



**LUCIANA DE SOUSA CASSETARI**

**CONTROLE GENÉTICO DOS TEORES DE  
CLOROFILA E CAROTENOIDES EM FOLHAS  
DE ALFACE**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**LUCIANA DE SOUSA CASSETARI**

**CONTROLE GENÉTICO DOS TEORES DE CLOROFILA E  
CAROTENOIDES EM FOLHAS DE ALFACE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Cassetari, Luciana de Sousa.

Controle genético dos teores de clorofila e carotenoides em folhas de  
alface / Luciana de Sousa Cassetari. – Lavras: UFLA, 2015.

78 p.: il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Luiz Antonio Augusto Gomes.

Bibliografia.

1. Hortaliças. 2. Agentes antioxidantes. 3. Parâmetros genéticos. 4.  
Herança monogênica. 5. Compostos bioativos. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

**LUCIANA DE SOUSA CASSETARI**

**CONTROLE GENÉTICO DOS TEORES DE CLOROFILA E  
CAROTENOIDES EM FOLHAS DE ALFACE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de agosto de 2015.

Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA
Dr. Luciano Donizete Gonçalves	IFMG
Dr. Marcos de Souza Gomes	UFVJM
Dra. Sindynara Ferreira	IFSULDEMINAS

Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

Aos meus pais, Daniel e Marlene.

Às minhas irmãs, Alice e Sofia.

Ao meu noivo, Patrese.

OFEREÇO

Ao meu querido irmão, Alexandre (*in memoriam*)

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que este sonho se realizasse.

Aos meus pais, Daniel e Marlene, que jamais deixaram de sonhar comigo, me apoiando em todos os momentos.

As minhas irmãs Alice e Sofia, que sempre estiveram ao meu lado me ensinando a nunca desistir.

Ao meu noivo, Patrese, pela paciência, carinho, incentivo e amor. Aos meus sogros, Joaquim e Talece, pelo carinho e acolhimento.

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos Departamentos de Agricultura e de Engenharia de Alimentos.

Ao professor Luiz Antonio Augusto Gomes, pelo exemplo, amizade, ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

À HortiAgro Sementes Ltda. e a todos os funcionários por toda ajuda nos trabalhos desenvolvidos.

Às amigas Marislaine e Madeleine, pela amizade, ajuda, pela convivência e carinho de sempre.

À professora Karina, pelo exemplo de pessoa, carinho e conselhos.

Aos amigos Giuliana, Roberta, Natalia, Pedro, Cleiton, Dani (loira e morena), Gabriel, Hugo, Márcia, Raisla e Ana Clara, que nunca pouparam esforços na realização dos trabalhos e sempre me apoiaram.

A família Jovens Sarados missão Lavras, por tudo que vivemos e partilhamos. Deus coloca as pessoas certas nos momentos certos em nossas vidas.

À agência de fomento CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

À FAEPE e à FUNDEC.

Aos muitos amigos que não foram citados aqui, mas que fazem parte da minha história. Que Deus abençoe todos vocês!

## RESUMO

A alface é a espécie folhosa mais consumida mundialmente e de grande importância funcional. As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas. Os carotenoides, juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes antioxidantes. Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o controle genético do teor de clorofila e de carotenoides em folhas de alface. Foram avaliados dois genitores além das gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e famílias  $F_{2:3}$ . Estimaram-se parâmetros genéticos, componentes de média e de variância para a determinação do tipo de herança envolvida na expressão da característica teor de clorofila e de carotenoides. Testou-se a hipótese de herança monogênica pelo método de máxima verossimilhança. As diferenças entre os valores médios para teor de clorofila total variam de  $1,12 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_1$ ) a  $3,33 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_2$ ). Para carotenoides, os valores variam de  $0,35 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_1$ ) a  $1,34 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_2$ ). Existe correlação alta entre os teores de clorofila total e carotenoides e, assim, os teores de clorofila podem ser utilizados como indicadores indiretos do teor de carotenoides. Altos valores de herdabilidade foram encontrados para clorofila total (80%) e carotenoides (84%). Além disso, a estimativa do GMD aponta para uma dominância incompleta. Das 27 famílias avaliadas, 6 foram caracterizadas como homozigotas para baixo teor de clorofila, 8 foram caracterizadas como homozigotas para alto teor e 13 foram segregantes. Para carotenoides, 10 foram caracterizadas como homozigotas para baixo teor e 8 como homozigotas para alto teor e 9 segregantes. De acordo com o estudo de herança, o teste revelou que o teor de clorofila e de carotenoides é controlado por um gene com efeito aditivo e de dominância e por poligenes com efeito menor.

Palavras-chave: Hortaliças. Agentes antioxidantes. Parâmetros genéticos. Herança monogênica. Compostos bioativos.

## ABSTRACT

Lettuce is the most consumed hardwood species worldwide and with a great importance functional. The chlorophylls are the most abundant natural pigments present in the plants. The Carotenoids, together with vitamins, are the most investigated substances such as antioxidants. The objective of this study was to determine the genetic control of chlorophyll and carotene content in lettuce leaves (*Lactuca sativa L.*). It was evaluated both parents besides the  $F_1$ ,  $F_2$  and  $F_{2.3}$  generations. Genetic parameters, media components and variance were estimated to determine the type of inheritance involved in the expression of the characteristic chlorophyll and carotenoid content. Hypothesis of monogenic inheritance were tested associated or not with minor polygenic effects by maximum likelihood procedure. The differences between the mean values for total chlorophyll content ranging from  $1.1224 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_1$ ) to  $3.3302 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_2$ ). For carotenoids, the values range from  $0.35 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_1$ ) to  $1.34 \text{ mg.g}^{-1}$  ( $P_2$ ). There is a high correlation between the chlorophyll and carotenoid contents, and so the chlorophyll content can be used as surrogate indicators of the carotenoid content. High heritability values were found for total chlorophyll (80%) and carotene (84%). Moreover, the estimate of GMD indicates an incomplete dominance. Of the 27 families evaluated, 6 were characterized as homozygous for low-chlorophyll, 8 were homozygous for high-grade and 13 were segregating. For carotene, 10 were characterized as homozygous down content, 8 as homozygous for high content and 9 segregating. According to the inheritance study, the test revealed that the chlorophyll and carotenoid content is controlled by a gene with additive and dominance effect and by polygenes with less effect.

Keywords: Vegetables. Antioxidizing Agents. Genetic Parameters. Monogenic Inheritance. Bioactive compounds.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição de frequência de notas de clorofila em plantas de alface da cultivar Verônica .....	48
Figura 2	Distribuição de frequência de notas de clorofila em plantas de alface da cultivar Salinas 88 .....	49
Figura 3	Distribuição de frequência de notas de carotenoides totais em plantas de alface da cultivar Verônica .....	49
Figura 4	Distribuição de frequência de notas de carotenoides totais em plantas de alface da cultivar Salinas 88 .....	50
Figura 5	Distribuição de notas de clorofila em plantas de alface de geração $F_1$ .....	51
Figura 6	Distribuição de notas de carotenoides em plantas de alface da população $F_1$ (Verônica x Salinas 88) .....	52
Figura 7	Distribuição de frequência de notas de clorofila total em plantas de alface da população $F_2$ (Verônica x Salinas 88) .....	52
Figura 8	Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de clorofila do genitor Verônica e de cada família $F_{2,3}$ (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%) .....	59
Figura 9	Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de clorofila do genitor Salinas 88 e de cada família $F_{2,3}$ (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%) .....	60
Figura 10	Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de carotenoides do genitor Verônica e de cada família $F_{2,3}$ (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%) .....	63
Figura 11	Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de carotenoides do genitor Salinas 88 e de cada família $F_{2,3}$ (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%) .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escala de notas utilizadas para avaliação do teor de clorofila total (mg.g <sup>-1</sup> ) em folhas de alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	37
Tabela 2	Escala de notas utilizadas para avaliação do teor de carotenoides totais (mg.g <sup>-1</sup> ) em folhas de alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	37
Tabela 3	Modelos de herança utilizados pelo programa Monogen. UFLA, Lavras, 2015.....	39
Tabela 4	Testes entre modelos e seus efeitos. UFLA, Lavras, 2015 .....	40
Tabela 5	Valores médios para as populações P <sub>1</sub> (Verônica), P <sub>2</sub> (Salinas 88), F <sub>1</sub> (Verônica x Salinas 88) e F <sub>2</sub> (Verônica x Salinas 88) de teores de clorofila <i>a</i> (mg.g <sup>-1</sup> ), clorofila <i>b</i> (mg.g <sup>-1</sup> ), clorofila total (mg.g <sup>-1</sup> ), carotenoides totais (mg.g <sup>-1</sup> ) e clorofila (unidades SPAD). Lavras, UFLA, 2015.....	44
Tabela 6	Correlação entre teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total, clorofila pelo medidor SPAD e carotenoides totais em folhas de alface. Lavras, UFLA, 2015.....	45
Tabela 7	Estimativas de parâmetros genéticos para as características avaliadas em folhas de alface das cultivares Verônica, Salinas 88 e na população F <sub>2</sub> (Verônica x Salinas 88). Lavras, UFLA, 2015.....	47
Tabela 8	Hipóteses de herança para clorofila <i>a</i> , clorofila total e carotenoides totais em folhas de alface. UFLA, Lavras, 2015.....	54
Tabela 9	Famílias F <sub>2:3</sub> (Verônica x Salinas 88) avaliadas quanto ao grau de homozigose para teor de clorofila, pelo teste Dunnett (5%). Lavras, UFLA, 2015 .....	57
Tabela 10	Famílias F <sub>2:3</sub> (Verônica x Salinas 88) avaliadas quanto ao grau de homozigose para teor de carotenoides, pelo teste Dunnett (5%). Lavras, UFLA, 2015 .....	61
Tabela 11	Frequências observadas e esperadas das progênies F <sub>2:3</sub> quanto ao grau de homozigose. Lavras, UFLA, 2015.....	64

## SUMARIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1	Aspectos gerais da cultura da alface .....	14
2.2	Melhoramento genético de alface .....	16
2.3	Estudo de herança .....	22
2.4	Cor das folhas e clorofila.....	23
2.5	Carotenoides e vitamina A.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1	Experimento 1.....	33
3.2	Experimento 2.....	34
3.3	Avaliações de campo.....	34
3.4	Avaliação em laboratório.....	35
3.5	Análises estatísticas.....	36
3.5.1	Estimativas de parâmetros genéticos.....	37
3.5.2	Modelo de herança pelo método de verossimilhança .....	38
3.5.3	Avaliação de progênies $F_{2,3}$ e teste da hipótese de herança monogênica (dados experimento 2).....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
4.1	Estimativa dos teores de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total, clorofila medida pelo método SPAD e carotenoides totais em folhas de alface e correlação entre essas características.....	42
4.2	Estimativas de variância fenotípica ( $\sigma^2_P$ ), genética ( $\sigma^2_G$ ) e ambiental ( $\sigma^2_E$ ), da herdabilidade no sentido amplo ( $H^2$ ) e do grau médio de dominância (GMD) para teor de clorofila e carotenoides.....	46
4.3	Testes de hipótese de herança monogênica para teores de clorofila total e carotenoides totais em folhas de alface considerando as populações $F_1$ e $F_2$ .....	48
4.4	Estimativas do número de genes e efeito gênico no controle dos teores de clorofila e carotenoides em folhas de alface pela função de máxima verossimilhança .....	53
4.5	Testes de hipótese de herança monogênica para teores de clorofila total e carotenoides totais em folhas de alface nas populações $F_{2,3}$ .....	54
5	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a espécie folhosa mais consumida mundialmente, tendo grande importância econômica e, mais recentemente, sendo reconhecida como de importância funcional no organismo. Sabe-se que vegetais folhosos são importantes fontes de vitaminas e minerais, tais como vitamina A e C e potássio, que podem estar envolvidos em atividades pró-vitamínicas e antioxidantes, além de serem fontes de fibras (OLIVEIRA et al., 2005).

Originária da Europa e de regiões próximas ao Mediterrâneo, a alface pertence à família *Asteraceae*, como a alcachofra, o almeirão e a chicória ou escarola. É conhecida desde 500 anos antes de Cristo (SONNENBERG, 1985).

As frutas e as hortaliças contêm muitos compostos bioativos, referidos como fitoquímicos, além de vitaminas e minerais. Dentre os fitoquímicos, os carotenoides tem sido os mais estudados, devido à sua destacada atividade antioxidante (RODRIGUEZ et al., 2006). Os carotenoides de maior prevalência na dieta incluem  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina. Ressalta-se que dietas contendo expressiva quantidade de frutas, verduras e legumes e, conseqüentemente, de carotenoides estão associadas a um menor risco de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS, 2003).

A análise da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil, entre os anos de 1974 a 2003, revelou baixa diversificação alimentar da população. Nota-se que houve uma redução na disponibilidade de gêneros alimentícios tradicionais, como arroz (-23%), feijão e outras leguminosas (-30%), raízes e tubérculos (-30%), acompanhada de um aumento no consumo *per capita* de produtos como carnes em geral (aumento de quase 50%), embutidos (+300%), refrigerantes (+400%), biscoitos (+400%) e refeições prontas (+80%). A

participação das frutas e hortaliças na dieta permaneceu relativamente constante (entre 3% a 4%) durante todo o período e, portanto, bastante aquém da recomendação estimada pela FAO, de 6% a 7% da energia total para a ingestão deste grupo de alimentos (LEVY-COSTA et al., 2005).

Na busca por obter uma vida saudável, as pessoas têm procurado mudar seus hábitos alimentares, acrescentando, ao seu dia a dia, o consumo de vegetais de diferentes espécies com propriedades nutricionais complementares. Com isso, os consumidores são atraídos por produtos de cores atraentes, o que, muitas vezes, induz à ideia de que o alimento é saudável e saboroso, podendo isso, de fato, estar associado, o que torna importante a manutenção da cor em hortaliças, principalmente em alface, por pertencer ao grupo das hortaliças folhosas mais populares e de grande importância econômica.

A vitamina A é um nutriente encontrado apenas em alimentos de origem animal, em diversas formas: retinol, retinil, retinal e ácido retinoico. No entanto, os vegetais fornecem provitaminas A, como  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, que podem ser biologicamente transformadas em vitamina A, em organismos animais (RODRIGUEZ-AMAYA; VALENTE SOARES, 1989). O mais ativo dos carotenoides pró-vitâmicos A é o  $\beta$ -caroteno (COMBS JUNIOR, 2002), sendo também o mais distribuído em alimentos, como o menor ou como o maior constituinte carotenogênico (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993). Populações em risco de deficiência de vitamina A, em geral, dependem de carotenoides pró-vitâmicos A para atingirem suas recomendações diárias (ROCK et al., 1998). Segundo a World Health Organization - WHO (1995), nas Américas, cerca de 64% da vitamina A ingerida são provenientes de carotenoides pró-vitâmicos A.

