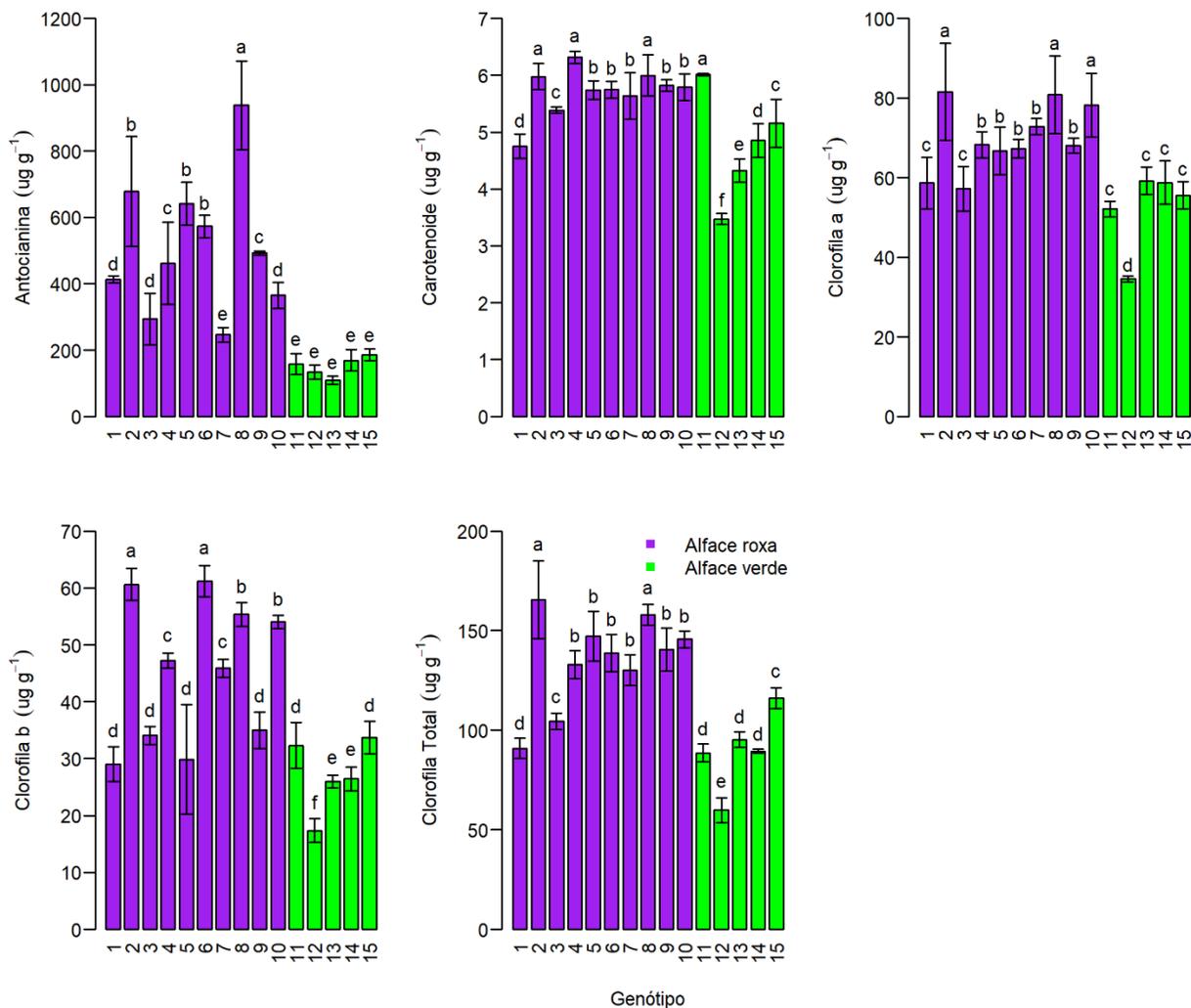


FIGURA 12. Teores de antocianina, carotenoide, clorofila a, clorofila b e clorofila total de quinze genótipos de alface roxa e verde. 1: Purpurita; 2: UFU-215#2#2; 3: UFU-215#3#2; 4: UFU-104#1#1; 5: UFU-215#6#5; 6: UFU-215#1#2; 7: UFU-215#7#3; 8: UFU MC MINIBIOFORT2; 9: UFU-215#10#2; 10: UFU-215#13#1; 11: UFU-66#4#2; 12: UFU-66#3#1; 13: UFU-66#8#1; 14: UFU-66#7; 15: Vitória. Letras distintas, nas barras, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 0,05 de significância.

O teor de antocianina variou entre 108,7 para UFU-66#8#1 a 937,9 a $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido fresco para a UFU MC MINIBIOFORT2, cultivar biofortificada cadastradas no Software BG α BIOFORT (Maciel et al., 2019b). A antocianina está fortemente correlacionada com atividade antioxidante no organismo humano e dessa forma, o consumo da cultivar UFU MC

MINIBIOFORT2 pode apresentar muitos benefícios à saúde (Prior et al., 1998; Alasalvar et al., 2001; Yoo et al., 2020).

Os genótipos de alface roxa apresentaram altas concentrações de antocianina, exceto o UFU-215#7#3. Esse genótipo está classificado como roxo, entretanto, apresentou teor de antocianina estatisticamente igual aos genótipos de coloração verde. O comportamento desse genótipo pode ser explicado pela expressão das cores roxa e verde simultaneamente nas folhas desse genótipo, sendo do tipo variegado (da Silveira et al., 2019). Esse resultado está de acordo com o esperado, pois a antocianina é o pigmento que confere a coloração roxa às folhas (Francis et al., 1982; Llorach et al., 2008, Zhang et al., 2016, Bendokas et al., 2019).

Para carotenoides, a variação entre os genótipos foi de 45%. Os genótipos UFU-215#2#2, UFU-104#1#1, UFU MC MINIBIOFORT2 e UFU-66#4#2 se destacaram, chegando a apresentar 6,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido fresco. Além de ter ação antioxidante, os carotenoides são formas de provitamina A que ao serem ingeridos podem então ser convertidos em vitamina A (Sherwin et al., 2012). A deficiência desta vitamina é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo causa de distúrbios como xerofthalmia e aumento do risco de doenças infecciosas (Sherwin et al., 2012; Vijayageetha et al., 2019). Dessa forma, cultivares biofortificadas em carotenoides são muito desejadas.

