



EDUARDO ALVES DA SILVA

**GENÉTICA DA DISTRIBUIÇÃO QUANTITATIVA DE ANTOCIANINA
EM PLANTAS DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE ALFACE**

**SETE LAGOAS / MG
2017**

EDUARDO ALVES DA SILVA

**GENÉTICA DA DISTRIBUIÇÃO QUANTITATIVA DE ANTOCIANINA
EM PLANTAS DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE ALFACE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Clarete da Silva

Coorientadora:

Profa. Dra. Lanamar de Almeida Carlos

SETE LAGOAS / MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ, com
os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

S586g Silva, Eduardo Alves da.
Genética da Distribuição Quantitativa de
Antocianina em Plantas de População Segregante de
Alface / Eduardo Alves da Silva; orientador Ernani
Clarete da Silva; coorientadora Lanamar de Almeida
Carlos. -- Sete Lagoas, 2017.
48 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São João
del-Rei, 2017.

1. Lactuca sativa L.. 2. Compostos Bioativos. 3.
Fitoquímicos. I. Silva, Ernani Clarete da, orient.
II. Carlos, Lanamar de Almeida, co-orient. III.
Título.

EDUARDO ALVES DA SILVA

**GENÉTICA DA DISTRIBUIÇÃO QUANTITATIVA DE ANTOCIANINA
EM PLANTAS DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE ALFACE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Clarete da Silva

Coorientadora:

Profa. Dra. Lanamar de Almeida Carlos

Sete Lagoas, 28 de Agosto de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel - UFU

Profa. Dra. Leila de Castro Louback Ferraz – UFSJ

Prof. Dr. Ernani Clarete da Silva
Orientador

EPÍGRAFE

Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que
renunciar para conseguir.

(Dalai Lama)

DEDICATORIA

Aos meus queridos pais: José Francisco e Maria.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela vida, por me dar sabedoria, paciência e fôlego de vida a cada amanhecer.

Aos meus pais, pela força, incentivo a lutar pelos meus ideais, carinho e muito amor que me deram durante toda a minha vida pessoal e acadêmica.

Aos meus familiares por me ajudarem e me apoiarem.

Ao professor Ernani Clarete da Silva por me dar uma oportunidade, pela orientação, pelos conhecimentos passados a mim, pela amizade e a compreensão.

A professora Lanamar de Almeida Carlos pelo apoio e suporte no desenvolvimento deste trabalho, pela coorientação, amizade, ensinamentos e a compreensão.

A UFSJ por intermédio do Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias – PPGCA, por me proporcionar aprendizado técnico, científico e humano.

Aos meus amigos do Laboratório de Conservação de Alimentos pelo apoio, amizade e por proporcionar bons momentos juntos: Barbara, Joelma, Luciene, Adriana e Ana Cecília. E aos técnicos Edmilson e Luana.

E a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultura da Alface	3
2.2 Compostos Bioativos	4
2.2.1 Flavonoides	6
2.2.2 Antocianinas.....	6
2.3 Antocianina em Alface	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Localização e caracterização da área experimental.	10
3.1.1 Material	10
3.1.1.1 Primeiro Plantio.....	10
3.1.1.2 Segundo Plantio.....	11
3.1.1.3 Terceiro Plantio	12
3.2 Características avaliadas	13
3.2.1 Análise de Cor.....	13
3.2.2 Estimativa do tipo de herança responsável pelo controle dos componentes do caráter cor em follhas de alface.....	14
3.2.2.1 Estimativa de parâmetros genéticos	14
3.2.4 Herdabilidade no sentido amplo dos parâmetros	15
3.2.3 Quantificação do teor de Antocianinas	15
3.2.4 Quantificação do teor de Flavonoides.....	16
3.2.5 Correlação de Spearman.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	18
4.1 Análise de cor, Antocianinas e Flavonoides	18
4.1.1 Parâmetro Luminosidade	19
4.1.2 Parâmetro Ângulo Hue (Tonalidade)	21
4.1.3 Parâmetros a* e b*	23
4.3 Flavonoídes	28
5 CONCLUSÃO.....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

GENÉTICA DA DISTRIBUIÇÃO QUANTITATIVA DE ANTOCIANINA EM PLANTAS DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE ALFACE

RESUMO - A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça folhosa mundialmente consumida. Na sua constituição encontram-se vitaminas e minerais, além de compostos bioativos como os compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas. As antocianinas são responsáveis pela cor rubra das folhas e no organismo previne o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis pelo combate aos radicais livres. A alface por estar presente na dieta da população se torna um vegetal promissor quanto à biofortificação com a seleção de plantas com elevados teores de antocianinas. O presente trabalho teve como objetivo estudar geneticamente a distribuição quantitativa de antocianina em folhas de plantas de alface de uma população segregante F2. Foram analisadas geneticamente a cor, os teores de antocianinas e flavonoides, bem como a correlação da cor com o teor de antocianina e a herdabilidade destas características. Concluiu-se que a quantidade de antocianina em folhas de alface é comandada por mais de um gene com dominância parcial dos genes que conferem maiores teores. A coloração vermelha intensa pode ser usada como alternativa em programas de melhoramento de alface para identificação de genótipos superiores de alface com alto teor de antocianina. A segregação transgressiva assim como os altos valores de herdabilidade observados nas características estudadas permitirão selecionar em gerações segregantes, genótipos superiores de acordo com os objetivos propostos.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L; compostos bioativos; fitoquímicos.

GENETICS OF QUANTITATIVE DISTRIBUTION OF ANTOCIANINE IN ALFACE SEGREGANT POPULATION PLANTS

ABSTRACT - Lettuce (*Lactuca sativa L.*) is a leafy vegetable worldwide consumed. It is found in its constitution vitamins and minerals, as well as bioactive compounds, such as phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins. Since anthocyanins are responsible for the red color of the leaves and in the body prevents the appearance of non-communicable chronic diseases by the fight against free radicals. The lettuce for being present in the diet of the population becomes a promising plant for biofortification with the selection of plants with high levels of anthocyanins. The objective of the present work was to study the quantitative distribution of anthocyanin in leaves of lettuce plants of a segregating F2 population. The color, anthocyanin and flavonoid contents, as well as color correlation with anthocyanin content and the heritability of these characteristics. It was concluded that the anthocyanin content in leaves of lettuce is controlled by more than one gene with partial dominance of the genes that confer higher levels. Intense red coloration can be used as an alternative in lettuce breeding programs to identify superior lettuce genotypes with high anthocyanin content. Transgressive segregation as well as the higher heritability values observed in the studied traits will allow selecting in segregating generations, superior genotypes in accordance with the proposed objectives.

Keywords: *Lactuca sativa L.*; bioactive compounds; phytochemicals.

1. INTRODUÇÃO

A alface é uma hortaliça muito conhecida na culinária brasileira, e, segundo Coelho (2007), dentre as hortaliças folhosas, é a mais consumida. Além de ser parte da agricultura familiar, a alface é consumida nas refeições em forma de saladas, e também utilizada em redes de fast-food como ingrediente de sanduiche. A alface além de contribuir na alimentação com os aspectos nutricionais possui outros compostos em sua constituição química, os chamados compostos biativos. Esses compostos são fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas que têm basicamente como função principal a proteção contra a radiação ultravioleta (TAIZ e ZIEGER, 2009).

Quando ingeridos, esses compostos têm como principal função a atividade antioxidante e ainda surgem evidências que quando não ingeridos ou o seu déficit no organismo podem surgir alguns tipos de doenças crônicas. A alface possui variação tanto no formato das folhas de lisas a crespas, quanto na tonalidade, que pode variar de verde escuro, passando por tons verde-amarelados a coloração rubra. A cor característica rubra de algumas cultivares de alface se deve pela expressão de antocianinas e o seu armazenamento nos vacúolos das células. As antocianinas formam um grupo de pigmentos que dão coloração à maioria dos vegetais que variam do vermelho vivo ao violeta. Esse grupo de pigmentos está presente em diversas partes da planta, como caule, folha, flor, fruto entre outros. As antocianinas são classificadas como compostos biativos devido a sua atividade antioxidante (KRUGER et al., 2014).

Os antioxidantes em si, são substâncias as quais retardam reações de degradação oxidativa, ou seja, reduz a velocidade de oxidação de macromoléculas (lipídeos e proteínas), e combate principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROS). As antocianinas são descritas como poderosos antioxidantes, sendo que estas possuem propriedades às quais podem se citar: atividades anticarcinogênicas, antioxidantes e antivirais (FALCÃO et al., 2003). Atualmente a população busca inserir na dieta esses alimentos que além de nutritivos, também trazem benefícios à saúde. A alface também pode ser considerada um alimento funcional devido os seus constituintes, que na maioria deles tem atividade antioxidante que podem ser: carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas.

Por estar inserida na dieta da maior parte da população, essa hortaliça se torna promissora quanto a sua utilização como veículo de inserção de maiores quantidades de compostos de natureza funcional nos hábitos de consumo da população. Dessa forma o

aumento da ingestão de compostos bioativos, no caso antocianinas, gera indiretamente melhorias à saúde humana. Assim o desenvolvimento e seleção de cultivares de alface com altos teores de antocianinas se torna promissor para programas de melhoramento no ramo de biofortificação de alimentos. Entretanto, para esses programas, obtenham sucesso, há necessidade do conhecimento preliminar da herança genética do caráter para a escolha do melhor e mais viável método de melhoramento. Assim, o presente trabalho teve como objetivo, estudar geneticamente a distribuição quantitativa de antocianina em uma população segregante de plantas F2 de alface originadas do cruzamento entre parentais contrastantes quanto à coloração das folhas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta pertencente à família Asteraceae, bianual e considerada de ciclo curto para consumo em torno de 60 dias. Essa cultura teve provável origem em regiões de clima mais ameno no mediterrâneo. Desta espécie vegetal há vestígios encontrados no Egito de 4500 a.C (LINDQUIST, 1960) e como hortaliça é registrada a sua utilização desde 2500 a.C. (WITAKER e RYDER, 1974; GOTO e TIVELLI, 1998).

As plantas de alface possuem aspecto bem característico de crescimento vegetativo em que as folhas crescem em forma de roseta, em torno do caule, sendo lisas ou crespas, e coloração em vários tons de verde ou roxo, conforme a cultivar. O sistema radicular é muito ramificado e superficial, explorando principalmente os primeiros 25 cm do solo, especialmente quando a cultura é oriunda de mudas. Em semeadura direta, a raiz, que é pivotante, pode atingir até 60 cm de profundidade (FILGUEIRA, 2008).

A alface é uma planta herbácea, que durante a mudança de fase de crescimento vegetativo para o reprodutivo, ocorre o alongamento do caule e a planta cresce em altura. Nessa fase a planta perde qualidade sensorial tornando-se imprópria para o consumo devido ao acúmulo de látex nas folhas, gerando gosto amargo (SOUZA et al., 2008).