O número limitado de estudos que possibilitem conhecer a disponibilidade de nutrientes em alimentos para as famílias em âmbito nacional, bem como as diferenças existentes entre as grandes regiões do país e entre as

áreas urbanas e rurais, e a escassez de pesquisas envolvendo o conhecimento do controle genético para a produção desses nutrientes reforça as justificativas para o desenvolvimento da presente pesquisa.

A existência de materiais contrastantes permitirá que se façam estudos do controle genético, mediante o cruzamento entre estes. A eventual existência de alta correlação entre diferentes características, associada ao conhecimento de seu controle genético, será de grande utilidade em futuros trabalhos de melhoramento, pois permitirá a escolha de características com maior herdabilidade e maior facilidade de avaliação nos processos de seleção.

Em decorrência do exposto e devido à escassez de informações disponíveis sobre os mecanismos que regulam a herança da produção de clorofila e carotenoides, objetivou-se, no presente trabalho, estudar o controle genético envolvido nos teores de clorofila e carotenoides em folhas de alface.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é originária de regiões amenas do Mediterrâneo. Pertence à família *Asteraceae* e é uma planta bianual que floresce sob dias longos e temperaturas altas. Condições ambientais de temperaturas amenas e dias curtos favorecem a etapa vegetativa do ciclo (FILGUEIRA, 2003). A temperatura ideal para o desenvolvimento está na faixa de 15,5 °C e 18,3 °C, apesar de tolerar faixas entre 26,6 °C a 29,4 °C, por alguns dias, desde que as temperaturas noturnas sejam baixas (SANDERS, 2013).

Sendo a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, a alface é produzida em cinturões verdes próximos aos grandes centros consumidores, por causa de sua rápida perecibilidade no período pós-colheita, devido ao seu alto teor de água e grande área foliar (SANTOS et al., 2001). A alface é uma razoável fonte de vitaminas e sais minerais, cujo aproveitamento pelo organismo é favorecido por ser consumida crua, destacando-se o seu elevado teor em pró-vitamina A, que alcança 4.000 Unidades Internacionais (UI) em 100 g de folhas verdes (cerca de quatro vezes o teor do tomate), sendo, porém, bem mais baixo o teor dessa vitamina nas folhas internas brancas das alfaces repolhudas (CAETANO et al., 2001).

A planta é herbácea, com caule diminuto ao qual se prendem as folhas, as quais são amplas e crescem em roseta, em volta do caule, podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma "cabeça", com coloração em vários tons de verde, ou de roxo, conforme a cultivar. O sistema radicular é muito ramificado e superficial, explorando apenas os primeiros 25 cm de solo, quando a cultura é transplantada. Em semeadura direta, a raiz pivotante pode atingir até 60 cm de profundidade (FILGUEIRA, 2003).

A inflorescência é uma panícula constituída por diversos botões florais denominados capítulos, sendo cada capítulo composto por 10 a 25 floretes. O florete apresenta uma única pétala amarela envolvida por brácteas imbricadas que formam um involúcro. O estilete é bifurcado no ápice e o ovário contém um único óvulo que, posteriormente, dá origem a uma única semente. A antese ocorre pela manhã e cada flor se abre apenas uma vez, garantindo a autofecundação e conferindo à planta a autogamia por cleistogamia (RYDER, 1999).

Os frutos de alface são do tipo aquênios e a sua maturação fisiológica ocorre, em média, 12 dias após a antese do florete. Uma planta de alface pode produzir até 20 g de aquênios, dependendo do período do florescimento e do tipo varietal (COSTA; SALA, 2005).

Esta espécie vegetal já era utilizada como planta medicinal há 4500 a.C. Como hortaliça é registrada a sua utilização desde 2500 a.C. (GOTO; TIVELLI, 1998; WITAKER; RYDER, 1974). A alface é mundialmente conhecida, sendo consumida, principalmente, *in natura* em saladas, com inúmeros tipos de folhas, cores, formas, tamanhos e texturas, e tem grande importância na alimentação e na saúde humana. Uma planta com 350 g apresenta, aproximadamente: 56 kcal, 95,80% de água, 2,3% de hidratos de carbono, 1,20% de proteínas, 0,20% de gorduras, 0,50% de sais minerais (13,3 mg de potássio, 147,0 mg de fósforo, 133,0 mg de cálcio e 3,85 mg de sódio, magnésio e ferro). Contém, ainda, vitamina A (245 UI), vitaminas do complexo B (B1 – 0,31 mg e B2 – 0,66 mg) e C (35,0 mg). As folhas de coloração verde-escura, principalmente as externas, contêm 30 vezes mais vitamina A que as internas (FRANCO, 1987).

O solo ideal para o cultivo dessa hortaliça é o de textura média, rico em matéria orgânica e com boa disponibilidade de nutrientes. Para obter maior produtividade é necessário o uso de insumos que melhorem as condições físicas, químicas e biológicas do solo. As maiores produções podem ser obtidas a partir



da melhoria das características químicas e físico-químicas do solo, que podem ser obtidas com o acréscimo de doses crescentes de compostos orgânicos (SOUZA et al., 2005).

Atualmente, existem pelo menos quatro sistemas produtivos de alface no Brasil, que são o cultivo convencional e o sistema orgânico em campo aberto; o cultivo protegido no sistema hidropônico e no solo (FILGUEIRA, 2003; RESENDE et al., 2007).

A alface é considerada o vegetal com maior destaque dentro do grupo dos vegetais folhosos, apresentando o maior consumo e importância econômica no mundo, principalmente em países da Ásia, América Central, América do Norte e Europa (LEBEDA et al., 2007). A produção mundial, em 2011, foi da ordem de 23,2 milhões de toneladas anuais, liderando, no ranking mundial, a China, com 13,4 milhões de toneladas, seguida pelos Estados Unidos, com 4,07 milhões de toneladas e Índia, com 1,06 milhão de toneladas (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2013).

No Brasil, segundo dados do Anuário da Agricultura Brasileira, no ano de 2012, foram comercializadas 41.925 toneladas de alface no CEAGESP (ANUARIO..., 2014), em uma área total estimada de 39.000 ha (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRICOLA DO ESTADO DE SÃO PAULO - IEA-SP, 2014), sendo os maiores produtores os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, com 31%, 27% e 7% da produção nacional, respectivamente.

## **2.2 Melhoramento genético de alface**

A biotecnologia tem sido definida como qualquer técnica que utilize organismos vivos ou suas partes para fazer ou modificar produtos, melhorar plantas ou animais, ou desenvolver microrganismos para usos específicos

(RAMALHO; PADILHA; SAUDERS, 2008). Por esse conceito, tudo o que o homem vem realizando há séculos são técnicas biotecnológicas. Assim, por exemplo, a domesticação das plantas iniciada há mais de 10.000 anos é aplicação da biotecnologia.

No melhoramento de plantas, o conhecimento da natureza do controle genético de um caráter é de grande importância para a condução eficiente de um programa de melhoramento, orientando na escolha do melhor procedimento de seleção e dos métodos de melhoramento mais eficientes na condução das populações segregantes (CRUZ; REGAZZI, 1994; RAMALHO; SANTOS; ZIMERMANN, 1993; VENCOSKY; BARRIGA, 1992).

No melhoramento de hortaliças, vários autores vêm utilizando cruzamentos dialélicos para incrementar informações em diversos caracteres quantitativos de interesse nas culturas do tomateiro (AMARAL JÚNIOR et al., 1999; MALUF; MIRANDA; CAMPOS, 1982; MIRANDA; MALUF; CAMPOS, 1982) e pimentão (OLIVEIRA, 1997).

O melhoramento genético da alface teve início no seu berço de origem, no Oriente Médio, onde hoje estão o Egito e Irã, por meio de seleções feitas por habitantes da região. Essas primeiras seleções resultaram num grande *gene pool* de *Lactuca serriola*, seguidas por introgressões de genes de outras espécies do gênero *Lactuca* (LINDQUIST, 1960).

Mais tarde, a alface foi distribuída no império romano por meio do mar Mediterrâneo, vindo a ser introduzida no ocidente do continente europeu, provavelmente no início do século XV, sendo, em seguida, trazida para a América, por Cristóvão Colombo, em 1494 (RYDER, 2002). No Brasil, a introdução foi feita pelos portugueses, em 1650 (SALA, 2011).

A primeira cultivar de alface lançada no Brasil foi a Brasil 48, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na década de 1970, com resistência ao *Lettuce mosaic virus* (LMV) e ao calor (NAGAI, 1979). Até a década de

1980, o padrão de consumo de alface no país era a do tipo lisa, sendo as primeiras cultivares a ‘White Boston’ e a ‘San Rivale’, ambas centenárias (SALA, 2011). No entanto, o melhoramento genético já tinha certa expressão desde a década de 1960, com os trabalhos realizados no IAC, por Iroshi Nagai, com esforços voltados inicialmente ao desenvolvimento de cultivares resistentes a viroses. Na década de 1990, Nagai desenvolveu a série Brasil 500, com genótipos de folhas crespas, resistente a viroses e com tolerância ao florescimento precoce (MELO; MELO, 2003). O desenvolvimento desta série permitiu que o país se tornasse mais independente das empresas internacionais na produção de sementes, além de os materiais desenvolvidos terem sido utilizados com base de diversos programas de melhoramento (GOMES; MALUF; CAMPOS, 2000).

Até o final da década de 1990, o melhoramento genético de alface estava voltado, basicamente, para o desenvolvimento de cultivares com resistência a doenças, além de, principalmente, o desenvolvimento de cultivares com maior resistência ao pendoamento precoce que viabilizasse o cultivo de alface durante todo o ano, inclusive durante a primavera e o verão (FILGUEIRA, 2000). Ao longo dos anos, foram realizados trabalhos que identificaram genes relacionados ao controle dessas características, como a série *Ef*, que controla o florescimento (RYDER, 1986) e os genes da série *Dm*, relacionados ao controle do míldio (*Bremia lactucae*) (FARRARA; ILOT; MICHELMORE, 1987; LEBEDA; SCHWINN, 1994), os genes de resistência ao *Lettuce mosaic virus* (LMV) (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994) e os genes de resistência a nematoides (GOMES; MALUF; CAMPOS, 2000). No entanto, ultimamente, a pesquisa voltada para o melhoramento de alface tem sido globalizada e concentrada nas estações experimentais localizadas nos países-sede das multinacionais e não mais no Brasil, de modo que os ensaios não mais têm sido realizados nas

condições brasileiras, nos sistemas de cultivo e para as raças peculiares de patógenos que ocorrem no Brasil (SALA; COSTA, 2012).

Por outro lado, alguns exemplos de sucesso têm sido obtidos com os programas de melhoramento de alface desenvolvidos no Brasil por algumas empresas nacionais e algumas instituições de pesquisa, visando à obtenção e à liberação de cultivares adaptadas às nossas condições de cultivo. O lançamento de cultivares nacionais, estimulado pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) do Ministério da Agricultura brasileiro, tem possibilitado a oferta de cultivares com tolerância ao pendoamento precoce, adaptação às condições climáticas de verão com elevada pluviosidade e resistência às principais doenças, o que vem permitindo o cultivo dessas cultivares pelos produtores e contribuindo para dar sustentabilidade ao cultivo de alface no Brasil (SALA; COSTA, 2012).

Na última década, trabalhos relacionados ao incremento de teores de carotenoides pró-vitamina A têm tomado certa importância. A presença de variabilidade entre cultivares para teores de luteína e  $\beta$ -caroteno, bem como uma correlação entre  $\beta$ -caroteno e clorofila, foi demonstrada, sugerindo um potencial uso do teor de clorofila como indicador indireto do teor de carotenoides, bem como a viabilidade do melhoramento genético em alface para aumento dos teores desses compostos (MOU, 2005).

Também no Brasil, nos últimos anos, a preocupação com a deficiência de vitamina A, especialmente nas regiões menos desenvolvidas, tem levado ao desenvolvimento de cultivares com índices mais altos de carotenoides pró-vitamina A, o que resultou na obtenção da cultivar Uberlândia 10.000 que possui, em cada 100 g de folha fresca, mais de 10.000 UI de vitamina A, equivalentes a 36 milihenry (mh) de  $\beta$ -caroteno por 100 g de folha fresca (SOUSA et al., 2007). As linhagens foram selecionadas baseando-se em caracteres morfológicos, como coloração das folhas, resistência ao pendoamento

precoce, sabor doce e adaptação a variações no pH do solo. A cultivar Uberlândia 10.000 originou-se de seleções a partir do cruzamento de ‘Maioba’ e ‘Salad Bowl-Mimosa’, que deu origem à cultivar ‘Moreninha de Uberlândia’ que, apesar do alto teor de vitamina A, tinha características inadequadas às exigências do consumidor, sendo, então, cruzada com a cultivar ‘Vitória de Santo Antão’, que resultou, finalmente, na cultivar Uberlândia 10.000 (SOUSA et al., 2007).

Na alface, é comum a utilização de métodos de melhoramento que envolvam hibridação e seleção, principalmente o método genealógico (RYDER, 1986; VECCHIA; KIKUCHI, 1989a, 1989b; VECCHIA; KOCH; KIKUCHI, 1999), e uma das dificuldades encontradas no processo seletivo é a falta de informações sobre a herança de características quantitativas de interesse. A obtenção dessas informações pode possibilitar maiores ganhos genéticos, aumentando a eficácia do programa de melhoramento com alface.

A estratégia a ser adotada em um programa de melhoramento depende da análise genética dos caracteres, pois isso leva a um melhor conhecimento das relações entre os genitores envolvidos em cruzamentos, que podem ser úteis na escolha adequada de métodos de melhoramento e seleção a serem empregadas, bem como na visualização do potencial genético de futuras linhagens (CRUZ; REGAZZI, 1997). Deve-se dar atenção aos estudos genéticos dos caracteres agronômicos, como forma de avaliar o potencial genético dos genitores de produzir descendentes melhores e de aumentar a eficiência dos métodos de melhoramento (TAVARES; MELO; SCIVITTARO, 1999).

Um grande número de genes para coloração foliar tem sido identificado. Um gene com três alelos identificados governa lobulação foliar:  $u+$  produz uma folha “pontiguda” (semelhante a *L. serriola*),  $uo$  produz folhas crespas e  $u$  produz folhas com ausência de lóbulos. Muitos genes afetam o gradiente da lobulação das folhas. Todos são recessivos. A coloração da folha da alface varia

com o teor de clorofila, governando o grau da cor verde e com o teor de antocianina, governando a presença, o modelo e a distribuição da coloração vermelha (RYDER, 1999). Muitos diferentes tons de verde existem em alface, bem como um número relativo de mutantes deletérios, causando vários modelos de deficiência de clorofila. Muito desses tipos têm sido identificados geneticamente e todos têm mostrado que a redução do teor de coloração verde (clorofila) é devido a um alelo recessivo.