Os genótipos UFU-215#2#2 e UFU MC MINIBIOFORT2 apresentaram as maiores concentrações de clorofila a, b e total avaliadas. Enquanto no genótipo UFU-215#2#2 a concentração de clorofilas chegou a 165,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido fresco, o genótipo UFU-66#3#1 apresentou apenas 40% desse valor (59,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido fresco). Alto teor de clorofilas pode beneficiar indústria alimentícia e farmacêutica que utilizam esses compostos e agricultores devido maior capacidade fotossintética dos vegetais (Queiroz et al., 2017). O consumo de vegetais ricos em clorofila também pode prevenir a obesidade e melhorar a tolerância à glicose (Li et al., 2019).

Além de comparar o teor de pigmentos dos genótipos de alface roxa e verde quantificados em laboratório pelo teste de Scott-Knott (Figura 12), também foi realizado agrupamento dos genótipos utilizando medidas de dissimilaridade genética para comprovar a diversidade do germoplasma e possibilitar o estudo de fenotipagem por imagem.

A distância Euclidiana entre os quinze tratamentos variou de 0,67 (UFU-215#3#2 e Vitória) a 7,34 (UFU MC MINIBIOFORT2 e UFU-66#3#1), indicando diversidade genética. Os

grupos formados no dendrograma UPGMA (Figura 13) apresentaram coeficiente de correlação cofenética de 0,79 (teste t, $p < 0,01$). Assim, o dendrograma reflete satisfatoriamente os dados da matriz e os agrupamentos subsequentes. O número de grupo foi estabelecido conforme indicado pela maioria dos índices testados por Milligan e Cooper (1985).

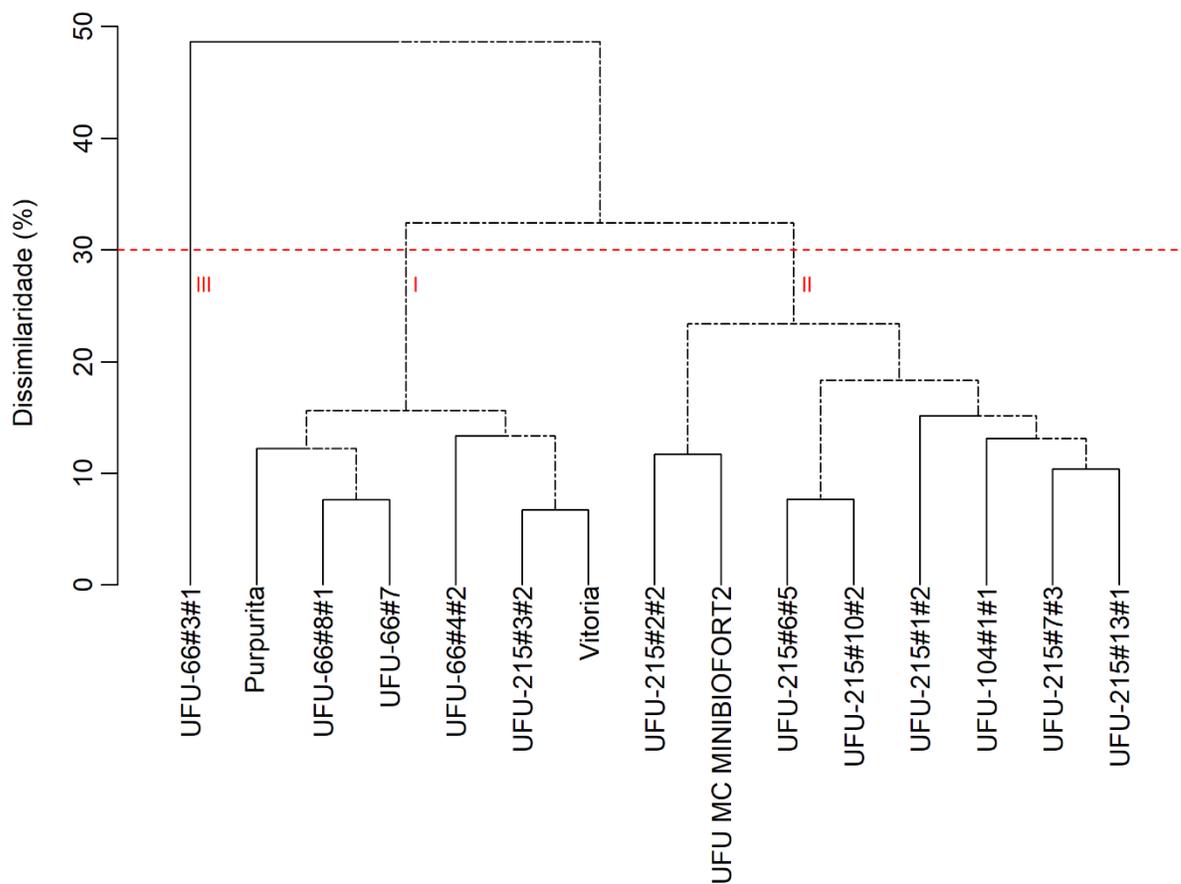


FIGURA 13. Dendrograma da diversidade genética entre 15 genótipos de alface dos tipos roxa e verde, obtido pelo método de agrupamento ligação média entre grupo - UPGMA.

O grupo I (Figura 13) foi composto por seis genótipos, dentre eles as duas testemunhas comerciais (Purpurita e Vitória). O grupo II reuniu oito genótipos, todos roxos, os quais destacaram para altos teores de pigmentos foliares. No grupo III ficou isolado o genótipo verde UFU-66#3#1, caracterizado por apresentar baixo conteúdo de todos os pigmentos foliares avaliados.

A UFU MC MINIBIOFORT2, cultivar biofortificada, foi agrupada no grupo II, confirmando que os genótipos desse grupo são biofortificados.

A importância relativa de caracteres a partir do critério proposto por Singh (1981) indicou que antocianina foi o composto de maior contribuição para a dissimilaridade genética no germoplasma de alface verde e roxa (27,7%), seguido por carotenoide (24,0%) e clorofila a (20,1%). As menores contribuições foram da clorofila b (16,3%) e clorofila total (14,0%).

