



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Jaime Corbiniano dos Santos Neto
Agronomia/SA3

**Vivência Interdisciplinar na Embrapa Hortaliças (CNPq) com foco em ações de
pesquisa no melhoramento genético de alface e tomate**

Recife, PE
2023

Jaime Corbiniano dos Santos Neto

Vivência Interdisciplinar na Embrapa Hortaliças (CNPQ) com foco em ações de pesquisa no melhoramento genético de alface e tomate

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Sede, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Agronomia

**Orientador: José Luiz Sandes de Carvalho
Supervisor: Leonardo Silva Boiteux**

**Recife, PE
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N469v

Neto, Jaime Corbiniano dos Santos
Vivência Interdisciplinar na Embrapa Hortaliças (CNPq) com foco em ações de pesquisa no
melhoramento genético de alface e tomate / Jaime Corbiniano dos Santos Neto. - 2023.
26 f. : il.

Orientador: Jose Luiz Sandes de Carvalho.
Coorientador: Leonardo Silva Boiteux.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Agronomia, Recife, 2023.

1. Melhoramento Genético de Plantas. 2. Resistência à fitopatógenos. 3. Alface. 4. Tomate. I. Carvalho,
Jose Luiz Sandes de, orient. II. Boiteux, Leonardo Silva, coorient. III. Título

CDD 630

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA – DEPA
AVALIAÇÃO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO
JAIME CORBINIANO DOS SANTOS NETO

**VIVÊNCIA INTERDISCIPLINAR NA EMBRAPA HORTALIÇAS (CNPQ) COM FOCO EM
AÇÕES DE PESQUISA NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE ALFACE E TOMATE**

NOTA: _____

Jaime Corbiniano dos Santos Neto
Discente - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. José Luiz Sandes de Carvalho
Orientador - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux
Supervisor – EMBRAPA Hortaliças

BANCA EXAMINADORA

Priscilla Anunciada Alves Moreira Ramalho
Doutoranda - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Alane Danielle Pacheco Pereira
Doutoranda - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife – PE
2023

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu Deus por estar comigo em cada momento da minha vida e trajetória, por todo o sustento que me proporcionou desde o início da graduação até o presente momento, por ter me proporcionado viver com saúde física e mental, além de me conceder forças todos os dias para correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus Pais, Jaime Filho e Sandra Albuquerque, e minhas irmãs, Camilla Gabrielle e Erika Larissa, por me incentivarem a não desistir e me apoiarem em tudo, além de serem meus exemplos de vida em todos os sentidos, sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui, e não só por isso, mas por tanto que vocês fizeram e fazem por mim, hoje venho agradecer e dizer que eu amo muito vocês. Agradeço também aos meus cunhados Adriano e Fagner, por todo o apoio durante a minha trajetória acadêmica.

Aos meus amigos e colegas de curso, Arielena Mello, Euzonio Rizzi, Isabela Patrícia, Juan Silva, Kássio Aureliano, Liany Silva, Poliana Santos, Tiago Feitosa e Victoria Liberal, que compartilharam de boa parte da jornada final, estando sempre à disposição para ajudar e me motivando nos momentos difíceis durante o curso. Em especial, quero agradecer aos meus amigos Kássio Aureliano e Tiago Feitosa que se fizeram presentes desde do início da jornada e foram pessoas muito importantes para que tudo que estou vivendo hoje fosse possível, me incentivando em cada passo, rindo, orientando, ouvindo músicas, fazendo nossos trabalhos e procurando sempre sermos os melhores entre os melhores.

Aos membros do Lafnema (UFRPE), Dr. Jorge Júnior, Dra. Mayara Castro, Profa. Dra. Elvira Pedrosa e a Profa. Dra. Lilian Guimarães por me acolherem no período em que permaneci no laboratório e me proporcionaram bons momentos de aprendizado. À Profa. Dra. Angélica Valois, que foi uma das peças importantes que me incentivou a seguir na área do melhoramento genético, além também do Prof. Dr. José Wilson pelo direcionamento e incentivo para que eu pudesse realizar um estágio na região centro-oeste do Brasil, me proporcionando uma melhor visão do agronegócio e uma vivência profissional, sem esquecer também do Eng. Agr. Clayton Pereira que foi peça chave para que essa etapa pudesse se tornar realidade.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. José Luiz Sandes de Carvalho, por todo o incentivo, auxílio, orientação e paciência.

Ao meu Supervisor, Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux, que em todo o processo para execução do presente trabalho, esteve presente me orientando, proporcionando o auxílio necessário para desenvolvimento tanto minhas habilidades como também minha responsabilidade científica no que diz respeito à área de melhoramento genético de hortaliças.

Ao Prof. Dr. Ailton Reis, pela paciência e auxílio em etapas que foram essenciais para realização deste trabalho.

A Embrapa Hortaliças, pela concessão da oportunidade de estagiar na instituição e todo o apoio, desde antes do início até a conclusão do estágio.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de Genômica e Fitopatologia da Embrapa Hortaliças: Tiago, Guilherme, Lídia, Atháise, Nicole, Wellison, Wellington, Wagner e Luana, por toda ajuda em relação à realização dos experimentos, como também pelos momentos de conversa e descontração que tivemos. Aos colegas de alojamento, Maria Siqueira, Renata, Estefanus, João Pedro e Guilherme, por todo o período de convivência.