O trabalho clássico de antocianina em alface foi de Ryder (1999). Ele propôs um par de genes complementário controlando a presença ou a ausência de antocianina (*CcGg*) e um sistema de alelo múltiplo controlando o modelo e a distribuição da cor. Se o alelo dominante para cada gene complementário estiver presente, a coloração vermelha aparecerá. Outras combinações dão coloração verde. O alelo *R* dá uma distribuição geral de vermelho sobre a superfície da folha; *Rs* confere a formação de manchas (red-spotted) sobre as folhas e *R=* dá um “reddish” sobre a margem da folha. Lindquist (1960) identificou outro alelo *Rrb*, para coloração vermelha, bem como dois genes adicionais, um para coloração intensificada e outro para redução da coloração com a idade da planta. O gene de antocianina também afeta a distribuição da coloração no caule, botão da flor e pétalas florais (SALA, 2011).

As tendências atuais e futuras são atrelar as técnicas clássicas às de biotecnologia, visando à otimização dos resultados obtidos no melhoramento genético da alface para as mais diversas características. Esse emprego pode contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, além da geração e do desenvolvimento de produtos melhorados (SOUSA et al., 2007).

### 2.3 Estudo de herança

Em estudos de herança genética de uma característica contínua, a hipótese de herança monogênica frequentemente é testada por meio da aderência à distribuição de qui quadrado (ARIAS; TOLEDO; YORINORI, 1994; FREITAS et al., 2002; SOUZA SOBRINHO, 1998). Supondo a ação de poligenes, em geral, a inferência é feita estimando-se componentes de média por meio do teste de escala conjunto e os componentes de variância pela análise de variância (MATHER; JINKS, 1984; RAMALHO; SANTOS; ZIMERMANN, 1993). Estudos de herança propõem investigar simultaneamente a ação de um único gene (gene principal) e ou de vários genes de pequeno efeito (poligenes) (CHANGJIAN; XUEBIAO; MINGHONG, 1994; LOU; ZHU, 2002; SILVA, 2003).

A estimação de tais parâmetros, bem como o teste da hipótese de herança monogênica, tem, em geral, sido feita utilizando-se dados observados em plantas das linhagens contrastantes “ $P_1$ ” e “ $P_2$ ”, da geração “ $F_1$ ” (cruzamento entre  $P_1$  e  $P_2$ ) e “ $F_2$ ” (cruzamento entre plantas  $F_1$ ), e dos retrocruzamentos “ $RC_1$ ” (entre indivíduos  $F_1$  e  $P_1$ ) e “ $RC_2$ ” (entre indivíduos  $F_1$  e  $P_2$ ). A dificuldade estatística inerente a estes estudos é a existência de misturas de distribuições (em geral normais), para as quais os estimadores não são evidentes.

Um método de estimação adequado para tanto é o da máxima verossimilhança, usado por Lynch e Walsh (1998) e Silva (2003) em problemas de misturas de distribuições em genética.

Silva (2003) demonstrou um modelo estatístico bastante parametrizado envolvendo misturas de densidades normais, o que dificulta a construção de testes exatos para julgar hipóteses de interesse. Assim, testes de razão de verossimilhanças podem ser empregados para tal, considerando a aproximação de qui-quadrado. Convém salientar que a construção de hipóteses a serem

testadas depende do interesse do pesquisador. Assim sendo, podem-se exemplificar algumas hipóteses de nulidade correspondentes aos seguintes modelos:

- a) contendo efeitos ambientais e poligênicos (sem gene de efeito maior);
- b) contendo efeitos ambientais e um gene de efeito maior (sem genes de pequeno efeito, ou seja, poligenes).

#### **2.4 Cor das folhas e clorofila**

A coloração das folhas de alface varia de verde-amarela até verde-escura, e existem, ainda, algumas cultivares que têm coloração arroxeadada devido à presença do pigmento antocianina (REGHIN, 2002).

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Estudos em uma grande variedade de plantas relatam que os pigmentos clorofilianos são os mesmos. As diferenças aparentes na cor do vegetal são devido à presença e à distribuição variável de outros pigmentos associados, como carotenoides, os quais sempre acompanham as clorofilas (ELBE, 2000).

A clorofila relaciona-se diretamente com a atividade fotossintética nas plantas. Assim, o estado nutricional das plantas está relacionado com a qualidade e a quantidade de clorofila.

As clorofilas não são moléculas isoladas, compreendendo uma família de substâncias semelhantes, chamadas clorofilas *a*, *b*, *c* e *d*. A clorofila *a* é a mais abundante e mais importante dessa família e corresponde a, aproximadamente, 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais (GROSS, 1991).



A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. As bactérias fotossintetizantes são desprovidas de clorofila *a* e têm, em seu lugar, a bacterioclorofila como pigmento fotossintético. A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. Os principais pigmentos acessórios também incluem outros tipos de clorofilas, como clorofila *b*, presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; clorofila *c*, em feofitas e diatomáceas e clorofila *d*, em algas vermelhas (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b*, os carotenoides e as ficobilinas. A clorofila *b*, os carotenoides e as ficobilinas constituem os chamados pigmentos acessórios. A energia absorvida pelos pigmentos é transferida para sítios bem definidos, localizados sobre as membranas tilacoides, os chamados centros de reação. Há dois centros de reação, um deles absorvendo luz em 680 nm e outro em 700 nm, os quais interagem entre si por meio de transportadores de elétrons. É a partir da molécula de clorofila, a qual absorve em 680 nm no espectro visível, que os elétrons oriundos da água são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese (KLUGE, 2004).

O teor de clorofilas nas folhas é influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, estando diretamente relacionado com o potencial de atividade fotossintética das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

## **2.5 Carotenoides e vitamina A**

A Organização Mundial da Saúde - OMS (2009) estimou que existiam, no mundo, 5,2 milhões de crianças em idade pré-escolar com xerofthalmia e 190

milhões de crianças, também em idade pré-escolar, com concentração sérica de retinol abaixo de 0,70  $\mu\text{mol/L}$ . No Brasil, a deficiência encontra-se em vários estados e capitais, em cidades grandes e pequenas e em zonas rurais. Inquéritos bioquímicos disponíveis confirmam que a carência de vitamina A é um problema de saúde pública nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Bahia e Amazonas (GERALDO et al., 2003; RAMALHO; FLORES; SAUNDERS, 2002).

Considerando-se a dimensão coletiva da hipovitaminose A, refletida nas taxas de mortalidade do grupo materno-infantil do país, estudos apontam para a necessidade de incluir estratégias de intervenção adicionais à suplementação, que podem ser adotadas para prevenir ou reduzir a deficiência de vitamina A, contribuindo para a reversão desse quadro. Dentre essas medidas, podem-se citar a educação nutricional e a formulação de produtos com alto conteúdo da vitamina (MILAGRES; NUNES; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007; OMS, 2000; RAMALHO; PADILHA; SAUDERS, 2008).

A vitamina A é um nutriente que se encontra apenas em alimentos de origem animal. Os vegetais fornecem provitaminas A, como alfa e  $\beta$ -caroteno e a betacriptoxantina, que podem ser biologicamente transformados em vitamina A em organismos animais. O mais ativo dos carotenoides pró-vitâmicos A é o  $\beta$ -caroteno, sendo também o mais distribuído em alimentos, como o menor ou a maior constituinte carotenogênico (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993).

Os carotenoides, juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes antioxidantes em sistemas biológicos. Esses agentes antioxidantes são responsáveis pelo poder curativo e preventivo de certos alimentos.

Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável,

atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995).

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais sintetizados por organismos do reino vegetal, como frutas, verduras e flores. Com exceção de alguns invertebrados, os animais são incapazes de sintetizar os carotenoides, limitando-se, portanto, a ingerir esses compostos e modificá-los. Os carotenoides estão presentes em todos os organismos fotossintetisadores e são responsáveis por uma ampla faixa de coloração, que vai do amarelo ao vermelho. Nas plantas, os carotenoides estão localizados nos plastídeos onde são sintetizados (FRASER; BRAMLEY, 2004).

São classificados, segundo sua estrutura química, como carotenos, quando constituídos por carbono e hidrogênio, ou como xantofilas, quando constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio. Possuem sistema de ligação dupla conjugada na cadeia poliênica e podem ter ou não anel nas extremidades da cadeia e grupos funcionais (carbonila, hidroxila, entre outros). Estas propriedades influenciam tanto a capacidade de absorver luz no visível como a atividade antirradical livre do carotenoide. A estrutura básica dos carotenoides é formada por um tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico e linear, formado a partir de oito unidades de cinco carbonos cada, unidas de tal forma que a ordem se inverte no centro (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARRAN, 2008).

Estima-se que já tenham sido identificados e caracterizados cerca de 600 tipos de carotenoides de ocorrência natural. Entretanto, aproximadamente 40 tipos estão presentes na dieta humana e destes 40, apenas 20 já foram identificados nos tecidos e no sangue humanos, sendo que aproximadamente 90% dos carotenoides da dieta e tecidos humanos são representados por  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína e  $\beta$ -criptoxantina (RAO; RAO, 2007).

Os principais representantes são os carotenos, precursores da vitamina A e o licopeno (GAZZONI, 2003). O  $\beta$ -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas. Dos mais de 600 carotenoides conhecidos, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A. Este é um nutriente essencial para humanos, pois participa no processo da visão, crescimento, diferenciação de tecido  $\alpha$ s, função imunológica, reprodução e desenvolvimento embrionário (INSTITUTE OF MEDICINE - IOM, 2001). A carência dessa vitamina pode levar à cegueira noturna, xeroftalmia, xerodermia e hiperqueratose folicular (SOMMER, 1995).

O  $\beta$ -caroteno é um potente antioxidante com ação protetora contra radicais livres causadores de doenças cardiovasculares. A oxidação do *low density lipoprotein* (LDL) é fator crucial para o desenvolvimento da aterosclerose e o beta-caroteno atua inibindo o processo de oxidação da lipoproteína (AMBROSIO; CAMPOS; FARO, 2006).

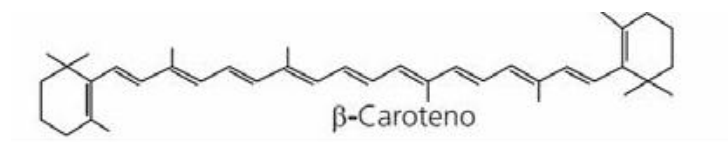
Estudos indicam que a deficiência de vitamina A configura-se como um problema de saúde pública nas regiões norte, nordeste e em algumas partes do sudeste do Brasil. Em 2006, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde indicou que a prevalência de deficiência de vitamina A no Brasil é de 17,4% em crianças menores de cinco anos e 12,3% em mulheres não grávidas em idade reprodutiva (BRASIL, 2009).

A vitamina A foi a primeira vitamina lipossolúvel a ser reconhecida. Isso ocorreu em 1913, quando dois grupos de investigadores – McCollum e Davis, da Universidade de Wisconsin, e Osborne e Mendel, em Yale – demonstraram, independentemente, que os ratos não crescem normalmente consumindo dietas deficientes em gorduras naturais. Aproximadamente na época em que cessava o crescimento, os olhos tornavam-se inflamados e aparentemente infectados. Esta característica enfermidade ocular, conhecida como xeroftalmia, foi aliviada, em poucos dias, por meio da adição, à dieta, de

um pouco de gordura de manteiga ou óleo de fígado de bacalhau, que contém um fator protetor ou curativo conhecido como vitamina A.

O carotenoide precursor da vitamina A tem pelo menos um anel de  $\beta$ -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos. Entre os carotenoides, o  $\beta$ -caroteno é o mais abundante em alimentos e o que apresenta a maior atividade de vitamina A. Ele tem ação protetora contra o câncer e os possíveis mecanismos de proteção são por intermédio do sequestro de radicais livres, modulação do metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinoides, estimulação da comunicação entre as células e aumento da resposta imune. Desempenha funções básicas no organismo, atuando no crescimento, na visão, na integridade estrutural e funcional dos epitélios e no processo de reprodução. Apresenta também funções bioquímicas (na síntese proteica e sobre as membranas) (SILVA; MURA, 2010). Desse modo, o  $\beta$ -caroteno é o metabólito vegetal mais importante como fonte de vitamina A, equivalendo a duas moléculas de retinol (THURNHAM, 2007).

Segundo Stahl e Sies (2003), os carotenoides fazem parte do sistema de defesa antioxidante em humanos e animais. Devido à sua estrutura (Figura 1), atua protegendo as estruturas lipídicas da oxidação ou por sequestro de radicais livres gerados no processo foto-oxidativo.



Estrutura do carotenoide  $\beta$ -caroteno

A síntese da vitamina A dá-se através da ação da enzima  $\beta$ -caroteno-15,15'-dioxigenase que, em mamíferos, tem sua máxima atividade na mucosa

intestinal. O retinol então formado é absorvido juntamente com o retinol pré-formado ingerido com a dieta. Como uma molécula de  $\beta$ -caroteno quebrada enzimaticamente forma duas moléculas de retinol, 1  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno corresponde, em teoria, a 1  $\mu\text{g}$  de retinol (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Existem vários fatores que podem atuar isolada ou conjuntamente na alteração da absorção dos carotenoides, modificando, portanto, sua disponibilidade – capacidade de o nutriente estar disponível para utilização pelo organismo. A estrutura química de um carotenoide pode determinar sua atividade de vitamina A. Também a forma na qual o carotenoide se encontra no alimento é importante. Ele pode estar ligado a um complexo pigmento-proteína ou a gotículas de gordura, cuja liberação é facilitada. O tempo de cocção do alimento pode ajudar na liberação do carotenoide, mas, se prolongado, pode levar à sua destruição oxidativa. A composição química dos alimentos também pode influenciar, pois a gordura favorece a absorção, pela formação de macelas (BRASIL; MORAIS, 2007).

Hortaliças e frutas correspondem à categoria de alimentos na qual é encontrada grande variedade de carotenoides (HEINONEN et al., 1989), sendo que, geralmente, grande parte desses pigmentos está presente em hortaliças folhosas verdes (OLSON, 1991).

Segundo Oliveira (2015), a concentração de carotenoides em plantas de alface é afetada pela fase de desenvolvimento em que a planta se encontra. A maior concentração de luteína e  $\beta$ -caroteno foi observada aos 40 dias após a semeadura, em folhas internas, havendo redução após esse período.