O tipo de inflorescência é em panícula que possui inúmeros botões florais denominados capítulos, que são constituídos de 10 a 25 floretes. O florete é composto por 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, dará origem a uma única semente, sendo que cada florete possui vários óvulos dando origem a várias sementes. A antese ocorre bem cedo pela manhã e cada florete se abre apenas uma vez, garantindo assim a autofecundação e conferindo à planta de alface a autogamia por cleistogamia (RYDER, 1999).

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

A alface é caracterizada por uma grande variedade de tipos: folhas lisas, folhas crespas, tipo repolhuda ou americana e romana e, quanto à cor, varia de verde-amarela a verde-escuro, e também de coloração púrpura (FILGUEIRA, 2008; HENZ e SUINAGA,

2009). Dentre as hortaliças folhosas, a alface esta entre as mais consumidas (BASLAM et al., 2013; PINTO et al., 2014; LOPEZ et al., 2014).

A distribuição e comercialização de hortaliças no país normalmente são realizadas por centrais de abastecimento, como as CEASA's (Central de Abastecimento S/A). No Estado de São Paulo, a Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), coordena os principais locais de escoamento da produção paulista e ainda é muito produzida na agricultura familiar. É uma espécie vegetal muito perecível no período de pós-colheita, pois em sua constituição existe, em torno de 96% de água (FRANCO, 1987; MARTINS, 2016), tornando essencial que o cultivo seja próximo aos centros consumidores.

Uma planta com 350g de massa fresca apresenta a seguinte constituição: 56 kcal, 95,8% de água, 2,3% de hidratos de carbono, 1,2% de proteínas, 0,2% de gorduras e 0,5% 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) (FRANCO, 1987 citado por CASSETARI et al., 2015). As folhas de coloração verde-escura, principalmente as externas, contêm 30 vezes mais vitamina A que as internas (FRANCO, 1987).

Cassetari et al. (2015), observaram que há correlação positiva entre o teor de clorofila nas folhas de alface e o teor de β -caroteno,

Além de contribuir com micronutrientes essenciais, a alface ainda possui compostos que não são de função nutricional estando os mesmos envolvidos em atividade antioxidante denominados compostos bioativos que geram benefícios à saúde como a prevenção do surgimento de doenças crônicas (KRUGER et al., 2014; ZHANG et al., 2015; KIM et al., 2016).

2.2 Compostos Bioativos

São fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, que estão relacionados com o sistema de defesa contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos (TAIZ e ZIEGER, 2009). Quando na dieta humana, esses compostos possuem outra função no organismo, como atividade antioxidante, combatendo os radicais livres. Esses radicais livres que podem ser espécies reativas de oxigênio (ROS) são agentes oxidantes que podem causar danos a algumas macromoléculas tais como: lipídeos, proteínas, DNA (ZHANG et al., 2015).

Os radicais livres são moléculas formadas naturalmente durante a respiração e a

digestão de alimentos e podem causar danos às macromoléculas das células, potencializando o surgimento de algumas doenças crônicas. São instáveis, pois a molécula possui um número ímpar de elétrons, necessitando assim atingir a estabilidade, para isso obtém os elétrons de outras macromoléculas. Entretanto, cada vez que uma espécie reativa “rouba” um elétron de uma proteína ou um lipídeo, por exemplo, essas biomoléculas sofrem transformações irreversíveis na forma e na função, pela perda de um elétron. Essas moléculas que sofreram transformação tornam-se um novo radical livre, e, portanto, uma espécie de reação em cadeia (SILVA et al., 2015). Dessa forma, os antioxidantes têm a função de combater a ação danosa de radicais livres. Em função disto, o consumo de alimentos que possuem os compostos bioativos com atividade antioxidante vem aumentando (HARBONNE e WILLIAMS, 2000; BASLAM et al., 2013). Em função também do conhecimento de que esses compostos bioativos têm atividade antioxidante, e estão ligados a prevenção do desenvolvimento de DCNT (Doenças Crônicas não Transmissíveis), como: doenças cardiovasculares, diabetes, catarata, alguns tipos câncer, hipertensão, doenças do sistema imune entre outras (ZHANG et al., 2015). Dentre os compostos bioativos existem os carotenoides, os compostos fenólicos, os ácidos orgânicos, vitamina C, os flavonoides que estão inclusos as antocianinas entre outros compostos (BIANCHI e ANTUNES, 1999; BASLAM et al., 2013; KIM et al., 2016).

Atualmente os programas de melhoramento de alface visam além de desenvolver cultivares produtivas, bem adaptadas aos ambientes e resistentes ou tolerantes a doenças, existe também o ramo visando o desenvolvimento de cultivares biofortificadas. A cultivar Uberlândia 10000 desenvolvida pela UFU (Universidade Federal de Uberlândia) teve o intuito de biofortificação, com a seleção de genótipos superiores com maior teor de carotenoides (SOUSA et al., 2007). Assim como a Cultivar de milho BRS 4104 foi lançado no mercado sendo uma cultivar com alto teor de carotenoides (EMBRAPA, 2013). Assim como os carotenoides, outro importante fitoquímico presente em alface, normalmente nas de coloração roxa, são as antocianinas (RYDER, 1999), que estão ligadas a atividade antioxidante e a prevenção de doenças cardiovasculares (KRUGER, et al, 2014).

Atualmente a população vem se tornando mais consciente em relação ao consumo de alimentos funcionais, em virtude do conhecimento dos benefícios que esses alimentos proporcionam ao organismo, não apenas por serem ricos nutricionalmente, mas também ricos em compostos bioativos (DE CARVALHO, 2006). Considerando-se os benefícios desse tipo de alimento, no caso alface rubra, uma dieta baseada nesse alimento funcional se torna uma estratégia segura para promover saúde e bem estar ao ser humano (SILVA, et al 2015).

Outra importante classe de compostos bioativos presentes na alface são os compostos fenólicos, os quais são relatados como os mais importantes compostos responsáveis por atividade antioxidante das plantas, com base na capacidade de doar átomos de hidrogênio para os radicais livres nas células (LÓPEZ et al., 2014). Essa classe abrange os ácidos fenólicos, especialmente os flavonoides e as antocianinas.

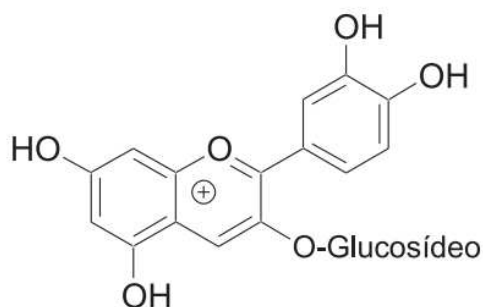
2.2.1 Flavonoides

São moléculas amplamente distribuídas nos vegetais, integrante do grupo dos polifenóis, os chamados compostos fenólicos. As moléculas são compostas de esqueletos carbônicos: C6–C3–C6, em geral podendo apresentar-se sob muitas variações, como flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas e chalconas. Nessa classe tendo maior importância a quercetina e as antocianinas. As principais atividades biológicas atribuídas a estes compostos bioativos são: atividade antioxidante, efeito protetor de capilares e efeitos inibitórios de tumores em vários estágios (PODSEDEK, 2007).

2.2.2 Antocianinas

As antocianinas (Figura 1) são polifenóis da classe dos flavonoides pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos. São substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais.

Figura 1 - Estrutura básica de uma antocianina (cianidina-3-glicosídeo)



Nas plantas as antocianinas possuem a capacidade de proteção das células contra a radiação solar, quando ingeridos, tem algumas funções como a de eliminar e estabilizar radicais livres, reduzir o oxigênio singlete, atuar nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (BIANCHI e ANTUNES, 1999; MALACRIDA e MOTTA, 2006, KRUGER et al., 2014).

Além da função de proteger as células, as antocianinas (das palavras gregas *anthos*,

flor e *kyanos*, azul), são pigmentos vegetais, que dão cor as plantas, que junto à clorofila, são os mais importantes grupos de pigmentos de origem vegetal (HARBORNE & GRAYER, 1988). As antocianinas são um grupo de pigmentos responsáveis por parte da cor observada na maioria das flores, frutos, folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982). Esse pigmento varia do vermelho vivo ao púrpuro, dependendo do pH (BROUILLARD, 1983). Por exemplo, a tonalidade, vermelho brilhante, é encontrada predominantemente em condições de pH ácido das células (SARNI-MANCHADO et al., 1996). São moléculas solúveis em água e sensíveis ao calor (SHAHIDI e NACZK, 1995) apresentando-se, na maior parte das vezes, glicosadas com açúcares aos quais, ajudam a manter a estabilidade da molécula de antocianina (FRANCIS, 1989).

Em muitos vegetais a cor é expressa de acordo com a relação do teor de clorofila e da ausência ou presença de antocianinas, e também varia com a quantidade deste fitoquímico nos vacúolos. Em alface a cor e a intensidade vermelha da folha variam com o teor de antocianina (RYDER, 1999). A variação do acúmulo de antocianinas nos vacúolos das células corresponde que quanto maior o teor, mais roxa é a folha, e quanto mais baixo o teor mais verdes são as folhas.

Falcão et al. (2003) cita alguns trabalhos que demonstram a relação desses pigmentos com a atividade anticarcinogênicas (KAPADIA et al., 1997; HAGIWARA et al., 2001), antioxidantes (WANG et al., 2000; YODIM et al., 2000) e antivirais (KAPADIA et al., 1997), e promovem associação destas propriedades aos alimentos que em sua constituição os contém. A citar como exemplo, o consumo de derivados de uva, principalmente o suco e o vinho e a farinha desidratada de casca de uva, é comumente relatado como benéfico à saúde pelo poder antioxidante proporcionado.

Renaud e De Logeril (1992) demonstraram haver uma correlação negativa entre volume de vinho diariamente consumido e o índice de mortalidade por insuficiência cardíaca. Alguns países cujo consumo de vinho é tradicional pelos habitantes, como França e Itália, apresentaram de dois a quatro casos de óbito por insuficiência cardíaca para cada 1000 homens, enquanto nos EUA, Canadá, Nova Zelândia, Austrália e Escócia, países de baixo consumo *per capita* de vinho, esses números ficam entre oito e dez.

Assim, por se mais consumida e mais aceita na dieta da brasileira essa cultura se torna promissora para receber incrementos de biofortificação. Os alimentos que são biofortificados normalmente são obtidos por melhoramento convencional de plantas, em que essas plantas são selecionadas e cruzadas entre si (ou autofecundadas) até que seja obtido cultivares com elevados teores. Sobretudo para a eficiência dos programas de seleção necessita de

conhecimento prévio de tecnologias e de estudos genéticos para o desenvolvimento de cultivares (RIOS et al., 2009).