2.3.2. *Segmentação das plantas para imagens RGB*

A aplicação das imagens obtidas com aeronaves remotamente pilotadas (ARPs) na agricultura depende do processamento de imagem para extrair as informações adequadas para atingir os objetivos almejados (Hassanein, Lari e El-Sheimy, 2018). Para análise de alfaces, o processo de segmentação da vegetação ou remoção do fundo deve ser a etapa inicial para atingir o objetivo. Utilizando câmeras multiespectrais esse processo é facilmente realizado. Entretanto, o uso de câmeras multiespectrais para ARP tem a desvantagem do alto custo, enquanto os sensores RGB são baixo custo e favorecem a adoção da tecnologia. Assim, houve a necessidade de desenvolver um método para realizar o processo de segmentação de alface roxa e verde, de forma automatizada, utilizando imagens RGB.

Após o cálculo dos índices de vegetação descritos na Tabela 2 foi analisada a distribuição dos valores de cada índice nos pixels por meio de histogramas (Figura 14).

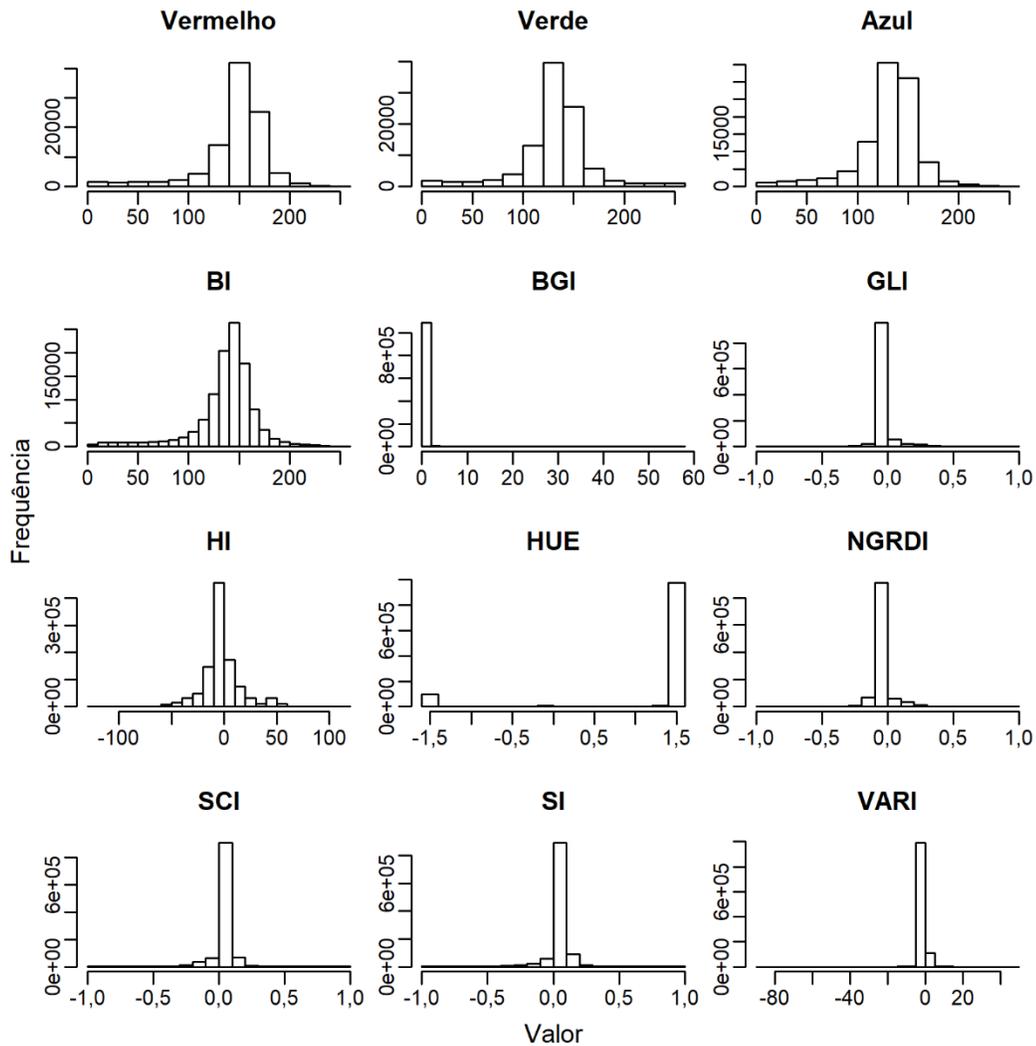


FIGURA 14. Histogramas de distribuição e frequência de pixels encontrados para os canais do visível e para índices de vegetação em quinze genótipos de alface roxa e verde.

O HUE foi o índice que melhor discriminou o solo das alfaces verdes e roxas (Figura 14). No histograma HUE pode ser observado dois extremos na distribuição dos valores de número digital dos pixels. O primeiro extremo é referente às plantas e o último, com maior número de pixels, referente ao solo, confirmando a necessidade da segmentação. Beniaich et al. (2019) em experimento com diferentes tipos de cobertura vegetal, também observaram que o HUE contrastou a vegetação dos elementos não vegetais na imagem.

Para criação da camada máscara foi determinado o valor de corte de 1,52 no índice HUE.

Pixels com índice HUE acima do valor de corte foram contabilizados para a camada máscara referente ao solo. Esse valor de corte no índice HUE propiciou excelente segmentação da vegetação.

O procedimento de remoção do fundo da imagem (solo) foi importante para reduzir ruídos na análise dos pigmentos foliares e melhorar a reprodutibilidade da análise por imagem.

2.3.3. *Validação da fenotipagem de alto desempenho para alface roxa e verde*

Dos índices de vegetação descritos na Tabela 2 e analisados para segmentação (Figura 14) foram selecionados os cinco com maior desvio padrão após a remoção dos pixels da imagem referentes ao solo. Os índices selecionados foram: Índice de Brilho (BI), Índice de Folha Verde (GLI), Índice de Diferença Normalizado Verde Vermelho (NGRDI), Índice de cor do solo (SCI) e Índice de saturação de inclinação espectral (SI).

Para quantificar antocianina, carotenoide, clorofila a, clorofila b, clorofila total nos quinze tratamentos de alface roxa e verde foram demandados dezoito horas de uma equipe com quatro pessoas (72 horas de trabalho). Foi necessário o consumo de 1,8 litros de reagentes de alto custo e periculosidade. Enquanto isso, a mensuração do Índice SPAD com o clorofilômetro SPAD-502 foi realizada em 2,5 horas por duas pessoas, reduzindo o tempo de avaliação em 93%. Já para fenotipagem de alto desempenho, uma única pessoa realizou todos os processos em apenas uma hora de trabalho, o que equivale a economia de tempo para avaliação dos pigmentos foliares em 98,6% e 77,8% em relação à quantificação pelo método padrão e por índice SPAD, respectivamente. Assim, o método de fenotipagem de alto desempenho reduziu drasticamente o tempo e o custo de análise de antocianina, carotenoide e clorofilas.