A prevalência de altos índices de deficiências em micronutrientes, como o ferro e o zinco, traz consequências negativas para a saúde humana. Assim, o investimento no desenvolvimento de culturas que não só apresentem maior qualidade nutricional como também maior produtividade, economia de água e

fertilizantes, é uma estratégia para trazer contribuições para o produtor, o consumidor e para o meio ambiente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em área experimental no município de Ijaci, MG, junto ao Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologias da Universidade Federal de Lavras (UFLA), nas dependências da HortiAgro Sementes Ltda., localizado na região sul do estado de Minas Gerais, a 21°10' de latitude sul e 44°55' de longitude oeste, onde foram utilizadas estufas para a produção de mudas e para a manutenção das plantas de alface em canteiros. Foi utilizado também o Laboratório de Produtos Vegetais, no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em Lavras, MG (Latitude: 21° 14' 43" S; Longitude: 44° 59' 59" W; Altitude: 919 m), para análises foliares.

Os materiais utilizados foram os seguintes:

- a) cultivar Verônica, que se caracteriza por apresentar folhas consistentes, crespas e soltas, não formando cabeça e sim uma roseta de folhas. Apresenta também coloração verde-claro e baixos teores de clorofila e  $\beta$ -caroteno (CASSETARI et al., 2015). Esta cultivar foi também utilizada como genitor feminino;
- b) cultivar Salinas 88. Alface do tipo americana com folhas crespas quebradiças e nervuras salientes, formando cabeça compacta. Além de apresentar resistência ao nematoide das galhas e ao vírus do mosaico da alface, esta cultivar destaca-se pela coloração verde-escura de suas folhas e pelos altos teores de clorofila e  $\beta$ -caroteno (CASSETARI et al., 2015). Esta cultivar foi utilizada como genitor masculino, devido à sua precocidade, à dificuldade de emasculação e à característica de folha;
- c) geração F<sub>1</sub> (Verônica x Salinas 88);
- d) geração F<sub>2</sub> (Verônica x Salinas 88);
- e) geração F<sub>2,3</sub> (Verônica x Salinas 88).



Para a realização dos cruzamentos e a obtenção das populações segregantes, sementes de cada cultivar foram semeadas de forma escalonada para favorecer o sincronismo de florescimento, inicialmente em bandejas de isopor de 128 células, com substrato comercial. Estas bandejas permaneceram, por cerca de 7 dias, em estufa protegida por sombrite 50%, para melhor pegamento das mudas. Em seguida, foram levadas para estufa sem sombrite, onde permaneceram por mais 21 dias. Após este período, as mudas foram transplantadas para vasos de 10 L, contendo substrato à base de terra de barranco, areia, húmus e adubo químico. Os vasos foram colocados em estufa, onde as plantas foram conduzidas até a colheita de sementes. Por ocasião do florescimento foram feitos os cruzamentos utilizando a técnica de despolinização por jato d'água (NAGAI, 1980) entre as duas cultivares, utilizando-se a cultivar Salinas 88 como genitor masculino. As flores ainda em estágio de botão, na iminência de abrir, tiveram seus estiletes cortados utilizando-se uma gilete. Em seguida, cada botão floral foi lavado para a retirada de pólen remanescente. Com o clarear do dia, os estigmas se alongaram e, quando tinham um formato bipartido na extremidade, foram polinizados esfregando-se flores abertas da cultivar Salinas 88 diretamente no estigma das flores emasculadas da cultivar Verônica. O cruzamento recíproco não foi realizado. Cada botão floral polinizado foi identificado amarrando-se nele um pedaço de lã. Após o desenvolvimento e o amadurecimento das sementes nas flores da cultivar Verônica, foram colhidas aquelas que estavam marcadas com lã. Estas sementes foram identificadas como  $F_1$  (Verônica x Salinas 88).

Essas sementes  $F_1$  (Verônica x Salinas 88), juntamente com os genitores, foram então semeadas em bandejas de isopor de 128 células, com substrato comercial, conforme realizado anteriormente. Como o genitor feminino foi a cultivar Verônica, procurou-se eliminar eventuais plantas originárias de autofecundação, que não se caracterizavam como  $F_1$ , cuja coloração verde era

um pouco menos intensa e as bordas das folhas mais serrilhadas que da cultivar Salinas 88. Após 30 dias, foram transplantadas para canteiros, onde permaneceram até a produção das sementes que foram identificadas como  $F_2$  (Verônica x Salinas 88).

### **3.1 Experimento 1**

Após a obtenção das sementes  $F_2$  (Verônica x Salinas 88), foi realizado um experimento para avaliação dos genitores, das gerações  $F_1$  (Verônica x Salinas 88) e  $F_2$  (Verônica x Salinas 88) e para a obtenção de sementes  $F_{2,3}$  (Verônica x Salinas 88).

Da mesma forma que anteriormente, fez-se a semeadura em bandejas de isopor de 128 células para a obtenção das mudas, as quais foram transplantadas para canteiros em estufa e conduzidas até a colheita das sementes em plantas  $F_2$  (Verônica x Salinas 88). Utilizaram-se três canteiros para os quais as plantas foram transplantadas no espaçamento de 25 cm entre plantas e 30 cm entre fileiras. Em cada canteiro distribuíram-se doze plantas de cada um dos genitores, 40 plantas da geração  $F_1$  (Verônica x Salinas 88) e 90 plantas da geração  $F_2$  (Verônica x Salinas 88), perfazendo, respectivamente, um total de 36, 120, e 270 plantas. As plantas foram conduzidas de acordo com recomendações para a cultura. Aos 60-65 dias após a semeadura, procedeu-se à coleta de folhas para avaliações para teor de clorofila e carotenoides. As plantas permaneceram em estufa e foram conduzidas até a fase de florescimento e amadurecimento das sementes.

Os dados deste experimento foram utilizados para estimar parâmetros genéticos, assim como as médias das populações.

Após o amadurecimento das sementes, cada planta  $F_2$  (Verônica x Salinas 88) teve suas sementes colhidas individualmente, originando 262 progênies  $F_{2,3}$  (Verônica x Salinas 88).

### **3.2 Experimento 2**

Em outro experimento posterior, 27 progênies  $F_{2,3}$  (Verônica x Salinas 88) foram tomadas aleatoriamente e suas sementes foram semeadas juntamente com os genitores para a obtenção de mudas, conforme feito anteriormente. Cerca de 28 dias após a semeadura, as mudas de cada progênie e dos dois genitores foram transplantadas para estufa, em canteiros, no espaçamento de 30 cm entre fileiras e 25 cm entre plantas, dentro da fileira. As mudas foram distribuídas no delineamento de blocos casualizados, com três repetições e doze plantas por parcela e conduzidas até a fase comercial, conforme as recomendações para a espécie.

Aos 60-65 dias após a semeadura, procederam-se as avaliações para teor de clorofila total e carotenoides totais nas folhas.

Os dados deste experimento foram utilizados para confirmar a hipótese de herança monogênica.

### **3.3 Avaliações de campo**

Após 60 a 65 dias da semeadura, ou seja, na fase comercial das plantas, foram feitas leituras para a determinação do teor de clorofila total, utilizando-se o clorofilômetro portátil (Chlorophyll Meter SPAD-502) desenvolvido por Minolta Camera (1989).

As leituras foram feitas diretamente na folha, ainda na planta, momentos antes de se fazer a coleta para análise em laboratório. Cada leitura do

SPAD equivale ao resultado médio obtido pela medida feita em quatro folhas de cada planta. Os resultados foram expressos em unidades SPAD, que equivale à média de trinta leituras.

Em seguida, as folhas foram destacadas, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas para posterior análise em laboratório.

### 3.4 Avaliação em laboratório

Os teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenoides totais foram determinados pelo método de extração da acetona 80%, de acordo com Lichtenthaler e Wellburn (1983).

Obtiveram-se discos foliares de 1 cm de diâmetro até atingirem 0,5 g de cada folha. Após a pesagem, os discos foram transferidos para tubos de ensaio com tampa contendo 10 ml de acetona 80% (v/v), em que permaneceram por 24 horas em câmara fria (3 °C), protegidos da luz. Ao fim desse período, filtraram-se os extratos, a solução resultante foi colocada em uma cubeta de vidro, enquanto na outra foi mantida uma amostra branca (acetona). Efetuaram-se as leituras de absorvância das amostras em espectrofotômetro (Varian - Cary 50 Probe) nos comprimentos de onda de 645, 652 e 663 nm, para as clorofilas e 470 nm, para os carotenoides. Com as leituras, calcularam-se os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total (WITHAM; BLAYDES; DEVLIN, 1971), e dos carotenoides (LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983), conforme as equações

$$Cl\ a = [(12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}) * V] / 1000 * W$$

$$Cl\ b = [(22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}) * V] / 1000 * W$$

$$Cl\ total = [(A_{652} * 1000) * (V / 1000 * W)] / 34,5$$

$$Car = [(1000 * A_{470} - 3,27 * Cl\ a - 104 * Cl\ b) / 229] / 1000 * W$$

em que

A = absorvância no comprimento de onda indicado

V = volume final (ml) do extrato (pigmentos + solução extratora)

W = matéria fresca (g) do material vegetal utilizado

Observação: teor expresso em miligrama de pigmento por grama de tecido fresco ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

### 3.5 Análises estatísticas

Plantas de alface foram avaliadas, conforme metodologia descrita no item anterior, quanto aos seguintes caracteres: clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, clorofila baseado no aparelho SPAD e carotenoides totais.

Os dados obtidos foram utilizados para estudo de correlação das características, estimativa de parâmetros genéticos, componentes de média e de variância para a determinação do tipo de herança envolvida na expressão da característica teor de clorofila e de carotenoides, avaliados por meio do teste de modelos genéticos, utilizando a função de verossimilhança.

De acordo com o valor de clorofila total e de carotenoides totais obtido para cada planta, foi estabelecido um número de classes. O número de classes (K) foi determinado de acordo com o número de grupos formados para cada característica, a 5% de probabilidade, a partir da equação  $K = (A \times n1/3)/(3,49 \times s)$ , em que A é a amplitude total, s é o desvio padrão de cada característica e n é o número total de amostras, conforme Scott (1979). A cada planta avaliada foi atribuída uma nota de 1 a 5, de acordo com a classe a que pertencia (Tabelas 1 e 2). Maiores notas correspondem a maiores teores de clorofila e carotenoides.

Tabela 1 Escala de notas utilizadas para avaliação do teor de clorofila total ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) em folhas de alface (*Lactuca sativa* L.)

Nota	Teor de clorofila total ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
1	0,11 a 1,09
2	1,10 a 2,08
3	2,09 a 3,07
4	3,08 a 4,06
5	4,07 a 5,05

Tabela 2 Escala de notas utilizadas para avaliação do teor de carotenoides totais ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) em folhas de alface (*Lactuca sativa* L.)

Nota	Teor de carotenoides totais ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
1	0,012 a 0,42
2	0,43 a 0,84
3	0,85 a 1,26
4	1,27 a 1,68
5	1,69 a 2,10

### 3.5.1 Estimativas de parâmetros genéticos

Médias e variâncias das plantas de cada população para as variáveis estudadas foram utilizadas para a obtenção de estimativas dos componentes genético ( $\sigma^2_G$ ) e ambiental ( $\sigma^2_E$ ), da variância fenotípica ( $\sigma^2_P$ ) e da herdabilidade no sentido amplo ( $H^2$ ).

As estimativas de  $\sigma^2_E$ ,  $\sigma^2_G$  e  $\sigma^2_P$  e da herdabilidade ( $H^2$ ) foram obtidas como

$$\sigma^2_E = [V(P_1) \cdot V(P_2)]^{(1/2)}$$

$$\sigma^2_G = V(F_2) - \sigma^2_E$$

$$\sigma^2_P = V(F_2) = \sigma^2_E + \sigma^2_G$$

$$H^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_P$$

em que

$V(P_1)$  = estimativa da variância entre plantas dentro da cultivar  $P_1$  (Verônica);

$V(P_2)$  = estimativa da variância entre plantas dentro da cultivar  $P_2$  (Salinas 88);

$V(F_2)$  = estimativa da variância entre plantas dentro da geração  $F_2$  (Verônica X Salinas 88).

Os efeitos aditivo [**a**] e não aditivo [**d**] dos genes que controlam o caráter foram estimados a partir das médias de gerações, conforme indicado por Mather e Jinks (1984).

$$\bar{P}_1 = m + [a]$$

$$\bar{P}_2 = m - [a]$$

$$\bar{F}_2 = m + \frac{1}{2} [d]$$

em que  $\bar{F}_2$  são as médias estimadas de  $P_1$ ,  $P_2$  e  $F_2$ .

### 3.5.2 Modelo de herança pelo método de verossimilhança

Para o teste utilizando a função de verossimilhança, Silva (2003) propôs uma metodologia para modelar e estimar parâmetros relativos ao efeito de gene maior e poligenes, ao se utilizarem gerações derivadas de linhagens contrastantes, considerando o método da máxima verossimilhança. A função da máxima verossimilhança foi constituída considerando uma característica que pode apresentar um gene de efeito maior, bem como variação entre indivíduos de um mesmo genótipo, devido à ação de efeitos ambientais e ou de genes de efeitos menores.

A partir das funções de verossimilhança, para cada modelo foi possível compor testes de interesse, considerando diferentes hipóteses. Tais testes de

razão de verossimilhança foram feitos por meio da estatística LR (MODD; GRAYBILL; BOES, 1974). Os testes foram realizados utilizando-se um software estatístico denominado “Monogen v 0.1”, desenvolvido por Silva (2003), que utiliza os modelos de herança descritos na Tabela 3.

Como apenas as gerações  $P_1$ ,  $P_2$  e  $F_2$  foram utilizadas, a metodologia de Silva (2003) permitiu apenas alguns testes entre os modelos. Os modelos 1, 3 e 5 não puderam ser testados devido à ausência de retrocruzamentos  $RC_1$  e  $RC_2$ , o que impossibilitou estimar a variância de dominância associada aos efeitos poligênicos. Os testes utilizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3 Modelos de herança utilizados pelo programa Monogen. UFLA, Lavras, 2015

<b>Modelo</b>	<b>Parâmetros</b>
1 = gene maior com efeitos aditivos e de dominância + poligenes com efeitos aditivos e de dominância	$i, A, D, [a], [d], V_A, V_D, S_{AD}, \sigma^2$
2 = gene maior com efeitos aditivos e de dominância + poligenes com efeito aditivo apenas	$i, A, D, [a], V_A, \sigma^2$
3 = gene maior com efeitos aditivos apenas + poligenes com efeitos aditivo e de dominância	$i, A, [a], [d], V_A, V_D, S_{AD}, \sigma^2$
4 = gene maior com efeito aditivo apenas + poligenes com efeito aditivo apenas	$i, A, [a], V_A, \sigma^2$
5 = poligenes com efeitos aditivos e de dominância	$i, [a], [d], V_A, V_D, S_{AD}, \sigma^2$
6 = poligenes com efeito aditivo apenas	$i, [a], V_A, \sigma^2$
7 = gene maior com efeitos aditivos e de dominância	$i, A, D, \sigma^2$
8 = gene maior com efeito aditivo apenas	$i, A, \sigma^2$
9 = apenas efeito do ambiente	$i, \sigma^2$



sendo

$\mu$ : constante de referência;

A: efeito aditivo do gene de efeito maior;

D: efeito de dominância do gene de efeito maior;

[a]: componente poligênico aditivo;

[d]: componente poligênico de dominância;

$V_A$ : variância aditiva;

$V_D$ : variância atribuída aos desvios de dominância dos efeitos poligênicos;

$S_{AD}$ : componente da variação relativa aos produtos dos efeitos poligênicos aditivos pelos efeitos poligênicos de dominância;

$\sigma^2$  : variância ambiental.