2.3 Antocianina em Alface

Para programas que melhoramento que visam obter plantas com elevados teores de antocianinas o estudo sobre a herança genética é necessário. De acordo com o trabalho de Dupont et al. (2000), as antocianinas presentes em alface apresenta como pigmentos antociânicos majoritários, cianidina-3-glicosídeo e cianidina 3-O-[(6-O-malonil) glicosídeo]. A expressão de antocianina e o armazenamento deste pigmento no vacúolo controla a tonalidade das folhas.

Alguns trabalhos propõem a expressão dos genes que controlam a cor, como o trabalho clássico de Thompson (1938), citado por Ryder, (1999). Ele propôs que um par de genes complementário controla a presença ou ausência de antocianina (CcGg) e um sistema de alelos múltiplos controla a distribuição do teor na planta. Se o alelo dominante para cada gene complementário estiver presente, a coloração púrpura será expressa, em ausência de dominância em ambos os locus, haverá coloração verde, como pode ser observado pela tabela 1.

Além desse par de genes, existe outro gene que controla as variações na cor de acordo com o alelo presente. Este mesmo gene possui uma série alélica de 4 alelos (R, Rs, Rbs e Rt). Em que o alelo R confere uma pigmentação geral de vermelho sobre a superfície da folha; o Rs confere a formação de manchas (red-spotted) sobre as folhas e Rt= da coloração sobre a margem das folhas. Lindquist (1960) identificou outro alelo Rbs, para coloração vermelha, castanho avermelhado, bem como dois genes adicionais, *i* maximiza intensidade do vermelho e outro para redução da coloração com a idade da planta. Desses alelos que conferem a tonalidade há uma sequência de dominância da seguinte forma: R > Rs > Rbs > Rt.

Tabela 1: Combinações gênicas entre os três lócus de alelos.

Combinação gênica	Cor
C_ gg R*_	Verde
cc G_ R*_	Verde
C_ G_ R*_	Vermelha

*Com a combinação de duplo dominante gera coloração púrpura independente do alelo

Seguindo o que é demonstrado na tabela 1 pode se estimar entre o controle genético da cor em alface que: ocorre epistasia recessiva dupla, pois quando ocorre homozigose recessiva

em algum loco não ocorre a expressão da cor. Assim conclui-se como proposto por Ryder que a cor rubra é expressa pela síntese de antocianina, assim também não ocorre a expressão de antocianina.

O gene de antocianina em alface também é expresso em outras partes como no caule, botão da flor e pétalas florais. Sendo assim, esses genes controlam a cor em alface, mas como a cor também é controlada pela concentração de clorofila, então, a relação entre a concentração de antocianina e clorofila controla a cor das plantas.

Dessa forma, é importante saber se esses mesmos genes que controlam a cor, também controlam a concentração de antocianina nas folhas de alface.

Zhang et al. (2016) identificou 34 genes envolvidos na rota metabólica das antocianinas dando a entender o caráter quantitativo da expressão gênica não obedecendo a uma distribuição normal, tipo de Poisson.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e caracterização da área experimental.

Durante a execução do experimento parte foi desenvolvido em áreas da Universidade Federal de São João del - Rei, Campus Sete Lagoas, outra parte em área urbana no município de Sete Lagoas, estando o mesmo localizado na Região Sudeste do país, Latitude 19° 27' 57" S e Longitude 44° 14' 48" W, altitude de 761 m acima do nível do mar e área de 539 km².

Predomina, segundo a classificação de Köppen, clima Cwa, temperado úmido. A estação chuvosa vai de outubro a março e a de estiagem vai de abril a setembro com índice médio pluviométrico anual de 1403 mm. A maior parte da área apresenta vegetação típica dos cerrados, com relevo plano a levemente ondulado.

3.1.1 Material

Para a realização do estudo, dois genótipos de alface contrastantes quanto a cor foram utilizados: um genótipo de coloração verde-clara e de folhas crespas, a cultivar Cristal, e outro genótipo experimental de coloração vermelha bem intensa e de folhas crespas (Rubra) (Figura 2).

Figura 2: Parentais Rubra e Cristal.



3.1.1.1 Primeiro Plantio

Consistiu no plantio dos parentais escolhidos anteriormente no dia 13/10/2015. Assim foram semeados em bandejas de isopor de 128 células e acondicionados em sala climatizada a

20°C por dois dias, visto que temperaturas superiores a 30°C ocasiona baixa taxa de germinação (NASCIMENTO, 2002) e conduzidos posteriormente em casa de vegetação até 30 dias do semeio.

Após 30 dias do semeio as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de cinco litros preenchidos com terra adubada e esterco. Os genótipos foram conduzidos até o florescimento em um total de 10 vasos para cada genótipo os quais foram utilizados no cruzamento, onde foram obtidas as sementes F1.

Para obtenção de sementes F1, foi realizado o cruzamento entre os dois parentais, de acordo com a metodologia de despolinização por jato de água proposta por Nagai (1980). O parental de cor rubra foi usado como parental masculino sendo doador do gene marcador relativo à cor rubra da folha. O genótipo de cor verde foi usado como parental feminino. As flores do parental feminino ainda em estágio de botão, bem cedo logo antes da antese, foram emasculadas. A emasculação consistiu da retirada total da parte masculina para evitar a autopolinização. Em seguida, cada botão floral foi lavado com o auxílio de uma piceta com água para a retirada de pólen remanescente. Após, observou-se o crescimento dos estigmas de cada flor emasculada. Antes da bifurcação dos estigmas que aconteceu após o crescimento máximo dos mesmos foram polinizados manualmente. A polinização consistiu do esfregamento de flores abertas do parental masculino nas flores emasculadas caracterizando a transferência manual do pólen. Todas as flores polinizadas manualmente foram marcadas com uma lã colorida. As sementes foram colhidas durante o mês de fevereiro subsequente no parental feminino e denominadas sementes de cruzamento ou semente putativas F1 (Cristal x Rubra).

3.1.1.2 Segundo Plantio

As sementes putativas F1 que foram colhidas anteriormente, foram semeadas no dia 19/03/2016, em bandejas de isopor conforme feito no plantio anterior com os parentais. Após a germinação e emergência, as plântulas que não apresentaram coloração púrpura nas folhas foram eliminadas já que foram caracterizadas como sementes de autofecundação provenientes dos cruzamentos que não foram efetivos. Aos 30 dias do semeio essas plântulas, aptas ao transplantio, foram transplantadas para vasos (Figura 3) conforme feito nas fases anteriores e conduzidas até a produção de sementes. As sementes provenientes destas plantas, agora denominadas F2 foram colhidas entre julho e agosto de 2016. Todas essas etapas foram conduzidas nas dependências da UFSJ – Campus Sete Lagoas em telados e casa de vegetação.

Figura 3: Híbrido F1(Cristal x Rubra).



3.1.1.3 Terceiro Plantio

As sementes F2 colhidas das plantas F1 foram semeadas juntamente com sementes F1 e os parentais (Cristal e Rubra) em bandejas de isopor de 128 células em novembro de 2016 e conduzidas em casa de vegetação até o momento do transplântio que se deu aos 30 dias do semeio. Após, as plântulas aptas ao transplântio foram levadas para quatro canteiros localizados na horta urbana do bairro Montreal em Sete Lagoas. Foram conduzidas 200 plantas F2, agora denominada população segregante, concomitantemente com plantas F1 e os parentais (Figura 4). Essas populações distintas foram conduzidas com todos os tratamentos culturais e fitossanitários de acordo com o recomendado para a cultura da alface.

Aos 30 dias após o transplântio das mudas quando as plantas apresentavam porte comercial, foram colhidas, identificadas de acordo com a população e transportadas para o Laboratório de Conservação de Alimentos, onde foram submetidas às análises laboratoriais.

Figura 4: População segregante (F2) originada do cruzamento Rubra x Cristal na área de plantio.



*Fitas e os CD's azuis foram utilizados para evitar a herbivoria de pássaros.

3.2 Características avaliadas

3.2.1 Análise de Cor

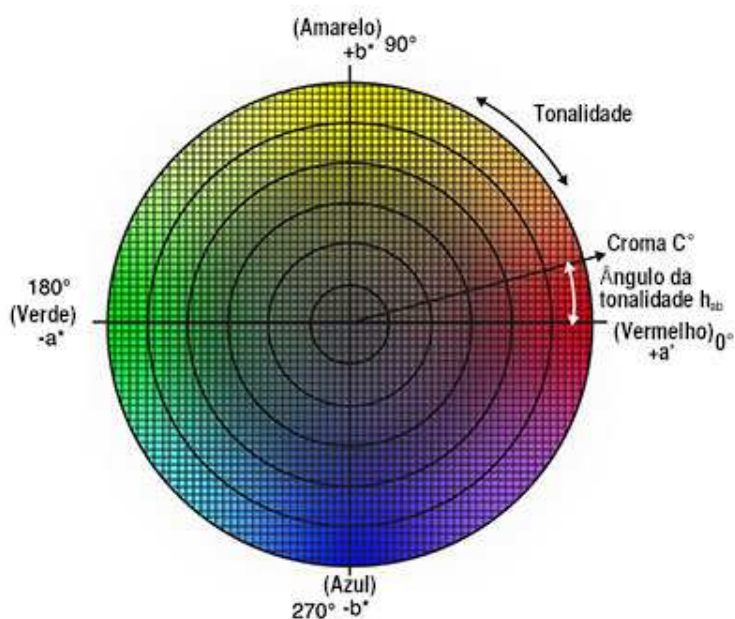
A análise da cor foi realizada com colorímetro da marca Konica Minolta 410 onde utilizou-se a classificação proposta pela CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), a CIE L^*C^*h em que: L^* = Luminosidade, C^* = Chroma e h =ângulo Hue e CIE $L^*a^*b^*$ em que L = Luminosidade; a^* = coordenada vermelho/verde (+a indica vermelho e -a indica verde) e b^* = coordenada amarelo / azul (+b indica amarelo e -b indica azul).

Valores de luminosidade correspondem que quanto mais se aproxima de zero mais escura é a cor da folhagem, visto que valor igual a zero é o mínimo de luminosidade (preto absoluto), e valores que se aproximam de 100 são cores mais claras, maior luminosidade (branco absoluto) e o valor médio de 50 que é cinza (Konica, 2017).

O valor de Hue (ângulo de tonalidade) mensura apenas a posição no diagrama de cores (Figura 5), ou seja, essa característica serve apenas para classificação quanto a posição da planta nos quadrantes. As variáveis a^* e b^* são metodologias alternativas em relação a variável ângulo hue para a classificação de cores. Em ambos os eixos, valores positivos e negativos apenas indicam a direção em que a cor deve ser classificada. Em a^* , valores crescentes positivos indicam que a superfície analisada, neste caso a superfície da folha, se aproxima mais da

tonalidade vermelha, e valores mais negativos se aproximam da tonalidade verde. Em b^* analisa a variação da cor que quanto mais positivo, mais amarela é a superfície, e quanto mais negativo, mais azul. Ambas as classificações são bastante semelhantes, pois ambas utilizam o mesmo diagrama de cores (Figura 5).