Características fortemente correlacionadas possibilitam seleção indireta utilizando aquela de mais simples mensuração (Reis et al., 2017; Nascimento-Júnior et al., 2018). Assim, para verificar a possibilidade de selecionar genótipos de alface roxa e verde ricos em pigmentos foliares a partir de índices de vegetação calculados em imagens de ARP, foi calculado a matriz de correlação entre os caracteres (Figura 15).

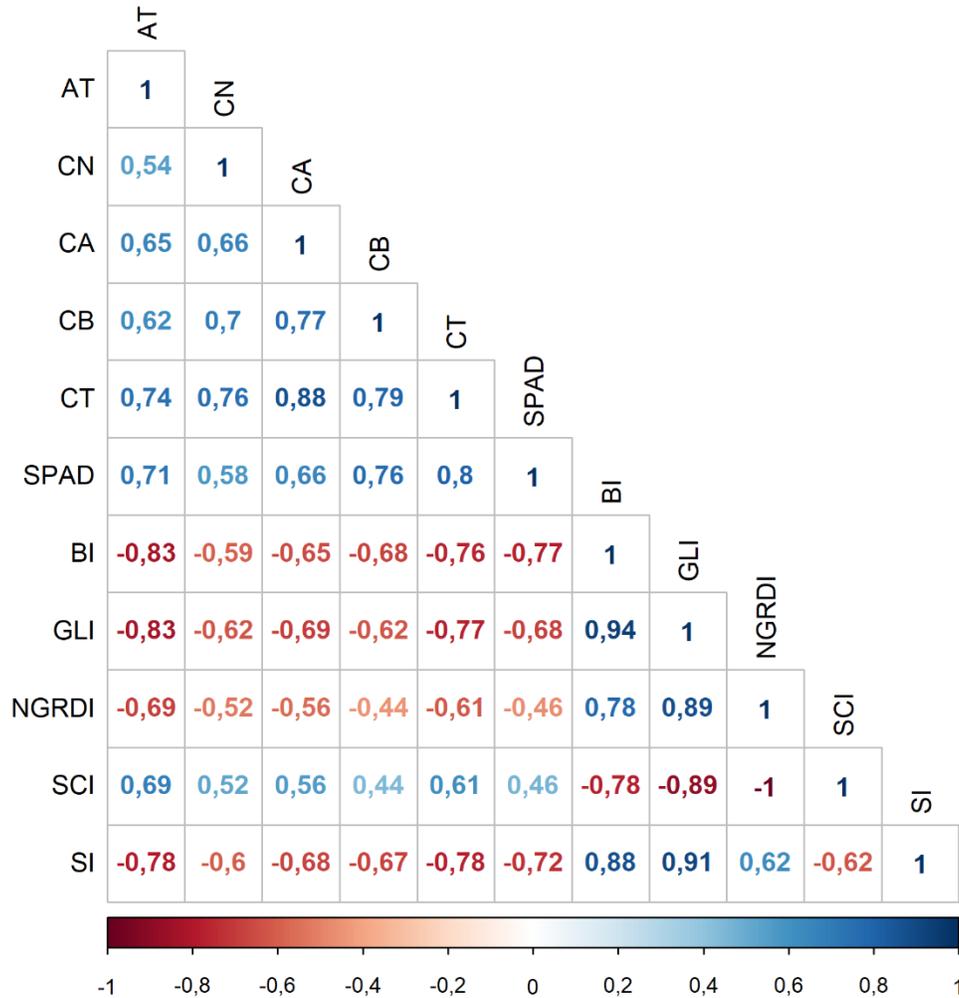


FIGURA 15. Matriz de correlação (r de Pearson) para pigmentos foliares, índice SPAD e índices de vegetação em alface roxa e verde. Correlações significativas pelo teste de Pearson a 5% são exibidas em tons de azul (positivas) e vermelho (negativas). AT = antocianina; CA = clorofila a; CB = clorofila b; CT = clorofila total; CN = carotenoides; SPAD = índice SPAD; BI = índice de brilho; GLI = índice de folha verde; NGRDI = índice de diferença normalizada verde vermelho; SCI = índice de cor do solo; SI = índice de saturação de inclinação espectral.

Os pigmentos foliares em alfaces roxas e verdes foram correlacionados com todos os índices avaliados ($p \leq 0,05$). Isso indica que antocianinas, carotenoides e clorofilas podem ser avaliados indiretamente por índices de vegetação obtidos via sensoriamento remoto.

As correlações mostram que, à medida que os índices BI, GLI, NGRDI e SI aumentam, o teor de pigmentos foliares diminui (Figura 15). Entretanto, era esperado aumento dos índices de vegetação com incrementos no conteúdo de clorofilas, os pigmentos responsáveis pela coloração