Tabela 4 Testes entre modelos e seus efeitos. UFLA, Lavras, 2015

Testes	Efeito estimado
Modelo 2 vs Modelo 4	Dominância do gene maior
Modelo 2 vs Modelo 6	1 gene maior com efeitos aditivos e de dominância
Modelo 2 vs Modelo 7	Poligenes com efeito aditivo atuando como modificadores de 1 gene maior
Modelo 2 vs Modelo 9	Efeitos de 1 gene com efeito aditivo e de dominância, somando ao efeito poligênico de natureza aditiva
Modelo 7 vs Modelo 8	Dominância do gene maior
Modelo 7 vs Modelo 9	1 gene maior com efeitos aditivos e de dominância

### 3.5.3 Avaliação de progênies $F_{2:3}$ e teste da hipótese de herança monogênica (dados experimento 2)

Uma amostra de 27 progênies  $F_{2:3}$  (Verônica x Salinas 88), provenientes de 27 plantas aleatoriamente tomadas da população  $F_2$  (Verônica x Salinas 88),

foi submetida a testes de progênie para a determinação do teor de clorofila total e carotenoides totais.

Foi calculada a média de notas para cada família  $F_{2,3}$ . As famílias foram comparadas por meio do teste Dunnett (5%), utilizando o software *Action*, com os genitores (Verônica e Salinas 88), tanto para a característica de teor de clorofila total quanto para teor de carotenoides totais.

Foi determinado um ponto de truncagem correspondente a um valor de absorvância acima do qual se situou a maior parte das plantas de  $P_2$  e abaixo do qual se situou a maior parte das plantas de  $P_1$ . As frequências de plantas com teor de clorofila total menor ou igual ao ponto de truncagem e maior que o ponto de truncagem de cada família  $F_{2,3}$  foram comparadas por meio do teste de Dunnett, com as frequências correspondentes encontradas em Verônica e Salinas 88. Da mesma forma, as plantas com teor de carotenoides totais menor ou igual ao ponto de truncagem e maior que o ponto de truncagem de cada família  $F_{2,3}$  foram também comparadas por meio do teste Dunnett com as frequências correspondentes encontradas em Verônica e Salinas 88. Significância do teste Dunnett relativo às comparações com Verônica e não significância do teste relativo à comparação com Salinas 88 levaram à caracterização da família  $F_{2,3}$  como **homozigota para alto teor de clorofila**. Por outro lado, significância do teste Dunnett relativa às comparações com Salinas 88 e não significância do teste relativo à comparação com Verônica levaram à caracterização da família  $F_{2,3}$  como **homozigota para baixo teor de clorofila**. Analogamente, significância das comparações com Verônica e Salinas 88 levou à caracterização da família  $F_{2,3}$  como **segregante**.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Estimativa dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, clorofila medida pelo método SPAD e carotenoides totais em folhas de alface e correlação entre essas características

A análise de variância mostrou que houve diferenças significativas entre os genitores (cultivar Verônica e Salinas 88) e as gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> do cruzamento entre eles, para todas as características avaliadas. À exceção dos valores para teor de clorofila *b*, para todas as outras características (clorofila *a*, clorofila total, clorofila medida pelo SPAD e carotenoides totais) verificaram-se valores extremos entre os genitores. Neste caso, caracteriza-se o genitor Verônica como de teores mais baixos e o genitor Salinas 88 como de teores mais altos, corroborando os dados obtidos por Cassetari et al. (2015). Já as gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> apresentaram valores médios intermediários também para todas as características.

As diferenças entre os valores médios para teor de clorofila total variaram de um mínimo de 1,12 mg.g<sup>-1</sup>, para a cultivar Verônica (P<sub>1</sub>), até um máximo de 3,33 mg.g<sup>-1</sup>, para a cultivar Salinas 88 (P<sub>2</sub>) (SCOTT; KNOTT, 1974) (Tabela 5).

De acordo com Lee (1988), estudos realizados evidenciaram que o teor de clorofila varia muito entre as espécies, assim como entre genótipos de uma mesma espécie. Segundo Engel e Poggiani (1991), a eficiência fotossintética está ligada ao teor de clorofila das plantas, afetando o crescimento e influenciando a adaptabilidade das mesmas aos diversos ambientes.

Os valores médios dos teores de carotenoides também variaram de forma semelhante aos teores de clorofila. O teor mínimo observado foi de 0,35

$\text{mg.g}^{-1}$ , na cultivar Verônica e o valor máximo foi de  $1,34 \text{ mg.g}^{-1}$ , na cultivar Salinas 88 (Tabela 5).

Analisando-se, ainda, os dados da Tabela 5, observa-se a predominância quantitativa da clorofila *a* (média de 2,1305) em relação à clorofila *b* (média de 0,4003). Isso se justifica pelo fato da clorofila *a* ser o principal pigmento envolvido na fotossíntese, enquanto os demais pigmentos (clorofila *b* e carotenoides) auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Quantidades semelhantes de clorofila foram obtidas por Scopel, Barbosa e Vilela (2011) em plantas de canola, variando de  $0,84$  a  $1,96 \text{ mg.g}^{-1}$  de massa fresca e de carotenoides, variando de  $0,13$  a  $0,39 \text{ mg.g}^{-1}$ . Os mesmos autores também observaram predominância do teor de clorofila *a* em relação à clorofila *b*, sendo o primeiro  $0,6 \text{ mg.g}^{-1}$  superior ao segundo.

Foram observados também valores superiores das gerações  $F_1$  e  $F_2$  em relação aos pais para a característica de clorofila *b*. Isto indica que, provavelmente, existe segregação transgressiva quanto ao caráter (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004).

Tabela 5 Valores médios para as populações P<sub>1</sub> (Verônica), P<sub>2</sub> (Salinas 88), F<sub>1</sub> (Verônica x Salinas 88) e F<sub>2</sub> (Verônica x Salinas 88) de teores de clorofila *a* (mg.g<sup>-1</sup>), clorofila *b* (mg.g<sup>-1</sup>), clorofila total (mg.g<sup>-1</sup>), carotenoides totais (mg.g<sup>-1</sup>) e clorofila (unidades SPAD). Lavras, UFLA, 2015

Populações	Médias				
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Clorofila (SPAD)	Carotenoides totais
P <sub>1</sub>	0,8430 a	0,2813 a	1,1244 a	98 a	0,3508 a
P <sub>2</sub>	3,0733 c	0,2575 a	3,3302 d	368 c	1,3411 d
F <sub>1</sub>	2,3819 b	0,4206 b	2,5940 b	250 b	1,0819 c
F <sub>2</sub>	2,2239 b	0,6417 c	2,8642 c	243 b	0,7985 b

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si, a 5% de significância, pelo teste Scott e Knott (1974)

Rodriguez-Amaya (1993), em trabalho com folhas de tomate, encontraram alta correlação entre os valores da unidade SPAD e clorofila extraída, recomendando o uso do clorofilômetro para este fruto. No presente trabalho também foi encontrada essa correlação positiva, com valores superiores a 0,60, inclusive em relação a carotenoides totais (Tabela 6).

Foi observada correlação alta e positiva em relação às características de clorofila *a* e clorofila total (0,9234), indicando novamente a importância da clorofila *a* em relação a outros pigmentos (Tabela 6).

Por meio do estudo de correlação, foi possível observar também que a relação entre clorofila *b* e carotenoides totais é inversamente proporcional, sendo observada correlação negativa para essas características (Tabela 6).

Vale destacar ainda, na Tabela 6, a alta correlação encontrada entre as características de carotenoides totais e clorofila pelo medidor SPAD, evidenciando o potencial uso do aparelho SPAD como indicador indireto dos teores de carotenoides em folhas de alface.

Tabela 6 Correlação entre teores de clorofila *a*, *b*, total, clorofila pelo medidor SPAD e carotenoides totais em folhas de alface. Lavras, UFLA, 2015

	<b>Clorofila <i>a</i></b>	<b>Clorofila <i>b</i></b>	<b>Clorofila total</b>	<b>Clorofila SPAD</b>	<b>Carotenoides</b>
<b>Clorofila <i>a</i></b>	-	0,1316	0,9234	0,7534	0,8141
<b>Clorofila <i>b</i></b>	-	-	0,4933	0,0243	-0,1740
<b>Clorofila total</b>	-	-	-	0,6688	0,6448
<b>Clorofila SPAD</b>	-	-	-	-	0,6917
<b>Carotenoides</b>	-	-	-	-	-

O teor de clorofila na folha é utilizado para prever o nível nutricional de nitrogênio (N) em plantas, devido ao fato de a quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com teor de N na planta (HURTATO et al., 2011). Correlação alta e positiva entre características de interesse podem ser importantes em trabalhos de melhoramento por permitirem que se faça uma seleção indireta, mediante a utilização da característica mais simples e de menor custo.

Estes resultados confirmam a alta correlação existente entre clorofila total e carotenoides totais, semelhante ao resultado encontrado por Mou (2005), quando avaliou os teores de  $\beta$ -caroteno, luteína e clorofila em diferentes cultivares de alface, tanto no verão como no outono e encontrou alta correlação, com valores entre 0,93 e 0,99. Este autor sugeriu que altos teores de carotenoides em alface podem ser selecionados indiretamente por meio de seleção para maior teor de clorofila ou coloração verde, o que pode facilitar o trabalho dos melhoristas, em função da maior facilidade e do menor custo.

#### **4.2 Estimativas de variância fenotípica ( $\sigma^2_p$ ), genética ( $\sigma^2_G$ ) e ambiental ( $\sigma^2_E$ ), da herdabilidade no sentido amplo ( $H^2$ ) e do grau médio de dominância (GMD) para teor de clorofila e carotenoides**

No ensaio realizado com os genitores Verônica e Salinas 88, gerações  $F_1$  (Verônica x Salinas 88) e  $F_2$  (Verônica x Salinas 88), ficou evidente que uma porção substancial da variância fenotípica para clorofila ( $\sigma^2_p = 1,2772$ ) foi de natureza genética ( $\sigma^2_G = 1,0238$ ) (Tabela 7). Da mesma forma, para carotenoides, grande parte a variação fenotípica ( $\sigma^2_p = 0,2428$ ) foi de natureza genética ( $\sigma^2_G = 0,2036$ ). O valor estimado para herdabilidade no sentido amplo foi relativamente alto, tanto para clorofila total ( $H^2 = 80\%$ ) quanto para carotenoides totais ( $H^2 = 84\%$ ). Esses resultados vão ao encontro dos resultados encontrados por Cassetari et al. (2015) que verificaram valores de herbabilidade para o caráter clorofila total em torno de 87% e para  $\beta$ -caroteno, em torno de 82%.

Os valores encontrados para herdabilidade no sentido amplo indicam a possibilidade de obterem-se indivíduos superiores por meio de seleção.

Segundo Carvalho et al. (2001), é a partir da herdabilidade que começa o estudo de um determinado caráter, para poder prever o ganho na próxima geração, para a obtenção de genótipos de desempenho superior. De acordo com Ramalho, Santos e Pinto (2008), a herdabilidade pode ser considerada o melhor parâmetro genético utilizado pelos melhoristas, pois permite antever a possibilidade de sucesso com a seleção, uma vez que reflete a proporção da variação fenotípica que pode ser herdada. Valores altos de herdabilidade são indicativos de que o caráter sofre pouca influência do ambiente, ampliando as possibilidades de ganho genético com a seleção.

Estas estimativas de herdabilidade bastante altas indicam que a variância genética ( $\sigma^2_G = 1,0238$  para clorofila total e  $\sigma^2_G = 0,2036$  para carotenoides totais) foi bastante superior à ambiental ( $\sigma^2_E = 0,2534$  para clorofila e  $\sigma^2_E = 0,0392$  para

carotenoides ) e que os valores dos teores de clorofila total e carotenoides foram pouco influenciados pelo ambiente, sob as condições experimentais utilizadas. Considerando as estimativas de grau médio de dominância (GMD), para ambas as características avaliadas, estas apontam para uma dominância incompleta de baixo valor, tanto para teor de clorofila (GMD=0,36) quanto de carotenoides (GMD= 0,46), indicando, neste caso, que os efeitos aditivos têm importância maior no controle dessas características. A herdabilidade alta associada a efeitos aditivos indica a possibilidade de sucesso por meio da seleção de genótipos superiores.

Tabela 7 Estimativas de parâmetros genéticos para as características avaliadas em folhas de alface das cultivares Verônica, Salinas 88 e na população F<sub>2</sub> (Verônica x Salinas 88). Lavras, UFLA, 2015

Parâmetro	Característica	
	Teor de clorofila total	Teor de carotenoides totais
P <sub>1</sub>	1,12	0,35
P <sub>2</sub>	3,33	1,34
F <sub>1</sub>	2,59	1,08
F <sub>2</sub>	2,86	0,80
$\sigma^2_P$	1,2772	0,2428
$\sigma^2_G$	1,0238	0,2036
$\sigma^2_E$	0,2534	0,0392
H <sup>2</sup> (%)	80	84
M	2,22	0,855
[a]	1,10	0,50
[d]	0,37	0,23
GMD	0,36	0,46

$\sigma^2_P$  = Variância fenotípica;  $\sigma^2_G$  = Variância genética;  $\sigma^2_E$  = Variância ambiental; H<sup>2</sup> = Herdabilidade no sentido amplo; m= média; [a] = efeitos aditivos; [d]= efeitos não aditivos; GMD = grau médio de dominância [d]/[a]



### 4.3 Testes de hipótese de herança monogênica para teores de clorofila total e carotenoides totais em folhas de alface considerando as populações $F_1$ e $F_2$

Os valores obtidos para teores de clorofila e carotenoides foram distribuídos em intervalos correspondentes a notas que variaram de 1, para mais baixo teor, até 5, para mais alto teor. Com base na distribuição de frequência de plantas para cada nota, em relação a cada um dos pais, Verônica e Salinas 88, estabeleceu-se um ponto de truncagem (PT). Este ponto corresponde à nota abaixo da qual se encontra o maior número de plantas do genitor com baixo teor de clorofila e carotenoides (cultivar Verônica) e acima do qual se encontra o maior número de plantas do genitor com alto teor (cultivar Salinas 88). O ponto de truncagem estabelecido para esta pesquisa corresponde à nota 2 (Figuras 1, 2, 3 e 4).