Figura 5: Diagrama de classificação de cores do modelo CIE.



Fonte: Konica (2017)

As análises de cor foram feitas no laboratório logo após a colheita onde foram utilizadas três folhas de cada planta para se obter os padrões de cor para cada um dos genótipos avaliados.

3.2.2 Estimativa do tipo de herança responsável pelo controle dos componentes do caráter cor em follhas de alface

3.2.2.1 Estimativa de parâmetros genéticos

As estimativas das variâncias das populações P_1 , P_2 , F_1 , e F_2 foram obtidas através da análise multivariada utilizando-se o software estatístico Genes (CRUZ, 2013) para obtenção das variâncias genética (V_G) e ambiental (V_E), da variância fenotípica (V_P), e da herdabilidade no sentido amplo (h^2_a), conforme expressões:

$$V_G = (V_F) - (V_E)$$

$$V_G = \frac{(VP1+VF1+VP2)}{3}$$

$$(V_{F2}) = (V_E + V_G)$$

$$h^2a = \frac{(V_G)}{(V_G) + (V_E)}$$

Em que:

VP1 = estimativa de variância entre plantas dentro da cultivar P₁ (Rubra);

VP2 = estimativa de variância entre plantas dentro d cultivar P₂ (Cristal);

VF1 = estimativa da variância entre plantas dentro da geração F1 (Rubra X Cristal);

VF2 = Estimativa de variância dentro da população de plantas F2;

h²a = herdabilidade no sentido amplo;

Com os pressupostos de Ramalho et al. (2012) que estimam o tipo de interação alélica dos parâmetros estudados, se é interação alélica aditiva, dominância parcial ou sobredominância. Assim considerando o modelo ao qual se faz a estimativa da interação gênica, o modelo considera que “**a**” seja o valor da distância entre: a média da soma dos parentais até os extremos, e “**d**” seja o valor ao qual a F1 se distancia da média. Dessa forma, **d**=0, conclui-se que não há dominância e a interação alélica é aditiva, sendo que **d** = **a**, ocorre interação de dominância completa, caso $0 < \mathbf{d} < \mathbf{a}$ ocorre dominância parcial, ocorrendo que **d** > **a** há sobredominância.

3.2.4 Herdabilidade no sentido amplo dos parâmetros

Esta estimativa foi feita utilizando-se os valores de variância ambiental e variância genética encontrados nas populações F1, F2 e parentais gerados no campo. A estatística foi feita utilizando o pacote estatístico do programa GENES.

3.2.3 Quantificação do teor de Antocianinas

A análise para a quantificação do teor de antocianinas foi feita com base na metodologia proposta por Francis (1982), que além de gerar dados do teor de antocianina também pode gerar os dados de flavonoides. Para a mensuração do teor de antocianina utilizou espectrofotômetro da marca FENTO, utilizando-se nessa metodologia, comprimento de onda para o cálculo da fórmula, em que: 535nm para quantificar antocianinas totais. Os resultados foram obtidos através da fórmula abaixo e expressos em miligramas de (flavonoides ou antocianinas) /100g de amostra fresca.

Fórmula: Teor de antocianinas e flavonoides:

$$T \text{ (mg /100g de amostra fresca)} = \frac{Abs * Fd}{98,2}$$

Onde:

Abs= Absorbância;

Fd= X = Fator de diluição.

O fator de diluição é obtido utilizando o peso da amostra (0,5g) dividida pelo volume de diluição (25mL). O resultado foi correlacionado para 1mL (quantidade de g que tem em 1mL da solução) e determinou-se assim a quantidade de mL em 100g. Resultado expresso em mg/100g de amostra fresca.

3.2.4 Quantificação do teor de Flavonoides

Para mensurar o teor de flavonoides utilizou-se o mesmo método de quantificação de antocianinas, mas para a leitura no espectrofotômetro, realizou-se a leitura a 374 nm.

3.2.5 Correlação de Spearman

Coeficiente de correlação de Spearman (**r**) é definido como um método associativo que compara a relação de duas amostras, considerando que a mensuração seja ordinal (LIRA, 2004).

Fórmula: Cálculo de Correlação de Spearman

$$\rho = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{n^3 - n}$$

Onde:

ρ é o Coeficiente de Correlação de Spearman;

d_i é a diferença entre as ordenações;

n é o número de pares de ordenações.

Segundo Bauer (2007), o coeficiente de correlação de Spearman se baseia na classificação ordinal de duas variáveis em X e Y para estimar um valor de relação entre as variáveis. O coeficiente de correlação é o resultado de um método estatístico que mede a relação entre duas variáveis (X e Y). A correlação é estimada no intervalo de -1 a 1, em que correlações perfeitas são de valor de igual a -1 e 1, o valor negativo indica que a correlação entre as amostras é inversamente proporcional, enquanto o valor positivo que está em

sincronia perfeita, o valor negativo também é uma sincronia perfeita, mas inversa. Um valor intermediário (0) indica que não existe relação alguma entre as amostras.

Para avaliar o valor encontrado de “**r**” algumas classificações são propostas. De acordo com Callegari-Jacques (2003) para classificar os valores de “**r**” encontrados quanto a relevância existe o modelo abaixo.

- Valores entre $0,0 < r \leq 0,3$, existe correlação linear fraca;
- Entre $0,3 < r \leq 0,6$, existe correlação linear moderada;
- Entre $0,6 < r \leq 0,9$, existe correlação linear forte;
- Entre $0,9 < r < 1,0$, existe correlação linear muito forte;
- Valor de $r = 1,0$ existe correlação linear plena ou perfeita.

Uma classificação diferente é proposta em que: $r = 0,10$ até $0,30$ (fraco); $r = 0,40$ até $0,60$ (moderado); $r = 0,70$ até 1 (forte). (DANCEY e REIDY 2005 citado por FILHO e JÚNIOR, 2009). Esses valores também podem ser utilizados para avaliar a correlação negativa.

As análises foram realizadas com uso do programa GENES (2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise de cor, Antocianinas e Flavonoides

Nota-se que a cultivar cristal obteve os maiores valores entre as características (com exceção de a*) entre os três genótipos, na característica Luminosidade, pois detém maior valor de L (Luminosidade) o que indica uma planta verde, de cor mais clara (Tabela 2). Martins (2016) trabalhando com as mesmas cultivares encontrou dados semelhantes para luminosidade, com valor médio de L= 52,88 para a cultivar Cristal e L=23,20 para a cultivar Rubra. Outro valor próximo é o de Moura (2016) que obteve valor médio de L para a cultivar Cristal de 57,50.

Tabela 2: Valores médios dos parâmetros analisados.

Cultivar	L	Hue°	(a*)	(b*)	Antocianinas**	Flavonoides**
Cristal	53,23	106,29	-7,80	26,70	12,64	80,60
Rubra	36,09	54,26	4,52	6,27	106,49	295,88
Híbrido F1	45,51	93,71	-1,35	16,39	45,30	177,78

L= Luminosidade; Hue=Ângulo de tonalidade do diagrama de cores; a*= eixo horizontal do diagrama de cores; b* eixo vertical do diagrama de cores.

**Valores expressos em mg/100 gramas de amostra.

O híbrido F1 sempre esteve em posição intermediária a dos parentais (Tabela 2). Portanto não há dominância completa para nenhum dos parâmetros analisados, uma vez que para ser considerado, dominância completa, o híbrido F1 deve ter valor médio igual ao maior parental (RAMALHO et al., 2012).

Com os dados obtidos no presente estudo (Tabela 2), e seguindo os pressupostos de Ramalho et al., (2012) pode se estimar o tipo de interação alélica dos parâmetros estudados. Sendo assim possível verificar a interação alélica em cada caso (Tabela 3), sendo que possa existir interação aditiva, dominância parcial ou sobredominância.

Tabela 3: Parâmetros de interação alélica para as variáveis analisadas.

Parâmetros de interação alélica						
	L	Hue	a*	b*	Antocianinas	Flavonoides
a	8,57	26,02	6,16	10,22	46,93	107,64
d	0,85	13,44	0,29	-0,09	-14,27	-10,46
GMD**	0,10	0,52	0,05	-0,01	-0,30	-0,10

**Grau Médio de dominância (d/a).

Não ocorreu interação alélica aditiva para nenhum dos parâmetros analisados, visto que nenhum valor de “**d**” foi igual ao de “**a**” (Tabela 3). Estima-se que ocorra interação alélica de dominância parcial, visto que os valores de “**d**” são maiores que zero e menores que “**a**”, com exceção de **b***, antocianinas e flavonoides. Os valores de **GMD** (Tabela 3) maior que zero mostra interação alélica de dominância parcial, sendo que quanto mais próximos de zero menor é o grau de dominância e valores mais próximos de 1, maior é o grau de dominância.