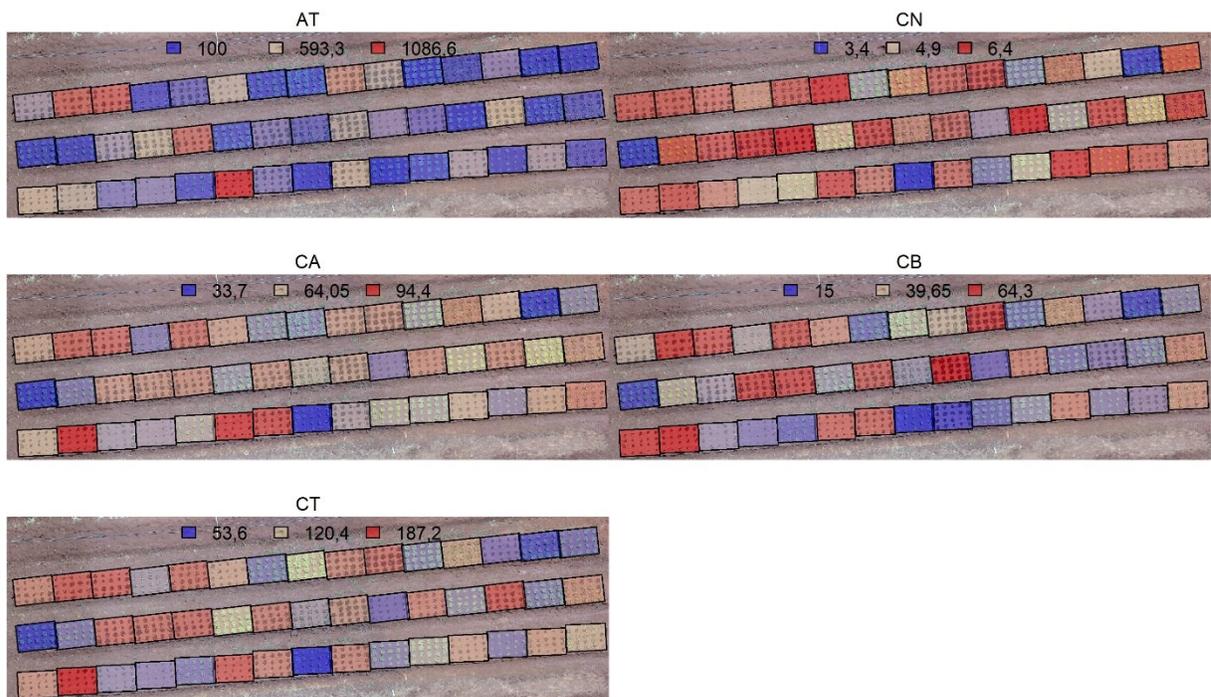
verde. Entretanto, Maciel et al. (2019a) também observaram redução da resposta espectral na banda verde com teores crescentes de carotenoides em germoplasma alface roxa. Falcione et al. (2020), em experimento com diversas espécies vegetais, concluíram que plantas que apresentam altas concentrações de antocianina a reflectância de verde é reduzida. Portanto, os genótipos de alface roxa podem ter influenciado os resultados. Mesmo assim, foram observadas altas correlações entre esses índices e os pigmentos em alfaces verdes e roxas, o que indica que os modelos gerados nesse trabalho poderão ser aplicados para diferentes tipos de alface.

Antocianina, pigmento que mais contribuiu para a diversidade genética, foi altamente correlacionada com os índices de vegetação avaliados, principalmente BI, GLI (ambos -83%). O índice GLI também se destacou com altas correlações com carotenoides (-62%), clorofila a (-69%), clorofila b (-62%) e clorofila total (-77%).

Também foram observadas altas correlações entre os pigmentos foliares e o índice SPAD. Vários trabalhos confirmam que SPAD expressa indiretamente o conteúdo de clorofila e carotenoide na folha (León et al., 2007; Hlavinka, Nauš e Špundová, 2013; Cassetari et al., 2015). Entretanto, mesmo as medidas com clorofilômetro sendo um avanço para avaliar pigmentos foliares, este método ainda é demorado e está sujeito a diversos problemas técnicos nas avaliações em campo.

Vale ressaltar que antocianinas, carotenoides e clorofilas apresentaram entre si correlações positivas significativas. Isso indica que em alface roxa e verde a análise desses pigmentos foliares podem ser conjunta.

Na Figura 16 é demonstrado o comportamento de cada pigmento foliar quantificado em laboratório e o teor de pigmentos foliares predito pelo uso direto do índice GLI.



Teor de pigmentos foliares

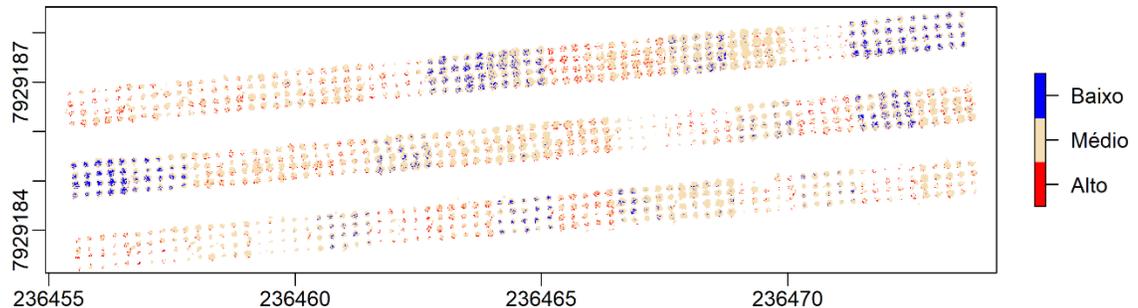


FIGURA 16. Mapas dos teores de antocianinas (AT), carotenoides (CN), clorofila a (CA), clorofila b (CB) e clorofila total (CT) quantificados em laboratório e teor de pigmentos foliares a partir do índice de vegetação GVI.

A Figura 16 evidencia a semelhança entre o comportamento dos pigmentos quantificados pelo método tradicional e o estimado pelo método de fenotipagem de alto desempenho.

A fenotipagem de alto desempenho possibilitou a avaliação de cada planta individualmente com redução de tempo e custo, enquanto no método tradicional foi obtido apenas o teor médio de cada pigmento para a parcela. Além disso, a técnica que utiliza imagens ARP

preserva as plantas avaliadas, o que é importante para avanço de geração em programas de melhoramento genético e para a comercialização em cultivos de alface.

Diversos estudos demonstram influências das condições ambientais, como temperatura, fertilidade, umidade do solo e principalmente pela luz, além dos fatores genéticos no acúmulo de fitopigmentos (Mol et al., 1996; Hichri et al., 2011; Dong et al., 2019; Islam et al., 2019; O’Cornell, 2021). Assim, uma cultivar de alface pode apresentar diferentes concentrações desses compostos dependendo do ambiente em que ela é cultivada. Visto isso e a eficiência da fenotipagem de alto desempenho em discriminar níveis de teores de pigmentos foliares, propõe-se o uso desta técnica também em cultivos em larga escala. Portanto, a ferramenta pode ser útil para as melhoristas em programas de melhoramento, visando a biofortificação, mas também para horticultores e setor público a fim de monitorar os níveis de antocianinas, carotenoides e clorofilas em cultivos usando ARPs.

Para possibilitar a quantificação de pigmentos foliares por imagem foram gerados modelos de predição (Tabela 3). As equações de regressão linear foram ajustadas à variável resposta média do índice de vegetação GLI.

TABELA 3. Modelos de regressão para estimativa de pigmentos foliares em alface roxa e verde a partir do índice de vegetação GLI.