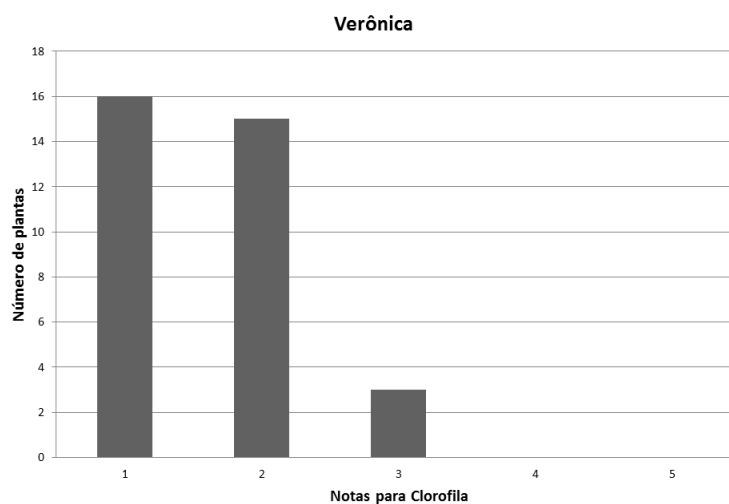


Figura 1 Distribuição de frequência de notas de clorofila em plantas de alface da cultivar Verônica

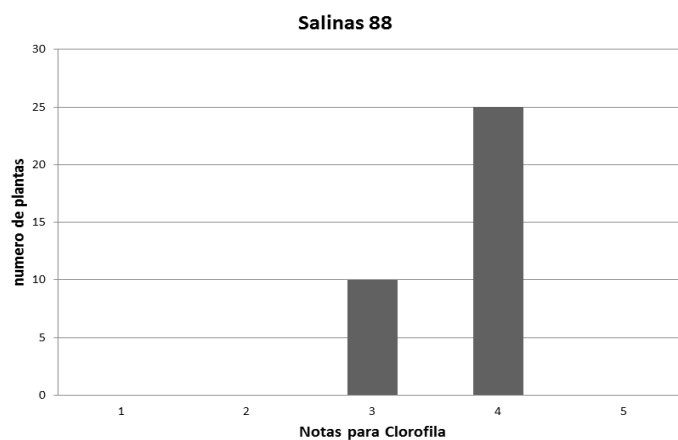


Figura 2 Distribuição de frequência de notas de clorofila em plantas de alface da cultivar Salinas 88

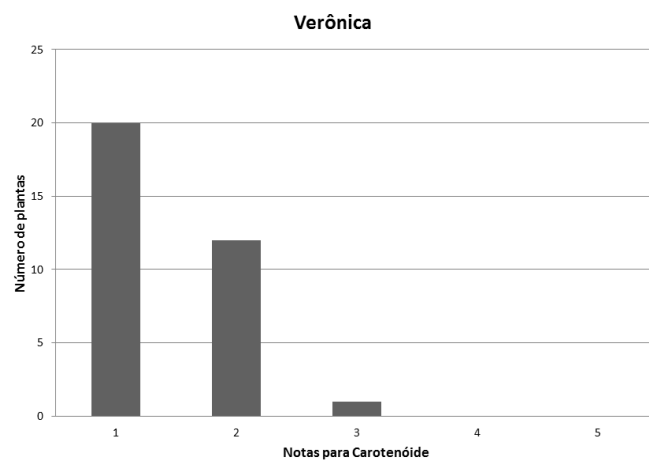


Figura 3 Distribuição de frequência de notas de carotenoides totais em plantas de alface da cultivar Verônica

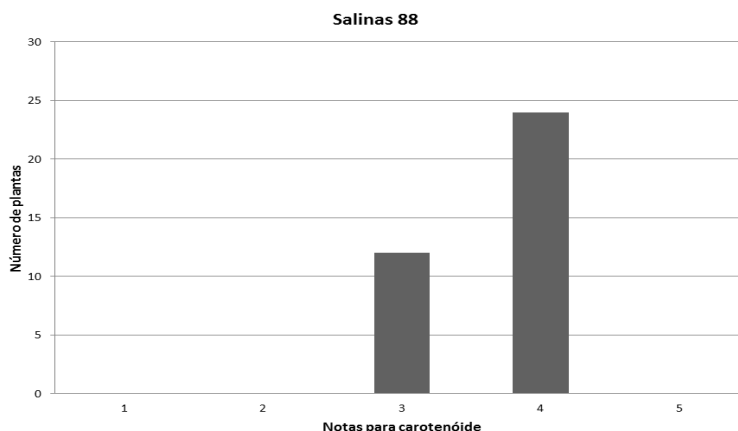


Figura 4 Distribuição de frequência de notas de carotenóides totais em plantas de alface da cultivar Salinas 88

As distribuições de frequência do número de plantas para os diferentes teores, de cada uma das gerações  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $F_1$  e  $F_2$ , evidenciam *per se* a presença de um único loco gênico no controle de cada uma das características (Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). A classificação de fenótipos em classes discretas (alto teor e baixo teor) não pode ser claramente feita em virtude da natureza contínua das variáveis estudadas, podendo, eventualmente, ocorrer alguma classe fenotípica comum tanto à cultivar com maior teor (Salinas 88) quanto à de menor teor (Verônica) (Figuras 1, 2, 3 e 4), embora em ambos os casos as frequências correspondentes tenham sido contrastantes. A ação gênica predominantemente aditiva, em adição à natureza contínua das variáveis estudadas, pode, também, contribuir para dificultar, de certa forma, a classificação das plantas em classes discretas. No entanto, as distribuições fenotípicas encontradas podem ser explicadas pela presença de um único loco gênico no controle de cada um dos teores, de clorofila total e de carotenóides, visto que as distribuições de frequência do número de plantas para os diferentes teores encontrados nas

folhas são coerentes com a segregação de um loco gênico, o que se soma a um baixo valor de grau de dominância (GMD) encontrado. O valor de qui-quadrado encontrado para a hipótese de segregação monogênica (1:2:1) foi inferior ao do nível  $\alpha=0,05$  (Tabela 11), podendo ser aceita a hipótese de herança monogênica. Estes resultados reforçam a hipótese de que os teores de clorofila total e de carotenoides encontrados em folhas de alface sejam controlados por um loco gênico apenas, com ação gênica predominantemente aditiva ou, pelo menos, por um único segmento cromossômico.

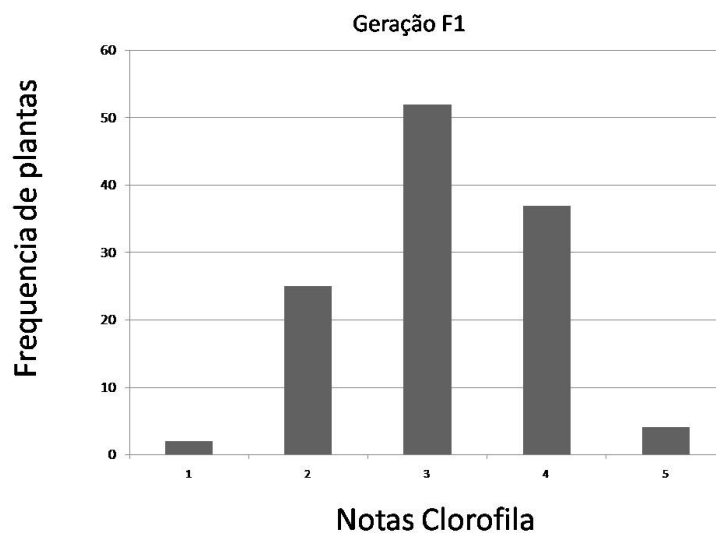


Figura 5 Distribuição de notas de clorofila em plantas de alface de geração F<sub>1</sub>

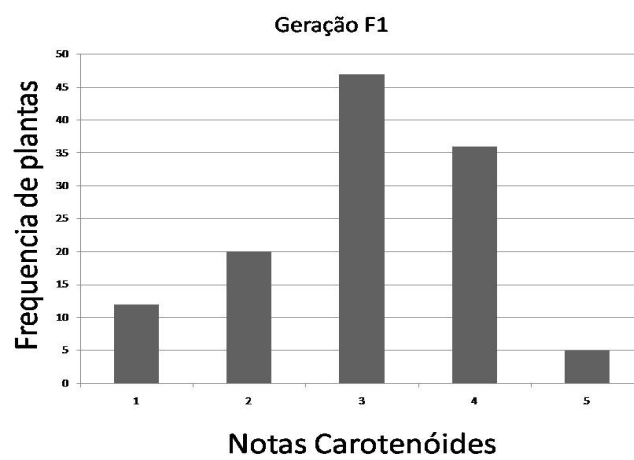


Figura 6 Distribuição de notas de carotenoides em plantas de alface da população F<sub>1</sub> (Verônica x Salinas 88)

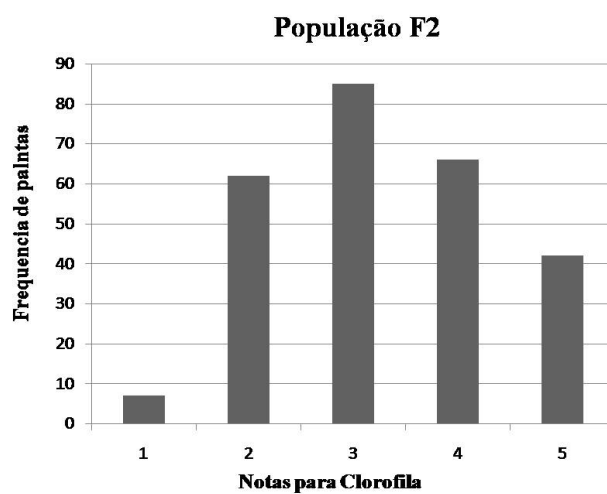


Figura 7 Distribuição de frequência de notas de clorofila total em plantas de alface da população F<sub>2</sub> (Verônica x Salinas 88)

#### **4.4 Estimativas do número de genes e efeito gênico no controle dos teores de clorofila e carotenoides em folhas de alface pela função de máxima verossimilhança**

Na determinação de modelos genéticos pela função de máxima verossimilhança, segundo Silva (2003), quando se comparam os modelos 2 e 4, a significância do teste evidencia a presença de gene maior com efeito de dominância para todas as características, exceto para teor de clorofila pelo aparelho SPAD (Tabela 8). A mesma significância foi encontrada ao se confrontarem os modelos 2 e 6, demonstrando a presença de um gene maior com efeito aditivo e de dominância. Ao se confrontarem os modelos 7 e 9, para todos os caracteres analisados, evidencia-se a presença de um gene maior com efeitos aditivos e de dominância (Tabela 8). Ao confrontarem-se os modelos 2 e 7, da mesma forma rejeita-se  $H_0$ , evidenciando que, além de um gene maior com efeito aditivo e de dominância, existem também poligenes com efeitos aditivos que afetam o controle dessas características. Ao confrontarem-se os modelos 2 e 9, novamente fica evidente a presença de um gene com efeito aditivo e de dominância somando ao efeito de poligenes de natureza aditiva (Tabela 8).

De acordo com os resultados, a herança do teor de clorofila e carotenoides é controlada por um gene maior, que apresenta efeitos aditivos e de dominância, além de ser influenciada por poligenes de efeito menor.

Não foram encontrados na literatura dados consistentes que pudessem corroborar os resultados aqui obtidos.

Tabela 8 Hipóteses de herança para clorofila *a*, clorofila total e carotenoides totais em folhas de alface. UFLA, Lavras, 2015

Testes	Clorofila a $x^2$	Clorofila total $x^2$	Clorofila SPAD $x^2$	Carotenoide
2 vs 4	28,60*	44,07*	1,89	25,44*
2 vs 6	29,54*	44,07*	1,89	31,18*
2 vs 7	28,39*	41,87*	14,12*	13,91*
2 vs 9	147,50*	160,53*	190,21*	123,60*
7 vs 8	8,72	7,30	2,44	11,57
7 vs 9	119,11*	118,66*	176,09*	109,69*

\* Valores significativos, a 5% de probabilidade

Modelo 2 vs 4 – Dominância do gene maior

Modelo 2 vs 6 - 1 gene maior com efeitos aditivos e de dominância

Modelo 2 vs 7 - Poligenes com efeitos aditivos atuando como modificadores de 1 gene maior

Modelo 2 vs 9 - Efeitos de 1 gene com efeito aditivo e de dominância, somando ao efeito poligênico de natureza aditiva

Modelo 7 vs 8 - Dominância do gene maior

Modelo 7 vs 9 - 1 gene maior com efeitos aditivos e de dominância

#### 4.5 Testes de hipótese de herança monogênica para teores de clorofila total e carotenoides totais em folhas de alface nas populações F<sub>2:3</sub>

Considerando-se o ponto de truncagem já obtido para teores de clorofila e carotenoides em folhas de alface, a cultivar Verônica apresentou 31 plantas com nota abaixo do ponto de truncagem e três acima deste ponto para clorofila total (Figura 1), enquanto a cultivar Salinas 88 não apresentou nenhuma planta abaixo do ponto de truncagem (Figura 2). Por outro lado, a cultivar Salinas 88 apresentou 36 plantas com nota acima ou igual ao ponto de truncagem, indicando alto teor de clorofila em suas folhas (Figura 2). Para carotenoides totais, a cultivar Verônica apresentou 33 plantas com nota abaixo do ponto de truncagem (nota 2) e apenas uma acima (Figura 3). Já a cultivar Salinas 88 apresentou 36 plantas com nota acima do ponto de truncagem e nenhuma planta abaixo desse ponto (Figura 4).

A comparação das médias (Dunnet, 5%) das notas para teores de clorofila em folhas de alface de cada uma das 27 famílias  $F_{2,3}$  com cada um dos genitores mostrou que seis foram consideradas homozigotas para baixo teor de clorofila total (F3-53, F3-63, F3-83, F3-85, F3-95, F3-127), oito foram consideradas homozigotas para alto teor de clorofila total (F3-49, F3-73, F3-109, F3-111, F3-148, F3-157, F3-169, F3-177) e as outras treze (F3-6, F3-32, F3-34, F3-41, F3-90, F3-91, F3-105, F3-118, F3-124, F3-153, F3-171, F3-185, F3-187) foram consideradas segregantes para essa característica (Tabela 9, Figuras 8 e 9).