4.1.1 Parâmetro Luminosidade

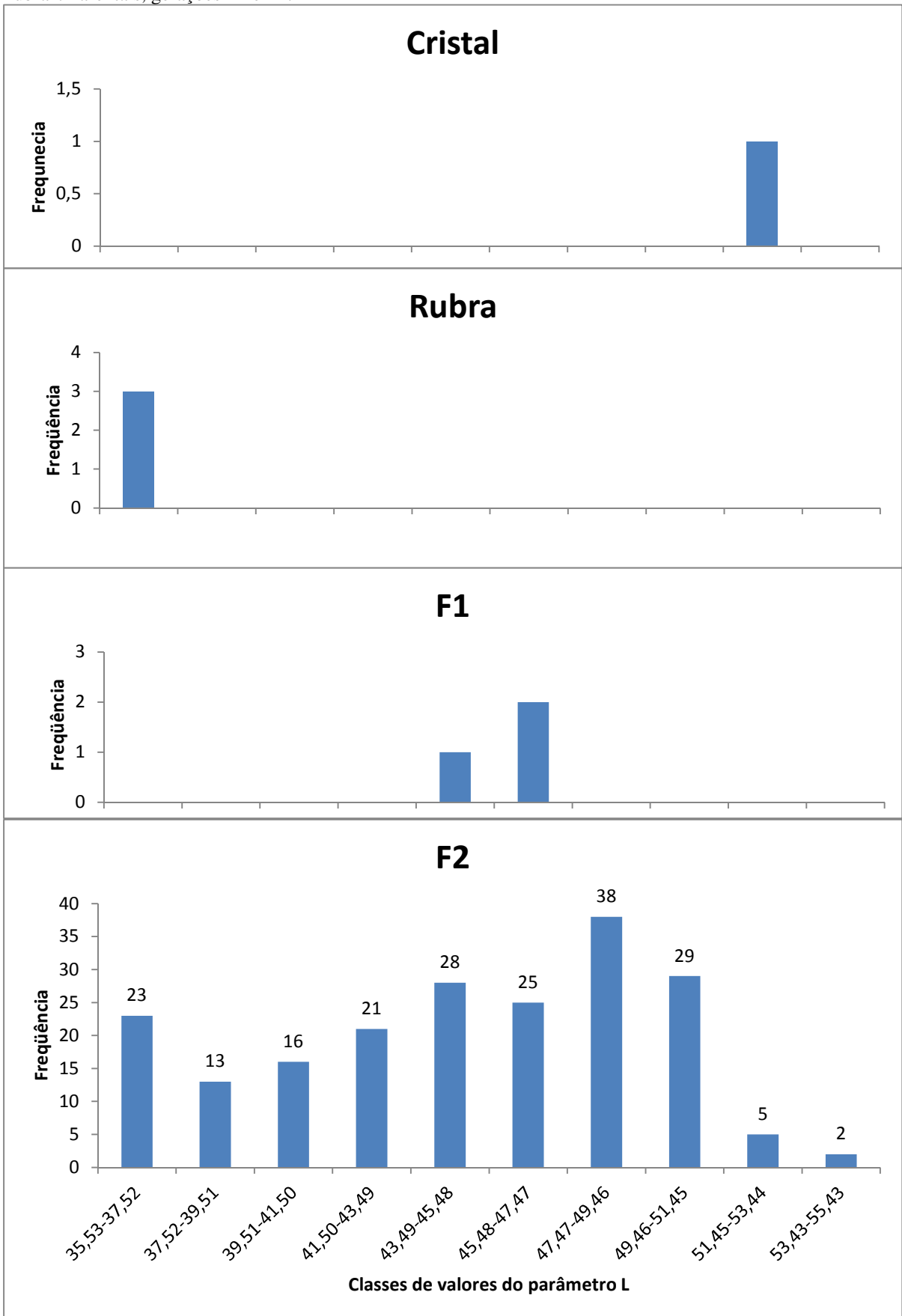
Para o caráter luminosidade encontrou o valor da variância fenotípica de 23.77, o valor da variância ambiental obtido de 1.2 e valor de 22.57 para variância genotípica. Como os parentais são contrastantes, estes ficaram nas classes mais extremas (Figura 6).

A segregação das plantas F2 abrangeu desde o menor valor de L, 35,53; até o valor extremo de 55,43. Considerando as plantas F2 da população, estas se encontram com distribuição variável. É possível identificar um número relativamente maior de plantas nas classes mais altas (Figura 6), corroborando os dados da tabela 3 que mostra dominância parcial do caráter. Assim a geração segregante tende a ter mais plantas semelhantes a cultivar Cristal devido à dominância parcial.

E observado segregação transgressiva para esse caráter, devido que há valores extremos aos quais são maiores que a cultivar Cristal e valores menores que a cultivar Rubra. Entre as plantas da geração F2 (segregante) houve quatro plantas com valores de L acima da cultivar Cristal, e outras 7 plantas alcançaram valor de L menor que a cultivar rubra, ou seja, mais escuras.

A herdabilidade desse caráter foi estimada em 95% o que favorece programas de melhoramento para a seleção de plantas com mais brilho em populações segregantes de alface, pelo método genealógico.

Figura 6 -. Distribuição de frequência para o parâmetro Luminosidade em alface do cruzamento “Cristal x Rubra”. Parentais, gerações F1 e F2.



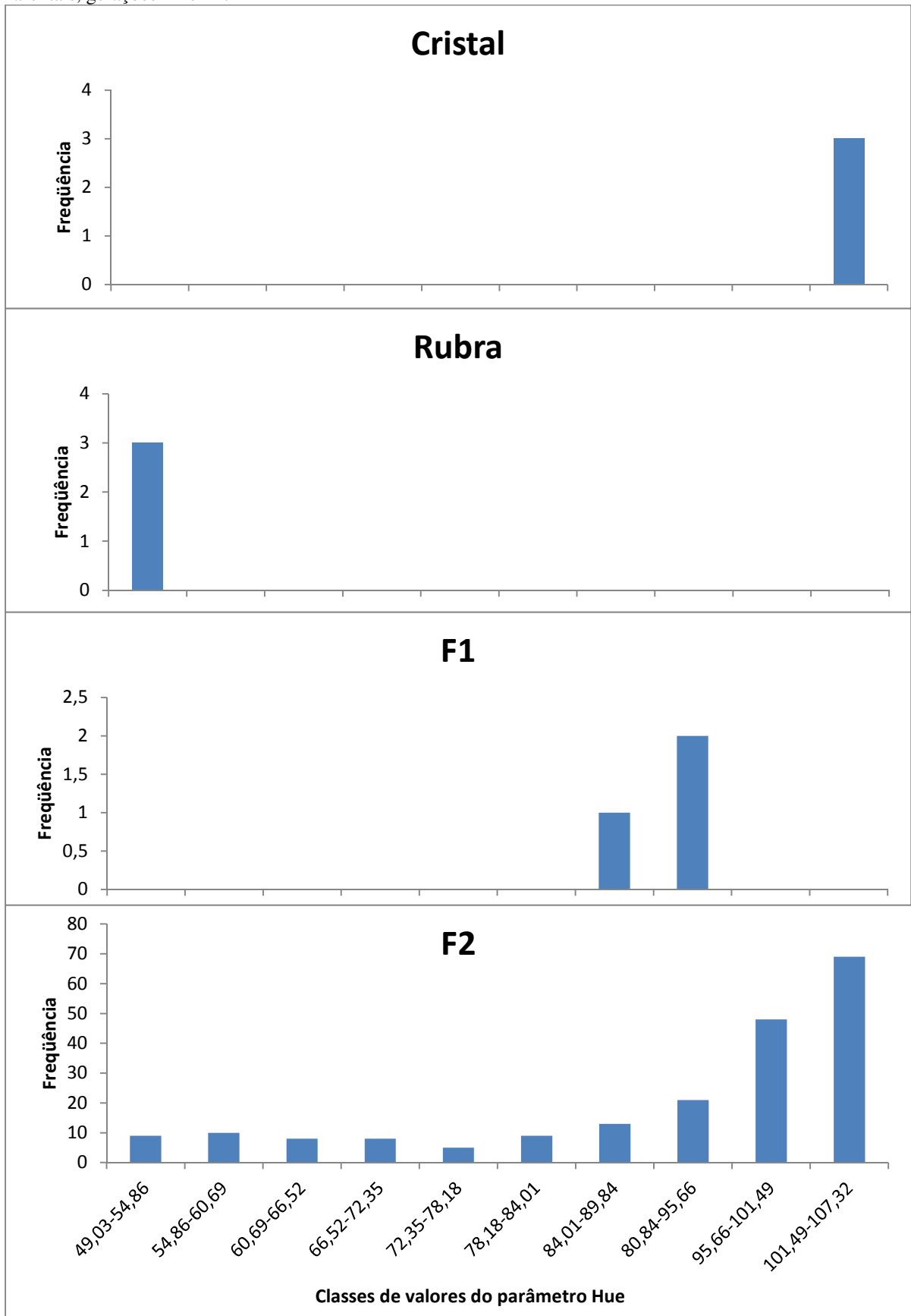
4.1.2 Parâmetro Ângulo Hue (Tonalidade)

O ângulo de tonalidade (ângulo Hue) na geração segregante (F2) abrange valores entre 49,03° a 107,3°. Gazula et al. (2007) trabalhando com 12 variedades de alface de tons de verde a vermelho escuro obtiveram variação do ângulo de tonalidade de 6,59° a 133,18°. A cultivar Cristal obteve valor médio do ângulo de tonalidade (Hue) de 106,29° valor que compreende uma região entre o verde e o amarelo (90° tendência a amarelo), a cultivar Rubra se encontra em posição intermediária a vermelha (0°) e a amarela (90°) com valor de ângulo Hue de 54,25°.

De acordo com a Tabela 3 ocorre dominância parcial para este caráter, pois os valores de **GMD** indica alto valor do grau de dominância (Figura 7). Isso justificaria o número maior de plantas nas classes de altos valores, semelhantes a cultivar Cristal. Contudo, essa suposição está errada, pois a coloração rubra é parcialmente dominante em relação a coloração verde (RYDER, 1999). Justifica-se essa afirmação é o fato do teor de antocianinas controlar a coloração e nesse trabalho foi constatado a existência de algum tipo de dominância da cor roxa em relação a cor verde. Assim, estima que esse parâmetro indique uma conclusão inversa da realidade observada em relação ao tipo de interação alélica da cor.

Para esse caráter observou-se valor de variância fenotípica de 279,10% o que pode ser explicado devido que o ângulo Hue é a característica que expressa a cor, e houve contraste entre os parentais as cores na geração F2 do cruzamento tenha uma grande variabilidade de genótipos diferentes. A herdabilidade desse caráter foi de 99%, o que facilita para programas de melhoramento para esta característica, viabilizando a seleção em população segregante. Oito plantas foram identificadas com valor menor que a cultivar rubra, indicando segregação transgressiva para esse caráter.

FIGURA 7. Distribuição de frequência para o parâmetro Hue em alface do cruzamento “Cristal x Rubra”. Parentais, gerações F1 e F2.



4.1.3 Parâmetros a* e b*

De acordo com os dados obtidos e considerando apenas os valores de a* (eixo a*), as plantas abrangeram os padrões de cores que variam do vermelho (valores positivos) ao verde (valores negativos), com variação entre -7,8 a 4,82 (Figura 8). Considerando que os valores de b* encontrados são apenas valores positivos, conclui-se que os genótipos se enquadram apenas nos dois primeiros quadrantes do diagrama de cor, ou seja, verde, passando por tons de amarelo até o vermelho (Figura 5).

Os valores de a* e b* são intimamente ligados, pois é necessário o valor de ambos para padronizar a cor de uma determinada superfície. Como são grandezas inversamente proporcionais, à medida que uma aumenta a outra diminui (se $a^*=0$; $b^*=90$ ou se $a^*=90$; $b^*=0$). Considerando a frequência dos valores de a* é observado que há uma leve tendência de um número maior de plantas semelhantes a cv. Cristal. Isso sugere que a cor roxa tem dominância sobre a cor verde, porém com baixo grau de dominância (Tabela3).

Valores de b* mostra que houve uma distribuição com uma ligeira tendência ao extremo positivo, como o esperado por existir dominância parcial e pelos valores do **GMD**, “a” e “d” (Figura 9).

Visto que os valores de “a” e “d” classificam o tipo de interação gênica, para o parâmetro “a*” do colorímetro, conclui que há dominância parcial da coloração rubra em relação a verde. Considerando o valor do **GMD** de “a*” observou-se que ocorreu baixo grau de dominância parcial. Em relação ao parâmetro “b*” não foi possível afirmar que ocorreu dominância parcial em virtude do baixíssimo valor do **GMD**, pois valor igual a zero indica interação alélica aditiva.