Pigmento foliar (ug.g⁻¹)	Modelo	R²	p-value	RMSE
Antocianina	Y = -1205,23GLI + 360,68	0,75	***	134,4
Carotenoide	Y = -2,888GLI + 5,3251	0,43	***	0,6
Clorofila a	Y = -52,282GLI + 62,67	0,48	***	26,4
Clorofila b	Y = -50,072GLI + 37,959	0,39	***	10,6
Clorofila total	Y = -143,23GLI + 116,666	0,65	***	27,0

*** p ≤ 0,001. R² = Coeficiente de determinação; RMSE = Raiz do Erro Quadrático Médio.

O índice de vegetação GLI baseado em ARP foi um bom preditor para estimar o teor de pigmentos foliares em alface roxa e verde. A análise de regressão indicou que o teor carotenoides e de clorofila total pode ser previsto usando GLI baseado em ARP com apenas ±11% e 16% de diferença de acordo com a raiz do erro quadrático médio, respectivamente. Já para antocianina e clorofila b, essa diferença é de ±34% e 41%.

2.4. CONCLUSÕES

A fenotipagem de alto desempenho utilizando imagem RGB de aeronave remotamente pilotada pode ser utilizada para estimar o teor de antocianinas, carotenoides e clorofilas em alface roxa e verde dentro de um banco de germoplasma ou em larga escala em cultivos.

O índice de vegetação GLI é um bom preditor dos teores de pigmentos foliares em alface roxa e verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASALVAR, C.; GRIGOR, J. M.; ZHANG, D.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 49, n. 3, p. 1410-1416, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf000595h>.

BENDOKAS, V.; SKEMIENE, K.; TRUMBECKAITE, S.; STANYS, V.; PASSAMONTI, S.; BORUTAITE, V.; LIOBİKAS, J. Anthocyanins: From plant pigments to health benefits at mitochondrial level. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 60, p. 1–14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1687421>.

BRAGA, A. R. C.; MURADOR, D. C.; SOUZA, M. DE, L. M.; ROSSO, V. V. DE. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 68, p. 31-40, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.031>.

CAMEJO, D.; FRUTOS, A.; MESTRE, T. C.; DEL CARMEN PIÑERO, M.; RIVERO, R. M.; MARTÍNEZ, V. Artificial light impacts the physical and nutritional quality of lettuce plants. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 69-82, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00191-z>.

CASSETARI, L. S.; GOMES, M. S.; SANTOS, D. C.; SANTIAGO, W. D.; ANDRADE, J.; GUIMARÃES, A. C.; SOUZA, J. A.; CARDOSO, M. G.; MALUF, W. R.; GOMES, L. A. β -Carotene and chlorophyll levels in cultivars and breeding lines of lettuce. **Acta Horticulturae**, n. 1083, p. 469-473, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.60>.

CHARRAD, M.; GHAZZALI, N.; BOITEAU, V.; NIKNAFS, A.; CHARRAD, M. M. Package “NbClust”. *Journal of Statistical Software*, vol. 61, n. 6, p. 1-36, 2014. Disponível em: <http://cran.rediris.es/web/packages/NbClust/NbClust.pdf>.

CUENCA, M. H.; PROAÑO, G. V.; BLANKENSHIP, J.; CANO-GUTIERREZ, C.; CHEW, S. T.; FRACASSI, P.; ... ; STEIBER, A. Building Global Nutrition Policies in Health Care: Insights for Tackling Malnutrition from the Academy of Nutrition and Dietetics 2019 Global Nutrition Research and Policy Forum. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 120, n. 8, p. 1407-1416, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jand.2020.03.011>.

DA SILVA, A. R.; MALAFAIA, G.; MENEZES, I. P. P. *biotools*: an R function to predict spatial gene diversity via an individual-based approach. **Genet. Mol. Res**, v. 16, p. gmr16029655, 2017. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16029655>.

da SILVEIRA, A. J.; FINZI, R. R.; NETO, L. D. C.; MACIEL, G. M.; BELOTI, I. F.; JACINTO, A. C. P. Genetic dissimilarity between lettuce genotypes with different levels of carotenoids biofortification. **Nativa**, v.7, n.6, p. 656-660, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31413/nativa.v7i6.7331>.

DONG, T.; HAN, R., YU, J.; ZHU, M.; ZHANG, Y.; GONG, Y.; LI, Z. Anthocyanins accumulation and molecular analysis of correlated genes by metabolome and transcriptome in green and purple asparaguses (*Asparagus officinalis*, L.). **Food chemistry**, v. 271, p. 18-28, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103436> <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103436> 6/j.foodchem.2018.07.120.

ESCADAFAL, R.; BELGHITH, A.; BEM, M. H. Indices spectraux pour la télédétection de la dégradation des milieux naturels en Tunisie aride. In *Actes du Sixième Symposium International. Mesures physiques et Signatures spectrales en Télédétection*, p.17-21, 1994.

Falcioni, R., Moriwaki, T., Pattaro, M., Furlanetto, R. H., Nanni, M. R., & Antunes, W. C. High resolution leaf spectral signature as a tool for foliar pigment estimation displaying potential for species differentiation. **Journal of plant physiology**, v. 249, p. 153161, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153161>.

FAO; IFAD; UNICEF; WFP e WHO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns. Rome, FAO, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca5162en/ca5162en.pdf>. Acesso em: 20 set. 2020.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental Designs Package. R Package Version 1.1.2., 2013. Disponível em. < <http://CRAN.R-project.org/package=ExpDes>>.

FINKELSTEIN, J. L.; FOTHERGILL, A.; HACKL, L. S.; HAAS, J. D; MEHTA, S. Iron biofortification interventions to improve iron status and functional outcomes. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 78, n. 2, p. 197-207, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0029665118002847>.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. **Anthocyanins as food colors**, vol. 1, p. 280, 1982.

GIORDANO, M.; EL-NAKHEL, C.; PANNICO, A.; KYRIACOU, M. C.; STAZI, S. R.; De PASCALE, S.; ROUPHAEL, Y. Iron biofortification of red and green pigmented lettuce in closed soilless cultivation impacts crop performance and modulates mineral and bioactive composition. **Agronomy**, v. 9, n. 6, p. 290, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9060290>.