Da mesma forma, para carotenoides totais, das 27 famílias  $F_{2,3}$  avaliadas, dez foram classificadas como homozigotas para baixo teor de carotenoides (F3-32, F3-53, F3-63, F3-83, F3-85, F3-90, F3-95, F3-127, F3-153, F3-171), oito foram classificadas como homozigotas para alto teor de carotenoides (F3-49, F3-73, F3-109, F3-111, F3-148, F3-157, F3-169, F3-177) e as outras nove famílias (F3-6, F3-34, F3-41, F3-91, F3-105, F3-118, F3-124, F3-185, F3-187) foram consideradas segregantes para esta característica (Tabela 10, Figuras 10 e 11)

As famílias consideradas homozigotas para alto teor de clorofila total e carotenoides totais poderão vir a originar novas linhagens de alface com folhas mais escuras e com alto teor de carotenoides.

Ainda com relação à geração  $F_{2,3}$ , a segregação observada das 27 famílias com relação a teor de clorofila foi de seis famílias semelhantes à cultivar Verônica, oito famílias semelhantes à cultivar Salinas 88 e 13 famílias segregantes (Tabela 11), se enquadrando em uma segregação mendeliana de 1:2:1, em que a proporção esperada seria de 6,75 famílias semelhantes à Verônica, 6,75 famílias semelhantes à Salinas 88 e 13 famílias segregantes.

Resultado semelhante foi observado para o caráter carotenoides totais, em que a frequência de plantas observadas foi de 10 plantas semelhantes à



cultivar Verônica, oito plantas semelhantes à cultivar Salinas 88 e nove segregantes (Tabela 11).

De acordo com o teste qui-quadrado realizado tanto para clorofila total quanto para carotenoides totais, é possível confirmar a hipótese de herança monogênica de acordo com a não significância dos resultados (Tabela 11).

Tabela 9 Famílias F<sub>2:3</sub> (Verônica x Salinas 88) avaliadas quanto ao grau de homozigose para teor de clorofila, pelo teste Dunnett (5%). Lavras, UFLA, 2015

Família	Média das notas para teor de clorofila	Salinas 88 nota (3,72)	Verônica nota (1,61)	Valor de P	Caracterização
6	2,88	**	**	0	Segregante
32	2,34	**	**	3,19	Segregante
34	3,13	**	**	0	Segregante
41	3,13	**	**	0	Segregante
49	3,25	Ns	**	0	Homo. alto teor
53	1,85	**	Ns	0,29	Homo. baixo teor
63	1,71	**	Ns	0,37	Homo. baixo teor
73	3,55	Ns	**	0	Homo. alto teor
83	1,45	**	Ns	1	Homo. baixo teor
85	2,08	**	Ns	0,003	Homo. baixo teor
90	2,19	**	**	0,0001	Segregante
91	3,0	**	**	0	Segregante
95	2,08	**	Ns	0,001	Homo. baixo teor
105	2,86	**	**	0	Segregante
109	3,5	Ns	**	0	Homo. alto teor
111	3,83	Ns	**	0	Homo. alto teor
118	3,05	**	**	0	Segregante
124	3,13	**	**	0	Segregante
127	2,11	**	Ns	2,45	Homo. baixo teor
148	3,66	Ns	**	0	Homo. alto teor
153	2,27	**	**	1,72	Segregante
157	3,52	Ns	**	0	Homo. alto teor

Tabela 9, conclusão

Família	Média das notas para teor de clorofila	Salinas 88 nota (3,72)	Verônica nota (1,61)	Valor de P	Caracterização
169	3,63	Ns	**	0	Homo. alto teor
171	2,22	**	**	5,21	Segregante
177	3,47	Ns	**	0	Homo. alto teor
185	3,05	**	**	0	Segregante
187	3,08	**	**	0	Segregante

\*\* = Teste significativo; Ns = Teste não significativo; Homo.= homozigoto

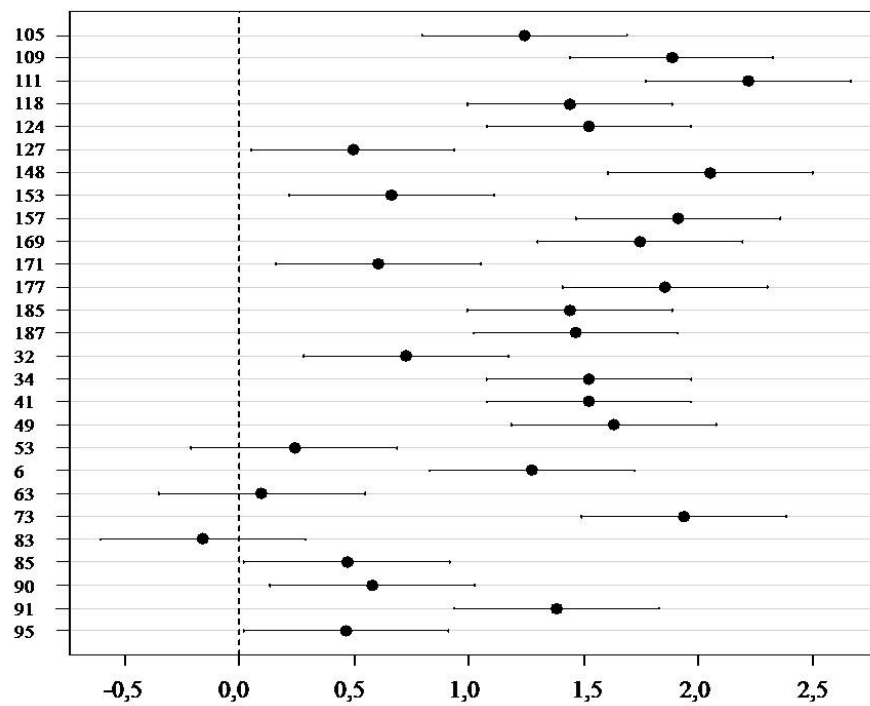


Figura 8 Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de clorofila do genitor Verônica e de cada família  $F_{2:3}$  (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%)

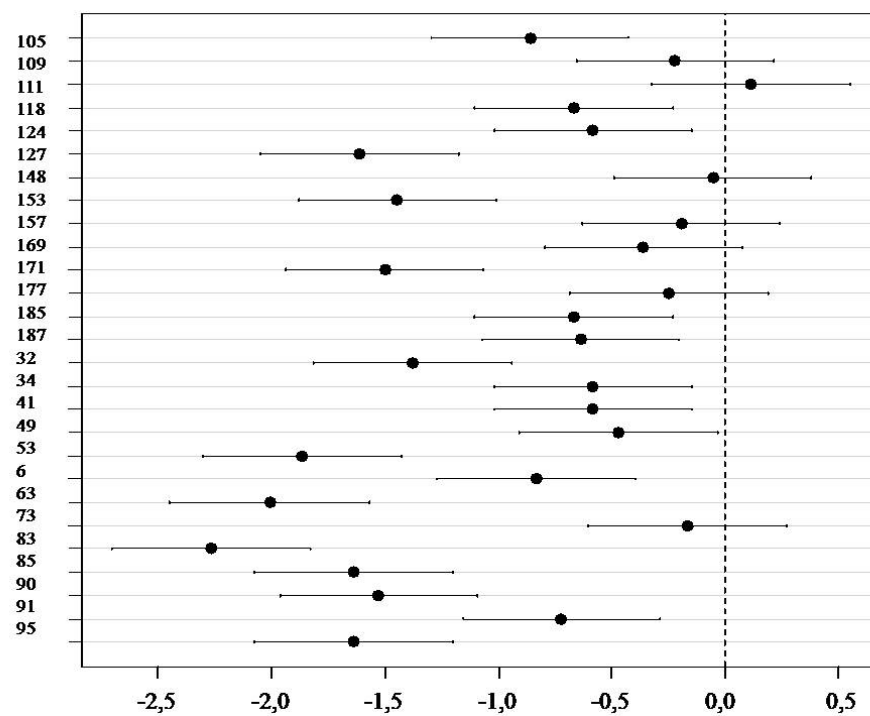


Figura 9 Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de clorofila do genitor Salinas 88 e de cada família  $F_{2:3}$  (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%)

Tabela 10 Famílias F<sub>2,3</sub> (Verônica x Salinas 88) avaliadas quanto ao grau de homozigose para teor de carotenoides, pelo teste Dunnett (5%). Lavras, UFLA, 2015

Família	Média das notas para teor de carotenoides	Salinas 88 nota (3,66)	Verônica nota (1,44)	Valor de P	Caracterização
6	2,88	**	**	2,18	Segregante
32	2,22	**	Ns	0	Homo. baixo teor
34	3,05	**	**	0,0001	Segregante
41	3,08	**	**	0,0004	Segregante
49	3,25	Ns	**	0,03	Homo. alto teor
53	1,75	**	Ns	0	Homo. baixo teor
63	1,73	**	Ns	0	Homo. baixo teor
73	3,33	Ns	**	0,19	Homo. alto teor
83	1,41	**	Ns	0	Homo. baixo teor
85	1,97	**	Ns	0	Homo. baixo teor
90	2,08	**	Ns	0	Homo. baixo teor
91	2,69	**	**	5,40	Segregante
95	2,0	**	Ns	0	Homo. baixo teor
105	2,86	**	**	1,13	Segregante
109	3,5	Ns	**	0,96	Homo. alto teor
111	3,69	Ns	**	1	Homo. alto teor
118	3,16	**	**	0,005	Segregante
124	3,05	**	**	0,0001	Segregante
127	2,22	**	Ns	0	Homo. baixo teor
148	3,50	Ns	**	0,96	Homo. alto teor
153	2,13	**	Ns	0	Homo. baixo teor
157	3,48	Ns	**	0,88	Homo. alto teor

Tabela 11, conclusão

Família	Média das notas para teor de carotenoides	Salinas 88 nota (3,66)	Verônica nota (1,44)	Valor de P	Caracterização
169	3,27	Ns	**	0,07	Homo. alto teor
171	2,22	**	Ns	0	Homo. baixo teor
177	3,33	Ns	**	0,19	Homo. alto teor
185	3,0	**	**	3,10	Segregante
187	3,16	**	**	0,005	Segregante

\*\* = Teste significativo; Ns = Teste não significativo; Homo.= homozigoto

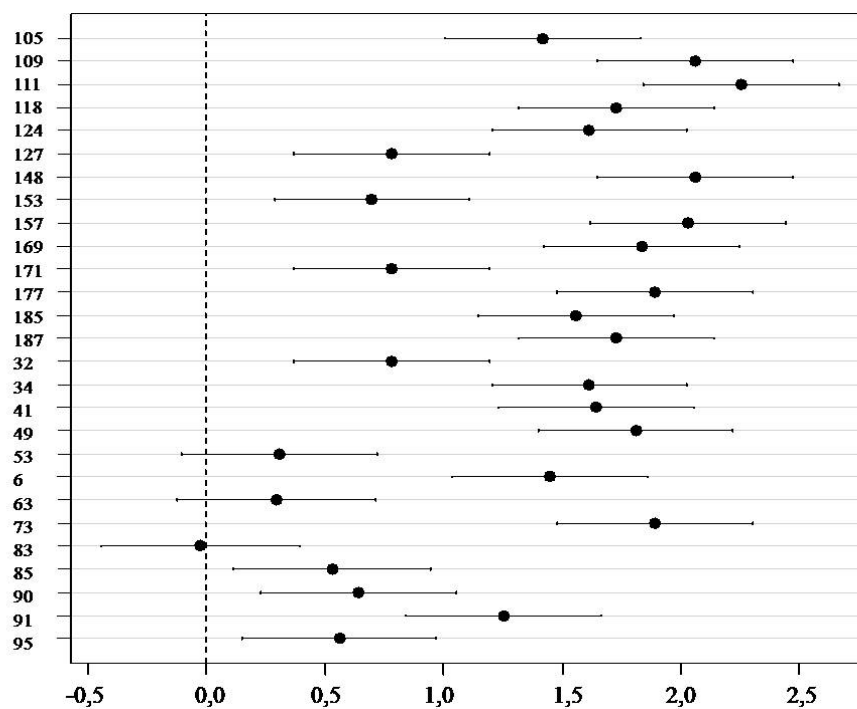


Figura 10 Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de carotenoides do genitor Verônica e de cada família  $F_{2,3}$  (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%)



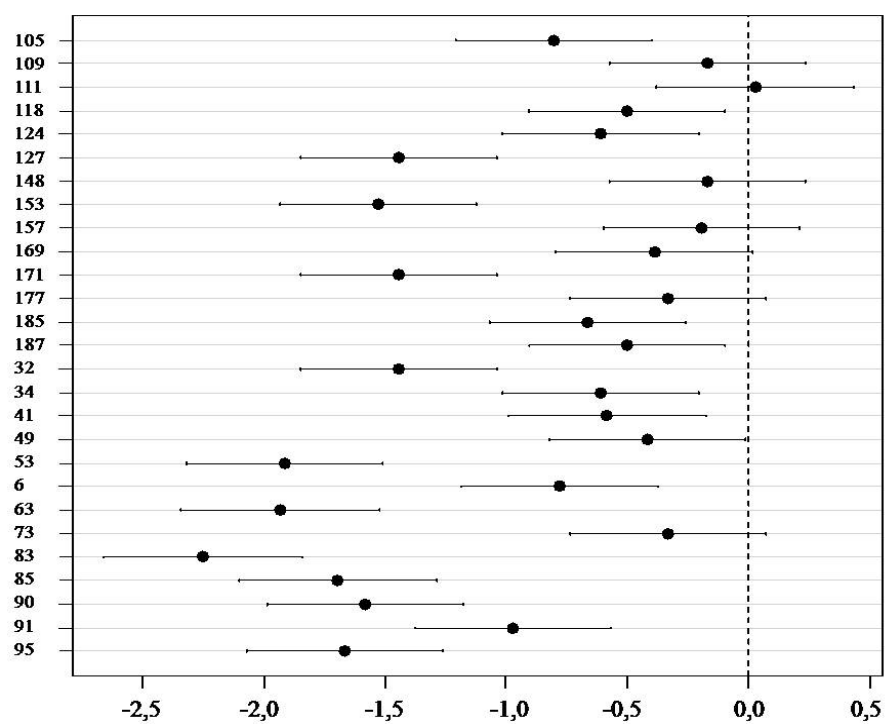


Figura 11 Intervalos de confiança de diferenças entre as médias dos teores de carotenoides do genitor Salinas 88 e de cada família  $F_{2:3}$  (Verônica x Salinas 88) (Dunnet, 95%)

Tabela 12 Frequências observadas e esperadas das progênies  $F_{2:3}$  quanto ao grau de homozigose. Lavras, UFLA, 2015

	Clorofila		Valor $X^2$
	FO	FE	
Homoz. para alto teor	8	6,75	0,93 ns
Segregantes	13	13,5	
Homoz. para baixo teor	6	6,75	
	Carotenoides		Valor $x^2$
	FO	FE	
Homoz. para alto teor	8	6,75	2,78 ns
Segregantes	9	13,5	
Homoz. para baixo teor	10	6,75	

Ns = não significativo; Homoz.= Homozigoto

Um ponto importante que se deve ressaltar no presente estudo é a possibilidade de se encontrar uma linhagem de alface com maior quantidade de carotenoides, pois, de acordo com Dufossé et al. (2005) e Fraser e Bramley (2004), o mercado de carotenoides, em 2004, foi estimado em 1 bilhão de dólares, sendo o  $\beta$ -caroteno responsável por 30% desse mercado. Contudo, parte desse composto é produzida por síntese química e pequena parte utiliza rota biotecnológica ou é extraído de fontes vegetais. Além disso, os carotenoides e, dentro deles, os  $\beta$ -carotenos e licopenos estão diretamente correlacionados com a atividade antioxidante. Isto pode ser afirmado considerando os estudos que demonstram que os carotenoides têm importante potencial antioxidante (STAHL; SIES, 2005), sendo os principais o licopeno (SHAMI; MORAIS, 2004) e o  $\beta$ -caroteno (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), os principais deles.