Figura 8 - Distribuição de frequência para o parâmetro a^* em alface do cruzamento “Crystal x Rubra”. Parentais, gerações F1 e F2.

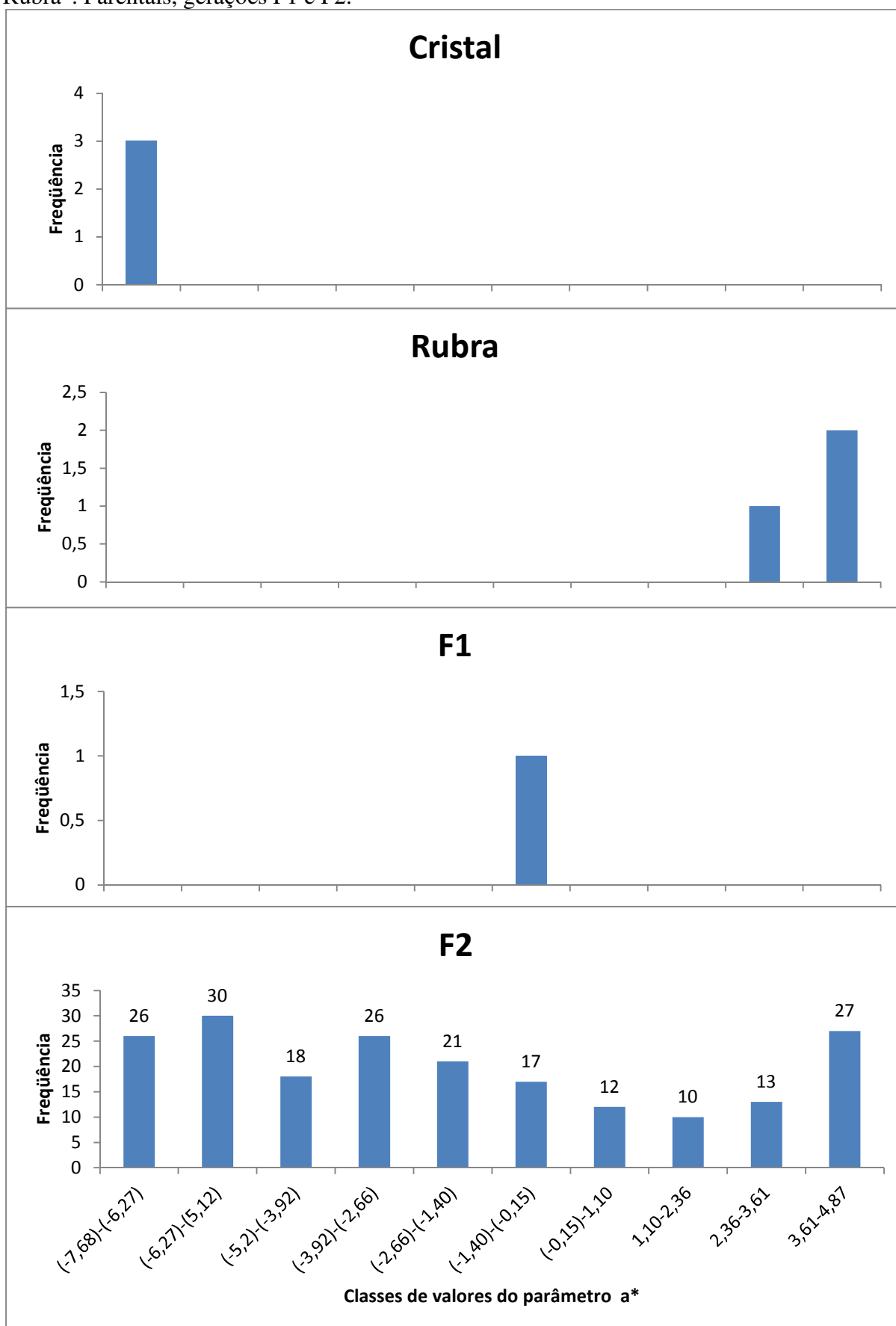
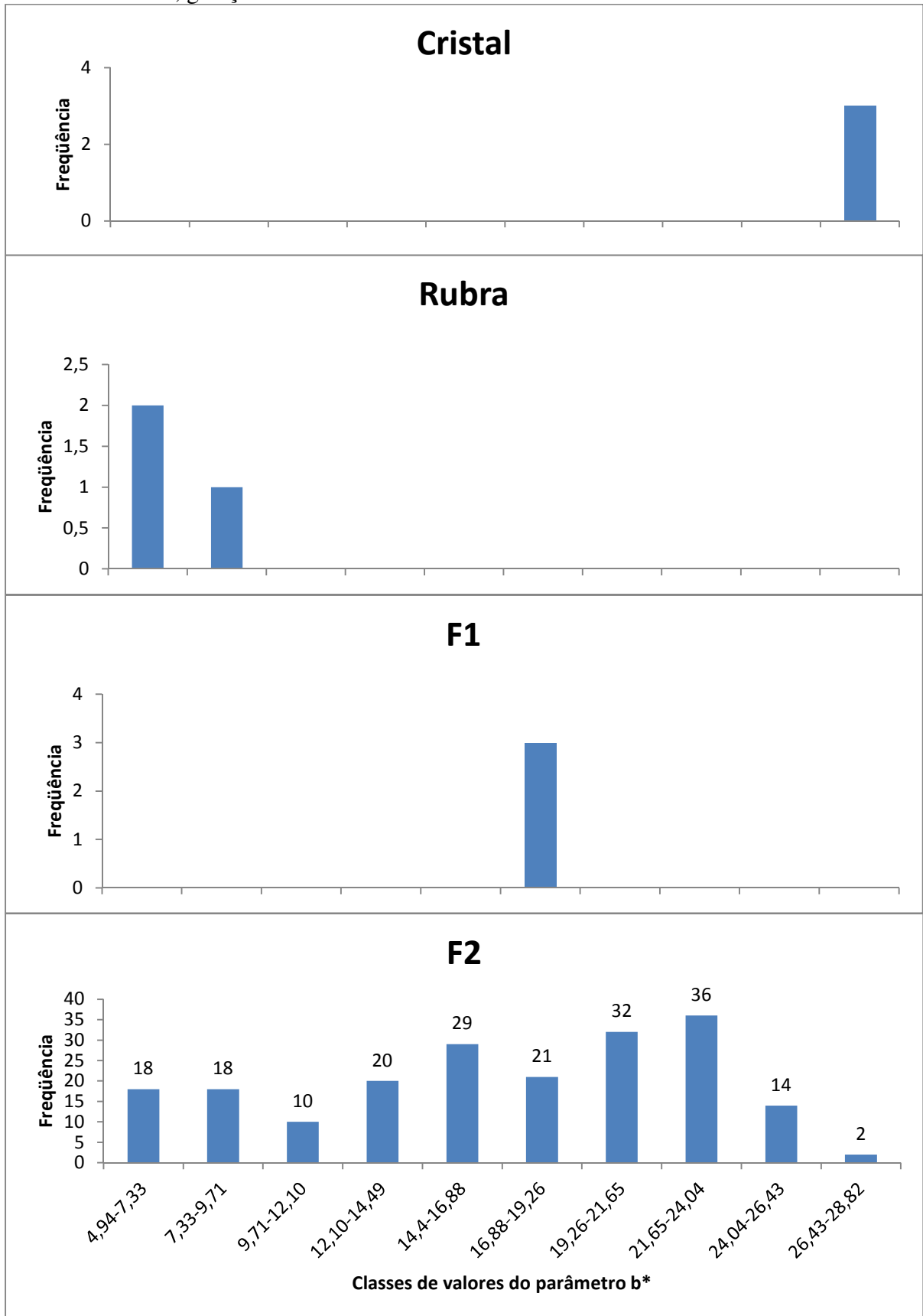


Figura 9 - Distribuição de frequência para o parâmetro b^* em alface do cruzamento “Cristal x Rubra”. Parentais, gerações F1 e F2.



4.2 Antocianinas

Observou-se na segregação da população F2, uma distribuição diferente da distribuição normal de Poisson (Figura 10) para os quantitativos de antocianina nas folhas. Provavelmente isso aconteceu devido à atuação de mais de um gene sobre o caráter com diferentes intensidades (RYDER, 1999).

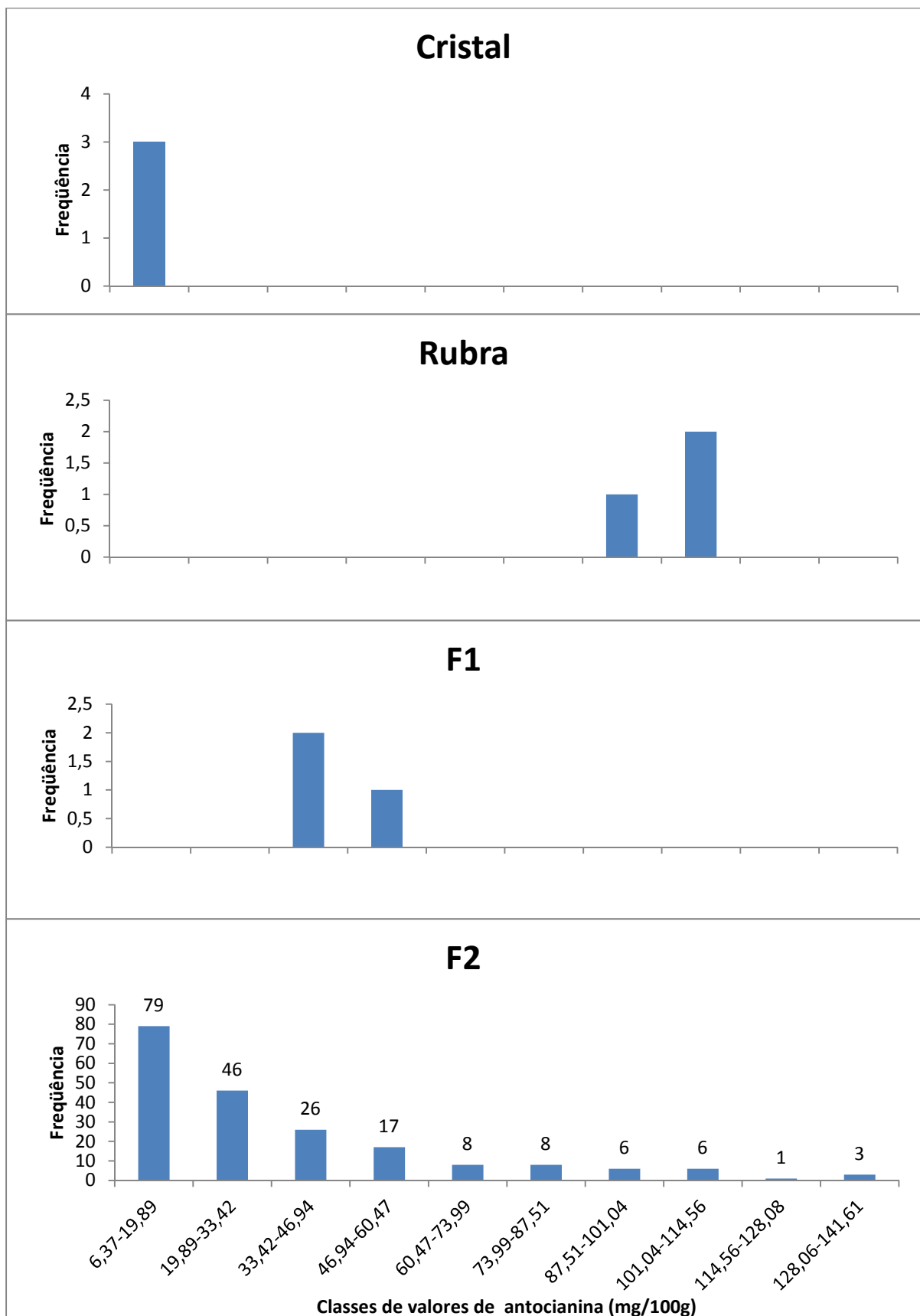
Em relação ao híbrido F1 (Figura 10 e Tabela2) observou-se que o teor de antocianina ficou intermediário entre os parentais com ligeira superioridade em relação ao parental de cor verde, indicando dominância parcial do caráter.