GIORDANO, M.; EL-NAKHEL, C.; PANNICO, A.; KYRIACOU, M. C.; STAZI, S. R.; DE PASCALE, S.; ROUPHAEL, Y. Iron biofortification of red and green pigmented lettuce in closed soilless cultivation impacts crop performance and modulates mineral and bioactive composition. **Agronomy**, v. 9, n. 6, p. 290, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9060290>

GITELSON, A. A.; KAUFMAN, Y. J.; STARK, R.; RUNDQUIST, D. Novel algorithms for remote estimation of vegetation fraction. **Remote sensing of Environment**, v. 80, n. 1, p. 76-87, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(01\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(01)00289-9).

Guo, Y.; Yin, G.; Sun, H.; Wang, H.; Chen, S.; Senthilnath, J.; ...; Fu, Y. Scaling Effects on Chlorophyll Content Estimations with RGB Camera Mounted on a UAV Platform Using Machine-Learning Methods. **Sensors**, v. 20, n. 18, p. 5130, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/s20185130>.

HARRELL JR, F. E. e DUPONT, M. C. Package 'hmisc'. **R package version 4.3-0**, 2019. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>. Acesso em 20 jan. 2020.

HARRELL JR, F. E. e DUPONT, M. C. Package 'hmisc'. **R package version 4.3-0**, 2019. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>. Acesso em 20 jan. 2020.

HASSANEIN, M.; LARI, Z.; EL-SHEIMY, N. A new vegetation segmentation approach for cropped fields based on threshold detection from hue histograms. **Sensors**, v. 18, n. 4, p. 1253, 2018. <https://doi.org/10.3390/s18041253>.

HICHRI, I.; BARRIEU, F.; BOGS, J.; KAPPEL, C.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 8, p. 2465-2483, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erq442>.

HLAVINKA, J.; NAUS, J.; SPUNDOVÁ, M. Anthocyanin contribution to chlorophyll meter readings and its correction. **Photosynthesis research**, vol. 118, n. 3, p. 277-295, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9934-y>.

ISLAM, M. Z.; LEE, Y. T.; MELE, M. A.; CHOI, I. L.; KANG, H. M. The effect of phosphorus and root zone temperature on anthocyanin of red romaine lettuce. **Agronomy**, vol. 9, n. 2, p. 47, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9020047>.

LEÓN, A. P.; VINA, S. Z.; FREZZA, D.; CHAVES, A.; CHIESA, A. Estimation of Chlorophyll Contents by Correlations between SPAD-502 Meter and Chroma Meter in Butterhead Lettuce. **Communications in soil science and plant analysis**, vol. 38, n. 19-20, p. 2877-2885, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103620701663115>.

Li, Y.; Cui, Y.; Lu, F.; Wang, X.; Liao, X.; Hu, X.; Zhang, Y. Beneficial effects of a chlorophyll-rich spinach extract supplementation on prevention of obesity and modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed mice. **Journal of Functional Foods**, v. 60, p. 103436, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103436>.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food chemistry**, vol. 108, n. 3, p. 1028-1038, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>.

LOPES, D. DE C.; MOURA, L. DE O.; STEIDLE NETO, A. J.; FERRAZ, L. DE C. L.; CARLOS, L. DE A.; MARTINS, L. M. Spectral indices for non-destructive determination of lettuce pigments. **Food Analytical Methods**, vol. 10, n. 8, p. 2807-2814, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0853-y>.

LOUHAICHI, M.; BORMAN, M. M.; JOHNSON, D. E. (2001). Spatially located platform and aerial photography for documentation of grazing impacts on wheat. **Geocarto International**, vol.16, n.1, p. 65-70, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/10106040108542184>.

MACIEL, G. M.; GALLIS, R. B. DE A.; BARBOSA, R. L.; PEREIRA, L. M.; SIQUIEROLI, A. C. S.; PEIXOTO, J. V. M. Image phenotyping of inbred red lettuce lines with

genetic diversity regarding carotenoid levels. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, vol. 81, p. 154-160, (2019a). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jag.2019.05.016>.

MACIEL, G. M.; SIQUIEROLI, A. C. S.; GALLIS, R. B. A.; PEREIRA, L. M.; SALES, V. F. Programa de computador BG a Biofort. Depositante: Universidade Federal de Uberlândia. BR512019002403-6. Depósito: 01 fev. 2019. Concessão: 23 out. 2019b.

MATIAS, F.I., CARAZA-HARTER, M.V., ENDELMAN, J.B. FIELDimageR: An R package to analyze orthomosaic images from agricultural field trials. **The Plant Phenome J.**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppj2.20005>.

MATHIEU, R.; POUGET, M.; CERVELLE, B.; ESCADAFAL, R. Relationships between satellite-based radiometric indices simulated using laboratory reflectance data and typical soil color of an arid environment. **Remote sensing of environment**, v. 66, n. 1, p. 17-28, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(98\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(98)00030-3).

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, vol. 50, n. 2, p. 159-179, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02294245>.

MINOLTA. **Chlorophyll meter SPAD-502**. Instruction manual. Minolta Co., Osaka, Japan. 22 p, 1989.

MOL, J.; JENKINS, G.; SCHÄFER, E.; WEISS, D.; WALBOT, V. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15, n. 5-6, p. 525-557, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689609382369>.

MURRAY, R. D.; KERR, K. W.; BRUNTON, C.; WILLIAMS, J. A.; DEWITT, T.; WULF, K. L. A First Step Towards Eliminating Malnutrition: A Proposal for Universal Nutrition Screening in Pediatric Practice. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 13, p. 17-24, 2021. DOI: <https://doi.org/10.2147/NDS.S287981>.

NASCIMENTO-JÚNIOR, I.; MORO, G. V.; MORO, F. V. Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. **Chilean journal of agricultural research**, vol. 78, n. 1, p. 39-47, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-58392018000100039>.

O'CONNELL, S. Miniature Head Lettuce Yield and Anthocyanin Concentration under High Tunnels and the Field in Georgia. **HortTechnology**, v. 1, n. aop, p. 1-11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04744-20>.

OCEAN, N.; HOWLEY, P.; ENSOR, J. Lettuce be happy: A longitudinal UK study on the relationship between fruit and vegetable consumption and well-being. **Social Science & Medicine**, vol. 222, p. 335-345, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2018.12.017>.

OKSANEN, J., BLANCHET, F. G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P. R., O'HARA, R. B., ... WAGNER, H. Vegan: community ecology package. **R package version 2.5-6**, 2019. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em 20 jan. 2020.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol. 46, n. 7, p. 2686-2693, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf980145d>.