Assim, a possibilidade de se aumentar o teor de carotenoides em folhas de cultivares de alface comerciais, mediante o cruzamento com materiais com teores mais elevados, torna-se uma importante perspectiva para o melhoramento da alface com vistas à melhoria de sua qualidade funcional.

A possibilidade de seleção indireta de carotenoides por meio dos teores de clorofila é de grande importância, visto que facilitaria o trabalho de melhoristas, refletindo em economia de tempo e recursos.

Das 27 famílias  $F_{2,3}$  avaliadas, oito (F3-49, F3-73, F3-109, F3-111, F3-148, F3-157, F3-169, F3-177) foram consideradas promissoras, sendo classificadas como homozigotas para alto teor de clorofila e carotenoides, podendo ser utilizadas em novos programas de melhoramento visando o desenvolvimento de linhagens com altos teores de clorofila e carotenoides.

Além disso, altos valores de herdabilidade para as características de teor de carotenoides e de clorofila, associados ao controle genético predominantemente aditivo e ao efeito de um gene maior ou pelo menos em

segmentos cromossômicos, indicam a possibilidade de sucesso mediante a seleção de plantas que apresentam teores superiores.

Soma-se a isto a existência de alta correlação entre as duas características, o que pode facilitar o trabalho utilizando o critério de seleção de plantas para altos teores de clorofila.

## **5 CONCLUSÕES**

As características de teor de clorofila total e de carotenoides totais em folhas de alface são controladas por um gene maior com efeito predominantemente aditivo e poligenes de efeito menor.

Existe correlação entre as características de teores de clorofila e carotenoides em folhas de alface.

Altos valores de herdabilidade encontrados para as características de teor de clorofila e carotenoides em folhas de alface são de grande importância, pois permitem antever o sucesso com a seleção.

Altos teores de clorofila em folhas de alface podem ser utilizados como critério indireto para a seleção de plantas para alto teor de carotenoides.

## REFERÊNCIAS

AMARAL JÚNIOR, A. T. do et al. Inferências genéticas na produção e qualidade de tomateiro sob cruzamento dialélico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1407-1416, ago. 1999.

AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, mar./abr. 2006.

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2014. 463 p.

ARIAS, C. A. A.; TOLEDO, J. F. F.; YORINORI, J. T. An improved procedure for testing theoretical segregation in qualitative genetic studies of soybeans. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 291-297, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher - PNDS 2006**: dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança. Brasília, 2009. 300 p.

BRASIL, A. L. D.; MORAIS, M. G. Hipovitaminose A: prevalência, diagnose e tratamento. In: CARDOSO, A. L.; LOPES, L. A.; TADDEI, J. A. A. C. (Ed.). **Temas atuais em nutrição pediátrica**. São Paulo: Sociedade de Pediatria de São Paulo, 2007. p. 45-57.

CAETANO, L. C. S. et al. **A cultura da alface**: perspectivas, tecnologias e viabilidade. Niterói: PESAGRO-RIO, 2001. 23 p.

CARVALHO, F. I. F. et al. **Estimativas e implicações da herdabilidade como estratégia de seleção**. Pelotas: UFPel, 2001. 99 p.

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

CHANGJIAN, J.; XUEBIAO, P.; MINGHONG, G. The use of mixture models to detect effects of major genes on quantitative characters in a plant breeding experiment. **Genetics**, Berlin, v. 136, p. 383-394, 1994.

COMBS JUNIOR, G. F. Vitaminas. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. (Ed.). **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2002. p. 65-105.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, jan./mar. 2005. Verso da capa.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 378 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 p.

DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 16, p. 389-406, 2005.

ELBE, J. H. von. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. (Ed.). **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Wisconsin, 2000. p. 782-799.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, p. 39-45, 1991.

FARRARA, B. F.; ILOT, T. W.; MICHELMORE, R. W. Genetic analyses of factions for resistance to Downey mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 36, p. 499-514, 1987.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 402 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2003. 412 p.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO statistical yearbook**. Rome, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

FRANCO, C. **Tabela de composição química dos alimentos**. 8. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 227 p.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, p. 228-265, 2004.

FREITAS, J. A. et al. Inheritance of foliar zingiberene contents and their relationship to trichome densities and whitefly resistance in tomatoes. **Euphytica**, Wageningen, v. 127, n. 2, p. 275-287, 2002.

GAZZONI, D. L. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2003.

GERALDO, R. R. C. et al. Distribuição da hipovitaminose A no Brasil nas últimas quatro décadas: ingestão alimentar, sinais clínicos e dados bioquímicos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, p. 443-460, 2003.

GOMES, L. A. A.; MALUF, W. R.; CAMPOS, V. P. Inheritance of the resistance reaction of the lettuce cultivar 'Grand Rapids' to the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Euphytica**, Wageningen, v. 114, n. 1, p. 37-46, 2000.

GOTO, R.; TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: UNESP, 1998. 319 p.

GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids**. New York: V. N. Reinhold, 1991. 351 p.

HEINONEN, M. et al. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits and berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 37, p. 655-659, 1989.

HURTADO, S. M. C. et al. Clorofilômetro no ajuste da adubação nitrogenada em cobertura para o milho de alta produtividade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1011-1017, 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. **Dietary reference intakes: for vitamins A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Washington: National Academy, 2001. 797 p.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Valor da produção agropecuária no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/bancodedados.html>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

KLUGE, R. A. **LCB - 311, fisiologia vegetal:** apontamentos de aulas teóricas de fotossíntese. Piracicaba: ESALQ/USP, 2004. Disponível em: <<http://orion.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/gradOl/06fotoquimicadafotossintese/fotossinteseKluge>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

LEBEDA, A. et al. Lettuce (*Asteraceae; Lactuca* spp). In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement vegetable crops**. Boca Raton: CRC, 2007. v. 3, p. 377-472.

LEBEDA, A.; SCHWINN, F. J. The downey mildews: an overview of recent research progress. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berlin, v. 101, n. 3, p. 225-254, 1994.

LEE, D. W. Simulating forest shade to study the development ecology of tropical plants: juvenile growth in three vines in India. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 4, p. 281-292, 1988.

LEVY-COSTA, R. B. et al. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 530-540, ago. 2005.

LICHTENTHALER, H.; WELLBURN, A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, London, n. 603, p. 591-592, 1983.

LINDQUIST, K. On the origin of cultivated lettuce. **Hereditas**, Landskrona, v. 46, p. 319-350, 1960.

LOU, X. Y.; ZHU, J. Analysis of genetics effects of major genes and polygenes on quantitative traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 414-421, 2002.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980 p.

MALUF, W. R.; MIRANDA, J. E. C. de; CAMPOS, J. P. de. Análise genética de um cruzamento dialélico de cultivares de tomate: I., características referentes à produção de frutos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 4, p. 633-641, abr. 1982.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Introdução à genética biométrica**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1984. 242 p.



MELO, A. M. T.; MELO, P. C. T. Hiroshi Nagai (2003): sua vida e contribuição a olericultura. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 21, 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362002000400034&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362002000400034&script=sci_arttext)>. Acesso em: 18 fev. 2015.

MILAGRES, R. C. R. M.; NUNES, L. C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, Santa Maria, v. 12, p. 1253-1266, 2007.

MINOLTA CAMERA. **Manual for chlorophyll meter SPAD-502**. Osak, 1989. 22 p.

MIRANDA, J. E. C. de; MALUF, W. R.; CAMPOS, J. P. de. Análise genética de um cruzamento dialélico de cultivares de tomate: II., características vegetativas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 5, p. 767-773, maio 1982.

MODD, A. M.; GRAYBILL, F. A.; BOES, D. C. **Introduction to the theory of statistics**. 3<sup>rd</sup> ed. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha, 1974. 564 p.

MOU, B. Genetic variation of beta-carotene na lutein contents in Lettuce. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 130, p. 7, 2005.

NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistentes ao mosaico e ao calor: I-Brasil 48, 202 e 221. **Revista de Olericultura**, Campinas, v. 17, p. 129-137, 1979.

NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao mosaico e ao calor: Brasil-303 e 311. **Revista de Olericultura**, Campinas, v. 18, p. 14-21, jun. 1980.

OLIVEIRA, C. L. **Gene expression and bioavailability of carotenoids in lettuce (*Lactuca sativa*)**. 2015. 112 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

OLIVEIRA, F. L. et al. Produção e valor agroeconomico no consorcio entre cultivares de coentro e de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 184-188, abr./jun. 2005.

OLIVEIRA, V. R. **Diversidade genética em pimentão (*Capsicum annuum* L.) e controle gênico da tolerância ao baixo teor de fósforo no solo.** 1997. 108 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

OLSON, J. A. Vitamin A. In: MACHLIN, L. J. (Ed.). **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects.** 2<sup>nd</sup> ed. New York: M. Dekker, 1991. p. 1-57.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005.** Geneva, 2009. 57 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Nutrition for health and development: a global agenda for combating malnutrition.** Paris, 2000. 86 p.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre a alimentação saudável, atividade física e saúde.** Brasília, 2003. 60 p.

RAMALHO, A.; PADILHA, P.; SAUDERS, C. Análise crítica de estudos brasileiros sobre deficiência de vitamina A no grupo materno-infantil. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 392-399, 2008.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária.** 3. ed. rev. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária.** 4. ed. rev. Lavras: UFLA, 2008. 463 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMERMANN, M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro.** Goiânia: UFG, 1993. 271 p.

RAMALHO, R. A.; FLORES, H.; SAUNDERS, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 12, p. 117-123, 2002.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

REGHIN, M. Y. et al. Cultivo de alface com proteção de agrotêxtil em diferentes períodos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, jul. 2002. Suplemento.

RESENDE, F. V. et al. **Cultivo de alface em sistema orgânico de produção**. Brasília: EMBRAPA Hortaliça, 2007. 16 p. (Circular Técnica, 56).

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROCK, C. L. et al. Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 5, p. 913-916, May 1998.

RODRIGUEZ, E. B. et al. Phytochemicals and a functional foods: current situation and prospect for developing countries. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 1-22, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: CHARALAMBOUS, F. (Ed.). **Shelf life of foods and beverages chemical, biological, physical and nutritional aspects**. Amsterdam: Elsevier Science, 1993. p. 547-589.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Floresta, 2008. 100 p.

RODRIGUEZ AMAYA, D. B.; VALENTE SOARES, L. M. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin some Brazilian foods, utilizing a mult-toxin thin layer chromatographic method. **Journal Association of Analytical Chemistry**, Arlington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

RYDER, E. J. Breeding vegetable crops. In: \_\_\_\_\_. **Lettuce breeding**. Westport: AVI, 1986. p. 433-474.

RYDER, E. J. **Lettuce, endive and chicory**. Boca Raton: CAB, 1999. 208 p.

RYDER, E. J. A mild systemic reaction to lettuce mosaic vírus in lettuce: inheritance and interaction with an allele for resistance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, p. 814-818, 2002.

SALA, F. C. Melhoria genética de alface. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51., 2011, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: ABH, 2011. 1 CD-ROM.

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

SANDERS, D. C. **Lettuce production**. 2013. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/hil/hil=11>>. Acesso em: 9 set. 2014.

SANTOS, R. H. S. et al. Conservação pós-colheita de alface cultivada com composto orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 521-525, mar. 2001.

SCOPEL, W.; BARBOSA, J. Z.; VILELA, M. L. Extração de pigmentos foliares em plantas de canola. **UNOESC & Ciência - ACET**, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 87-94, jan./jun. 2011.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SCOTT, D. W. On optimal and data-based histograms. **Biometrika**, London, v. 66, n. 3, p. 605-610, 1979.

SHAMI, N. J. I. E.; MORAIS, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, p. 227-236, 2004.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

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

SILVA, W. P. **Estimadores de máxima verossimilhança em misturas de densidades normais**: uma aplicação em genética. 2003. 60 p. Dissertação (Mestrado em Experimentação Agropecuária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOMMER, A. **Guía práctica para la detección y el tratamiento**. 3. ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1995. 73 p.

SONNENBERG, P. E. **Olericultura especial**. 5. ed. Goiânia: UFG, 1985. v. 1, 187 p.

SOUSA, C. S. D. et al. Genetics divergences among lettuce genotypes by AFLP markers. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 11-16, 2007.

SOUZA, P. A. et al. Características químicas de alface cultivada sob efeito residual da adubação com composto orgânico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 754-757, jul./set. 2005.

SOUZA SOBRINHO, F. **Herança da reação de resistência à raça 2 de Meloidogyne incognita na pimenta Capsicum annum L. cv Carolina Cayenne**. 1998. 57 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity os carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 24, n. 6, p. 345-351, 2003.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1740, p. 101-107, 2005.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra Exserohilum turcicum pelo uso de Saccharomyces cerevisiae. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 1, p. 16-21, 1994.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 693 p.

TAVARES, M.; MELO, A. M. T.; SCIVITTARO, W. B. Efeitos diretos e indiretos e correlações canônicas para caracteres relacionados com a produção de pimentão. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 41-47, 1999.

THURMHAM, D. I. Bioequivalence of b-carotene and retinol. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 1, p. 13-39, 2007.

VECCHIA, P. T. D.; KIKUCHI, M. Glória: nova cultivar de alface lisa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 29, nov. 1989a.

VECCHIA, P. T. D.; KIKUCHI, M. Verônica: nova cultivar de alface crespa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 29-30, nov. 1989b.

VECCHIA, P. T. D.; KOCH, P. S.; KIKUCHI, M. Vera: nova cultivar de alface crespa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 171, jul. 1999.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

WHITAKER, T. W.; RYDER, J. E. **Lettuce production in the United States**. Washington: USDA, 1974. 43 p. (Washington Agriculture Handbook, 221).

WITHAM, F. H.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. M. **Experiments in plant physiology**. New York: D. V. Nostrand, 1971. 58 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. Geneva, 1995. (Technical Report Series, 854).