A distribuição entre as classes houve forte tendência nas classes de menor teor, ou seja, mais plantas com baixo teor de antocianina nas folhas, corroborando os dados do ângulo Hue que também indicaram uma polarização maior de plantas semelhantes ao parental cv. Cristal (Menor teor de antocianina, com 12,64mg/100g). Os teores (F2 segregante) variaram entre 6,37 a 141,68 mg/100g de amostra fresca. Essa distribuição anormal nesse caráter é indicada pela interação alélica de dominância parcial, sendo justificados pelos valores de “a”, “d” e **GMD** (Tabela 3).

O interessante que foi constatado teor de antocianina mesmo em uma cultivar verde (Cv. Cristal com 12,64mg/100g) semelhante ao encontrado por Gazula et al (2007) com teor semelhante, próximo de 13,5 mg/100g. Uma possível justificativa para que tenha antocianina na alface verde mesmo sem expressar visualmente a cor roxa, é que ocorra a expressão de antocianina, mas o valor expressado seja baixo que tem sua coloração mascarada por outros pigmentos de coloração verde.

No presente trabalho a cultivar Rubra obteve o teor de antocianinas de 106,49 mg/100 de amostra fresca (Tabela 2). Llorach et al (2007) analisando em HPLC encontraram em outras duas variedades de alface roxa baixo teor de antocianinas totais (25,9 e 45,6 mg antocianinas totais /100g de amostra fresca). Rosa et al (2014) avaliaram plantas de alface (Cv. Mimoso Roxa) em dois sistemas de cultivo e encontraram valores médios entre 36,89 a 88,24 mg/100g de amostra fresca. Gazula (2007) obteve valor máximo de 49,3mg de antocianinas totais/100g de amostra fresca. Tal diferença entre os trabalhos pode ser explicada pelo fato de o teor de antocianinas variar conforme a cultivar, a luminosidade, a época do ano, estresse hídrico, temperatura entre outros. (SIVANKALYANI et al., 2016).

Figura 10- Distribuição de frequência, médias e variâncias para teores de antocianinas em alface do cruzamento “Cristal x Rubra”. Parentais, gerações F1 e F2.



Foi observado segregação transgressiva na população F2, em que oito plantas foram identificadas com valores de antocianinas totais maiores que o parental masculino (Cv Rubra), coincidentemente o mesmo número de plantas que tiveram valor de tonalidade (ângulo hue) menor que o parental masculino, ou seja, mais vermelhas.

Os histogramas de antocianina e de ângulo hue são semelhantes, com uma ligeira diferença na polarização dos valores, que em ângulo Hue estão polarizados nas classes mais altas, e em antocianina nas classes mais baixas (Figuras 7 e 10). Isto ocorre porque a variação na cor da folha é influenciada pela variação do teor de antocianina nas folhas.

Análises identificaram que este caráter possui herdabilidade no sentido amplo de 54,9%, indicando que é uma característica herdável, sendo indicados métodos de seleção de plantas individuais como pedigree. A variância fenotípica com valor de 982,45, variância ambiental 442,70, variância genotípica de 539,74.

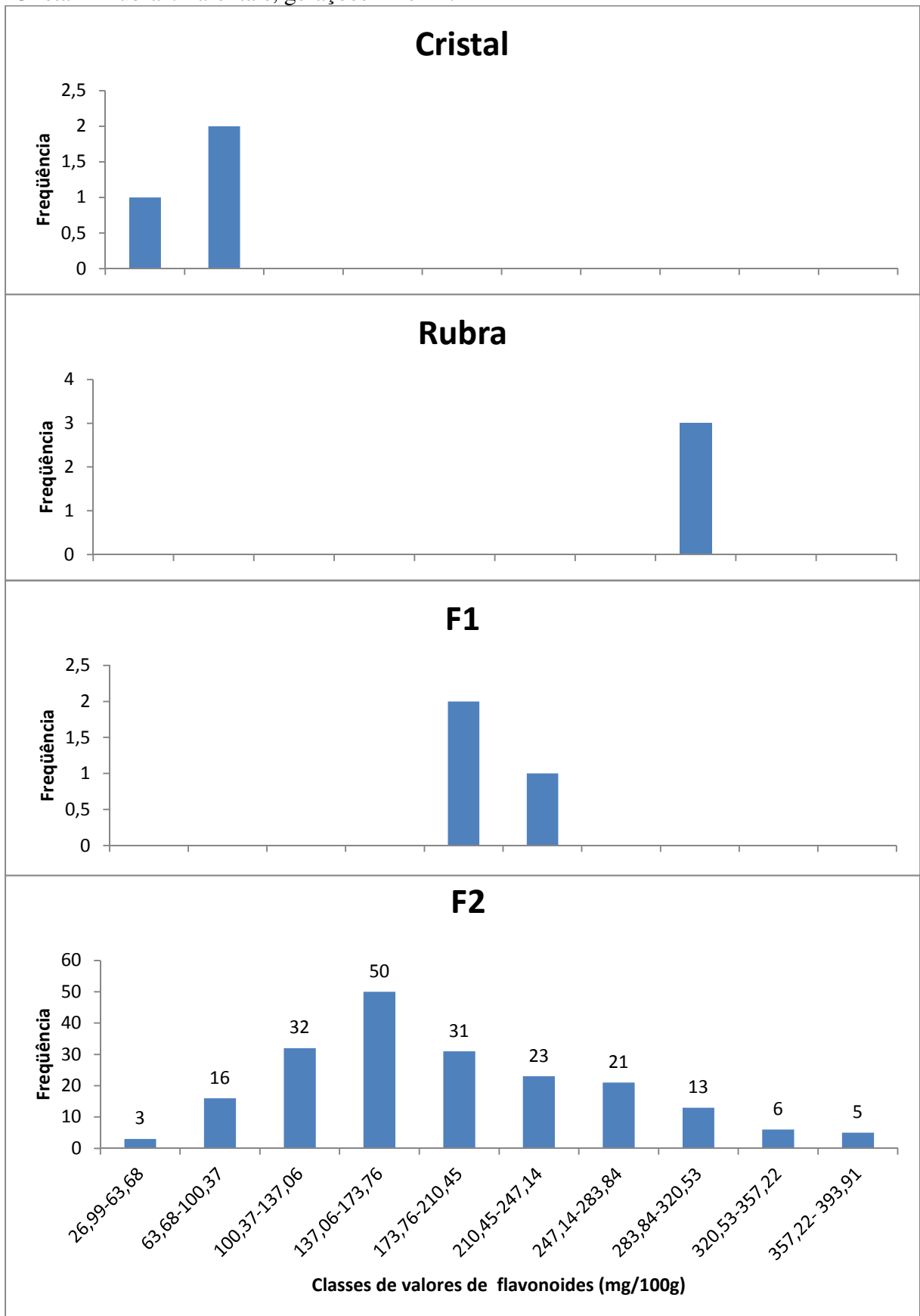
4.3 Flavonoídes

Observou-se na população segregante (F2) teores de flavonóides variando de 26,99 a 393,91mg de flavonoides totais/100g de amostra fresca (Figura 11). Os flavonóides que são tipos de metabólitos secundários no qual as antocianinas estão presentes obtiveram uma segregação diferente das antocianinas. Houve uma distribuição próxima a normal tipo Poisson, com ligeira tendência para as classes de menor teor de flavonoides (Figura 11). Como também pode ser observado que a maioria dos genótipos da população (F2) ficou abaixo da média. A distribuição foi seguindo o esperado de acordo com os valores de “a” “b” e **GMD** (Tabela 3) sendo isso explicado devido a ocorrência de dominância parcial para esse caráter da cv. Rubra sobre a cv. Cristal.

Essa discrepância entre a segregação das duas características (Flavonoides e Antocianinas) mesmo que uma está incluída na outra, pode ser explicado pelo fato desta classe ter identificado no mínimo oito compostos (BILYK e SAPERS, 1985; HERTOOG et al, 1992; FERRERES et al, 1997; CROZIER et al, 1997; DUPONT et al, 2000; NICOLLE et al, 2004).

Dentre os genótipos da população F2 avaliados, 19 foram identificados com valor de flavonoides totais superiores ao da Cv. Rubra indicando segregação transgressiva para esse caráter. Ainda foi constatado que os genótipos tanto de menor teor de antocianina quanto os de maiores, não necessariamente são os mesmos que têm menos e mais flavonoides.

Figura 11- Distribuição de frequência para teores de flavonoides em alface do cruzamento “Cristal x Rubra”. Parentais, gerações F1 e F2.



Dessa forma a classe dos flavonoides provavelmente está sendo influenciada por mais genes do que a classe das antocianinas explicando assim a diferença entre as frequências observadas. Esse caráter teve variância fenótipo de 5801,39; variância ambiental 986,38; variância genotípica 4815,01; herdabilidade 82,99.

Tabela 4- Valores de variâncias, e herdabilidade das variáveis estudadas na população segregante F2 (Rubra x Cristal).

Variável	Variância fenotípica	Variância Genotípica	Variância ambiental	Herdabilidade
L	23,77	22,57	1,2	94,95
Hue	280,82	279,73	1,08	99,61
a*	15,16	15,03	0,127	99,1
b*	36,55	1,64	34,9	95,4
Antocianinas	982,45	539,74	442,7	54,93
Flavonoides	5801,39	4815,01	986,38	82,99

A maioria das características é de alta herdabilidade (Tabela 4). As características de alta herdabilidade favorecem programas de melhoramento, pois fazem com que a seleção seja mais efetiva em gerações segregantes e possam ser selecionadas plantas em etapas iniciais de melhoramento.