QUEIROZ, M. I.; FERNANDES, A. S.; DEPRÁ, M. C.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Introductory Chapter: Chlorophyll Molecules and Their Technological Relevance Chlorophyll. **IntechOpen**, 2017. <https://doi.org/10.5772/67953>.

REIS, M. C.; CARDOSO, D. B. O.; JÚNIOR, E. S.; GOMES, B. C.; PEREIRA, L. T. G.; GOMES, D. A.; SOUSA, L. B. Correlation among traits as criterion of cotton genotypes indirect selection. **Genet. Mol. Res**, vol. 16, p. 3-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16039805>.

RICCARDI, M.; MELE, G.; PULVENTO, C.; LAVINI, A.; D'ANDRIA, R.; JACOBSEN, S. E. 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9970-2>.

RICHARDSON, A. J.; WIEGAND, C. L. Distinguishing vegetation from soil background information. **Photogrammetric engineering and remote sensing**, v. 43, n. 12, p. 1541-1552, 1977.

SHERWIN, J. C.; REACHER, M. H.; DEAN, W. H.; NGONDI, J. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations. **Transactions of the Royal Society**

of **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 4, p. 205-214, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.01.004>.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, vol. 41, n. 1, p. 237-245, 1981.

SOUSA, C. S. D.; BONETTI, A. M.; GOULART FILHO, L. R. MACHADO, J. R. D. A.; LONDE, L. N.; BAFFI, M. A.; ... & KERR, W. E. Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP. **Bragantia [online]**, v. 66, n. 1, p. 11-16, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052007000100002>. TUCKER, C. Red and Photographic Infrared Linear Combinations for Monitoring Vegetation. **Remote Sensing of Environment**, v. 8, n. 2, p.127–150, 1979. DOI: [doi:10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0).

VIJAYAGEETHA, M; JASMINE.J.; FELICIA C. A.; MANJUBALA, D. Dark Adaptation – An Emerging Nutritional Problem. **Journal of Nursing Science Practice Research and Advancements**, vol. 1, n.3, 2019. DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3240090>.

YADAV, S. P. IBARAKI, Y.i; GUPTA, S. D. Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 100, n. 2, p. 183-188, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9635-6>.

YANG, X.; WEI, S.; LIU, B.; GUO, D., ZHENG, B.; FENG, L.; ... & HUANG, D. A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa*. L) varieties. **Horticulture research**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0050-1>.

YOO, K. S.; BANG, H.; PIKE, L.; PATIL, B. S.; LEE, E. J. Comparing carotene, anthocyanins, and terpenoid concentrations in selected carrot lines of different colors. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00225-6>.

ZARCO-TEJADA, P.J.; RUEDA, C.A.; USTIN, S.L. Water content estimation in vegetation with MODIS reflectance data and model inversion methods. **Remote Sensing of Environment**, v.85, n.1, p.109-124, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00197-9)

ZHANG, Y. Z.; XU, S. Z.; CHENG, Y. W.; YA, H. Y.; HAN, J. M. Transcriptome analysis and anthocyanin-related genes in red leaf lettuce. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 1, p. 10.4238, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017023>.

ANEXOS

Lista de tabelas

Tabela 1. Índices de vegetação testados para fenotipagem em alface roxa.....	9
Tabela 2. Índices de vegetação testados para fenotipagem em alfaces roxas e verdes.....	38
Tabela 3. Modelos de regressão para estimativa de pigmentos foliares em alface roxa e verde a partir do índice de vegetação GLI.	49

Lista de figuras

Figura 1. Localização do experimento e distribuição dos genótipos de alface roxa em campo.	7
Figura 2. Fluxograma das etapas de aquisição e processamento das imagens, quantificação dos pigmentos foliares e análise dos dados em germoplasma de alface roxa.	8
Figura 3. Umidade relativa do ar (UR) máxima e mínima, temperatura do ar (T) máxima e mínima e precipitação (P) diárias durante a condução do experimento.	11
Figura 4. Médias referentes à concentração de antocianina, clorofila a, clorofila b e clorofila em trinta genótipos de alface roxa.	12
Figura 5. Dendrograma da diversidade genética entre trinta genótipos de alface roxa, obtido pelo método de agrupamento ligação média entre grupo - UPGMA.	15
Figura 6. Matriz de correlação (r de pearson) para teor de antocianina (AT), carotenoide (CN), clorofila a (CA), clorofila b (CB), clorofila total (CT), índice SPAD e índices de vegetação (CIG; CVI; GNDVI; NDVI).	17
Figura 7. Imagem RGB, RGN e dos índices de vegetação CIG, CVI, GNDVI e NDVI das parcelas com teores menores (UFU-117#1#3#1), intermediários (UFU-189#2#3#1) e maiores (UFU#206#1#3#1) de pigmentos foliares ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de tecido fresco).	20
Figura 8. Mapa de calor para teor de antocianina (AT), carotenoide (CN), clorofila a (CA), clorofila B (CB), clorofila total (CT), índice SPAD e índices de vegetação (CIG; CVI; GNDVI; NDVI) de 30 genótipos de alface roxa.	21
Figura 9. Localização do experimento e distribuição dos genótipos de alface roxa e verde em campo.	35
Figura 10. Fluxograma das etapas de aquisição e processamento das imagens, quantificação dos pigmentos foliares e análise dos dados em germoplasma de alface roxa e verde.	36

Figura 11. Processo de segmentação da vegetação.	38
Figura 12. Teores de antocianina, carotenoide, clorofila a, clorofila b e clorofila total de quinze genótipos de alface roxa e verde.....	40
Figura 13. Dendrograma da diversidade genética entre 15 genótipos de alface dos tipos roxa e verde, obtido pelo método de agrupamento ligação média entre grupo - UPGMA.	42
Figura 14. Histogramas de distribuição e frequência de pixels encontrados para os canais do visível e para índices de vegetação em quinze genótipos de alface roxa e verde.	44
Figura 15. Matriz de correlação (r de pearson) para pigmentos foliares, índice spad e índices de vegetação em alface roxa e verde.	46
Figura 16. Mapas dos teores de antocianinas (AT), carotenoides (CN), clorofila a (CA), clorofila b (CB) e clorofila total (CT) quantificados em laboratório e teor de pigmentos foliares a partir do índice de vegetação GLI.	48