4.4 Estudo de correlação

Na tabela 5 estão os valores de correlação entre os parâmetros analisados neste experimento.

Em relação aos valores de “r” observou-se que o maior valor de correlação ($r=-0,82$) com antocianina foi o ângulo Hue e “a*”, mas com valor negativo para Hue. Portanto, quanto maior o teor de antocianina menor será os valores do ângulo de tonalidade (Hue), ou seja, mais vermelha será a planta de alface. Seguindo o mesmo raciocínio valores do eixo a* indicando as cores entre verde e vermelho, teve valor de correlação alto e positivo ($r=0,820$). Visto que os valores do eixo de a* e b* estão intimamente ligados, como previsto, o valor de correlação entre eles teve valor de “r” alto, igual a -0,962. De tal forma que o valor de correlação de “a*” e antocianina foi alto e positivo e quando se compara os valores de antocianina e b* são altos e negativos.

Tabela 5- Valores de correlação de Spearman entre os parâmetros estudados.

Variáveis			r
L	X	a*	-0,946
H	X	a*	-0,987
L	X	Antocianina	-0,780
H	X	Antocianina	-0,821
a*	X	Antocianina	0,820
b*	X	Antocianina	-0,784
a*	X	b*	-0,962
L	X	Flavonoides	-0,578
H	X	Flavonoides	-0,575
a*	X	Flavonoides	0,578
b*	X	Flavonoides	-0,576
Antocianina	X	Flavonoides	0,746

Ainda é observado que o teor de antocianina interfere diretamente na luminosidade das folhas, pois como observado a correlação entre as duas variáveis é forte e negativa. Portanto quanto maior o teor de antocianina, mais escura é a folhagem da planta de alface. A relação entre o teor de antocianina e flavonóides nas plantas pode ser constatado que houve discrepância quanto à frequência observada na população (Figuras 10 e 11), assim o valor de correlação entre estas duas variáveis foi forte (0,74) considerando que as antocianinas estão presentes na classe dos flavonóides.

Mou (2005) sugeriu que altos teores de carotenóides em alface podem ser selecionados indiretamente por meio de seleção para maior teor de clorofila ou coloração verde. Dessa forma facilita o trabalho dos melhoristas, em função da maior praticidade e do menor custo quando comparados os métodos de quantificação. Neste caso pode selecionar plantas pelos valores de cor atribuídos por colorímetro. Portanto considerando que correlação alta e positiva/negativa entre características de interesse permitem que se faça uma seleção indireta, mediante a utilização de metodologias alternativas mais simples e de menor custo.

5 CONCLUSÃO

A quantidade de antocianina em folhas de alface é comandada por mais de um gene com dominância parcial dos genes que conferem maiores teores.

A coloração vermelha intensa pode ser usada como alternativa em programas de melhoramento de alface para identificação de genótipos superiores de alface com alto teor de antocianina.

A segregação transgressiva assim como os altos valores de herdabilidade observados nas características estudadas permitirão selecionar em gerações segregantes, genótipos superiores de acordo com os objetivos propostos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASLAM, M.; MORALES, F.; GARMENDIA, I.; GOICOECHEA, N. Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. **Scientia Horticulturae**, v.151, 2013 103-111.

BAUER, L. **Estimação do coeficiente de correlação de spearman ponderado**. 2007. 95p. Dissertação (Mestrado em Medicina: Epidemiologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, p.123-130. 1999.

BILYK, A.; e SAPERS, G. M. (1985). Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish and red cabbage tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, 226–228.

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

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CASSETARI, L. S.; GOMES, M. S.; SANTOS, D. C.; SANTIAGO, W. D.; AANDRADE, J.; GUIMARAES, A. C.; GOMES, L. A. β -carotene and chlorophyll levels in cultivars and breeding lines of lettuce. **Acta horticulturae**, 2015.

COELHO, K. S. **Perfil do consumidor de hortaliças frescas e processadas no município de Campos do Goytacazes-RJ**. 2007. (Tese de mestrado)- Universidade Estadual do Norte Fluminense – Campos do Goytacazes.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacultura brasileira. **Horticultura Brasileira** 2005 v. 23 (Artigo de capa).

CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; McDONALD M. S.; BLACK, C., Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 45: p. 590–595, 1997.

CRUZ, C. D. **GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics**. Acta Scientiarum. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DE CARVALHO, P. G. B.; MACHADO C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira** v. 24: 397-404. 2006.

DUPONT, M. S.; MONDIN, Z.; WILLIAMSOM, G.; PRICE, K. R. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** :3957-3964. 2000.

FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; LUIZ, M. T. B. Copigmentação intra e intremolecular de antocianinas: uma revisão. **CEPPA**, v. 21: 351-366. 2003.

FERRERES, F.; GIL, M. I.; CASTANER, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 45: 4249–425, 1997.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: **Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV. 402p, 2008.

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

FRANCIS, F. J. Food Colorants: anthocyanins. **Food Science and Nutrition**, 28: 273-314. 1989.

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

FILHO, D. B. F.; JÚNIOR, J. A. S. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson. **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, 2009.

GAZULA, A.; KLEINHENZ, M. D.; SCHEERENS, J. C.; LING, P. P. Anthocyanin levels in nine lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars: Influence of planting date and relations among analytic, instrumented and visual assessments of color. **HortScience** v. 42: p. 232–238 . 2007.

GOTO, R.; TIVELLI, S. W. 1998. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo, Fundação Editora da UNESP, 1998. p. 15-30.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, K.; NAKANISHI, T.; SANA, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N, SHIRAI, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP)- associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v. 171, p. 17-25. 2001.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochem**, Oxford, v.55, p. 481-504.

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

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. A. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 40:p. 1591–1598, 1992.

EMBRAPA, 2013 - <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/960382> Data de acesso: 17/08/2017.

KONICA, 2017 - <http://sensing.konicaminolta.com.br/2015/08/compreendendo-o-espaco-decor-cie-lch/> Data de acesso: 17/04/2017.

KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H. I.; WASHINA, A.; NISHINO, H, Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, v. 115, p. 173-178, 1997.

KRUGER, M. J.; DAVIES, N.; MYBURGH, K. H.; LECOUR, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research. International**. 2014, v. 59, p. 41–52.

KIM, M. J.; MOON, Y.; KOPSELL, D. A.; PARK, S.; TOU, J. C.; WATERLAND, N. L. Nutritional value of crisphead ‘Iceberg’ and romaine lettuces (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural Science**, v. 8 n. 11, 2016.

LINDIQUIST, K.B. In the origin of cultivated lettuce. **Hereditas, Lund**, v.46, p.319-350, 1960.

LIRA, S. A. **Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações**. Curitiba, 2004. 196p. (Dissertação mestrado). Setores de Ciências Exatas e de Tecnologia, UFPR.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food chemistry**, v. 108, p. 1028-1038. 2008.

LÓPEZ, A.; JAVIER, G. A.; FENOLL, J.; HELLÍN, P.; FLORES, P. Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 33, p. 39-48, 2014.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 59-82. 2006.

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

MARTINS, L. M. **Cultivares de alface produzidas em três sistemas de produção**. 2016. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade Federal de São João Del Rei Sete Lagoas, 2016.

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.

MOURA, L. O. **Estimativa de pigmentos em alface cultivadas em diferentes sistemas de produção com base na espectrometria**. 2016. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade Federal de São João Del Rei Sete Lagoas, 2016.

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

NASCIMENTO, W. M. Geminação de sementes de alface. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2002. 10 p. (**Embrapa - Hortaliças. Circular Técnica, 29**).

NICOLLE, C.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J. L.; ROCK, E.; MICHEL, H.; REMESY C. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa folium*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n.15, 2004, 2061-2069.

PINTO, E.; ALMEIDA, A. A.; AGUIAR, A. A.; FERREIRA, I. M. Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa L.*) growth: Influence of soil composition. **Food chemistry**, v. 152, p. 603-611, 2014.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science Technology**, v. 40, p. 1-11, 2007.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na Agropecuária** 5.ed ver. – Lavras: Ed.UFLA, 2012. 566p.

RENAUD, S. e De LOGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet** v. 339: p. 1523-1526, 1992.

RIOS, A.; ALVES, K. R.; COSTA, N. M. B.; MARTINO, H. S. D. Biofortificação: culturas enriquecidas com micronutrientes pelo melhoramento genético. **Revista Ceres**, v. 56, p. 713-718, 2009.

ROSA, A. M., SEÓ, H. L. S., VOLPATO, M. B., FOZ, N. V., SILVA, T. C. D., OLIVEIRA, J. L. B., e OGLIARI, J. B. Production and photosynthetic activity of Mimosa Verde and Mimosa Roxa lettuce in two farming systems. **Revista Ceres**, v. 61n. 4, p. 494-501, 2014.

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

SARNI-MANCHADO, O. S; FULCRAND, H; SOUQUET, J.M; CHEYNIER V e MOUTOUNET, M; Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. **Journal of Food Science**, 61: 938 – 941. 1996.

SHAHIDI F. e NACZK M. Food phenolics: source, chemistry, effects and applications. Lancaster, **TECHNOMIC**. 331p. 1995.

SIEGEL S. **Eststística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo: Editora McGraw-Hill do Brasil; 1975

SILVA, E. B.; RAPOSO, M. C. M; CONCEIÇÃO, M. M.; SANTOS, V. O. Capacidade antioxidante de frutas e hortaliças. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 5, p. 93-98, 2015.

SIVANKALYANI, V.; FEYGENBERG, O.; DISKIN, S.; WRIGHT, B.; ALKAN, N. Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 132-139, 2016.

SOUSA, C. S.; BONETTI, A. M.; GOULART FILHO, L. R.; MACHADO, J. R. D. A.; LONDE, L. N.; BAFFI, M. A.; KERR, W. E. Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP. **Bragantia**, Campinas , v. 66, n. 1, p. 11-16, 2007.

SOUZA, M. C. M.; RESENDE, L. V.; MENEZES, D.; LOGES, V.; SOUTE, T. A.; SANTOS, V. F. Variabilidade genética para características agronômicas em progênies de alface tolerantes ao calor. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.354-358, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

WANG, C. J, WANG, J. M, LIN, W. L, Chu, C. Y, Chou, F. P, TSENG, T. H. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hidroperoxide induced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 411-416, 2000.

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

YOUDIM, K. A.; DEANS, S. G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. **British Journal of Nutrition**, v. 83. n. 1, p. 87-93, 2000.

ZHANG, Y. J.; GAN, R. Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; LI, A.N.; XU, D. P.; LI, H. B. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. **Molecules**, 2015, v. 20, n. 12, 21138-21156.

ZHANG, Y. Z.; XU, S. Z.; CHENG, Y. W.; YA, H. HANG, J. Transcriptome analysis and anthocyanin-related genes in red leaf lettuce. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016.