À Dra. Maria Esther Fonseca, ao técnico Antônio Francisco Costa (Chico) e ao analista José Getúlio da Silva Filho, dos Laboratórios de Melhoramento Genético e de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças, sou grato por todo o aprendizado e conhecimento compartilhado, além de todo o auxílio. Agradeço também aos funcionários: Maria, Ronan e Claudemir, por toda a ajuda, disponibilidade e simpatia.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma, seja ela direta ou indiretamente, contribuíram para que hoje eu estivesse concluindo mais uma etapa da minha trajetória acadêmica. Muito Obrigado!

Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;
glória, pois, a Ele eternamente. Amém
Romanos 11:36

Sumário

1 Apresentação da Empresa.....	07
2 Introdução.....	08
3 Objetivo.....	10
4 Atividades desenvolvidas.....	11
4.1 – Avaliação de resistência à isolados de <i>Stemphylium</i> spp. em populações segregantes derivadas de cruzamentos com as cultivares ‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’.....	11
4.2 – Fenotipagem de famílias F _{2.3} advindas do cruzamento inicial das cultivares de alface ‘Elisa’ e ‘La Brillante’.....	16
4.3 – Extração e fenotipagem de teores e tipos carotenoides e avaliação de características de interesse e resistência ao oídio em uma coleção de 25 cultivares de alface.....	19
5 Conclusão.....	23
6 Considerações Finais.....	24
7 Referências Bibliográficas.....	24

Apresentação da Empresa

A Embrapa Hortaliças é uma das Unidades Descentralizadas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Criada em 1981, a Unidade de Pesquisa fica localizada a 40 km do Plano Piloto de Brasília (15,93° S; 48,15° W), no Distrito Federal, e possui um quadro técnico composto por 185 empregados efetivos, sendo 74 assistentes, 31 técnicos, 40 analistas e 40 pesquisadores.

Com foco em pesquisa e desenvolvimento para a produção eficiente e competitiva da olericultura, a Unidade é reconhecida como um centro de referência no Brasil e no exterior pela sua contribuição técnico-científica e pela capacidade de articulação em prol da sustentabilidade do espaço rural e do agronegócio de hortaliças.

Também atua em parcerias na geração e na transferência de tecnologias para diferentes segmentos sociais, em benefício do desenvolvimento de novos produtos e serviços. A pesquisa da Unidade ainda visa o desenvolvimento de materiais adaptados às condições edafoclimáticas brasileiras, proporcionando a ampliação da fronteira agrícola de hortaliças, bem como a regularização da oferta de produtos durante todo o ano.

Desde a sua criação, uma equipe altamente especializada, trabalha para desenvolver tecnologia de ponta. As pesquisas realizadas na Embrapa Hortaliças buscam desenvolver, promover e disponibilizar tecnologias, produtos e serviços que contribuam para o aumento da competitividade e da sustentabilidade, bem como para melhoria da qualidade na cadeia produtiva de hortaliças.

A equipe de pesquisadores atua em diversas áreas das ciências agrárias, cujos trabalhos agregam ações conjuntas visando soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação no atendimento de demandas identificadas junto a produtores, empresas parceiras e programas institucionais, do Brasil e de outros países.

A Embrapa Hortaliças desenvolve pesquisa nos temas agricultura orgânica, ciência e tecnologia de alimentos, entomologia, fisiologia de sementes, fitopatologia, fitotecnia, irrigação, melhoramento genético, mudanças climáticas, solos e nutrição de plantas, cultivo protegido, entre outros.

Introdução

Originário da América do Sul, o tomate (*Solanum lycopersicum*) é considerado como uma das hortaliças de maior importância mundial. A introdução na dieta dos indivíduos é essencial, principalmente pela contribuição nutricional na composição de refeições, sendo um alimento enriquecido de substâncias antioxidantes, além de vitamina C e E, B-caroteno, luteína e flavonoides (Dorais; Ehret; Papadopoulos, 2008; Kimura; Sinha, 2008; Barceloux, 2009).

A Alface, por sua vez, é proveniente do gênero *Lactuca* L., que compreende em torno de 100 espécies, dentre elas, a *Lactuca sativa* L. é a que se destaca pela possibilidade de cultivo e composição alimentar humana, tendo também substâncias importantes como os próprios carotenoides, mas em menor quantidade. Essa hortaliça é amplamente conhecida, por sua diversidade e difusão em todo o território mundial. Consumida em grande parte do território nacional, a alface é amplamente cultivada, principalmente nas chamadas hortas domésticas, além disso, por ser uma cultura com baixo tempo de prateleira, tem concentração em áreas de cultivo mais próximas dos centros de distribuição, para possibilitar um abastecimento mais rápido e facilitar o acesso dos consumidores à um alimento fresco e de qualidade.

A produtividade mundial da alface é em torno de 27 milhões de toneladas, com maior concentração produtiva na China que tem produção de mais de 14 milhões de toneladas, no Brasil, são produzidos cerca de 3% da produção mundial, o que corresponde a 900 mil toneladas, sendo a cultura considerada de grande importância também no país. (FAO, 2023; IBGE, 2023)

Similarmente à Alface, o tomate é denotado como sendo uma hortaliça amplamente cultivada, com índices de produtividade próximos dos 190 milhões de toneladas. Sua maior concentração produtiva é na Ásia, sendo os países com maior quantitativo produtivo, China e Índia, dos quais, os chineses se destacam com produção de mais de 45 milhões de toneladas de tomate por ano, tendo cerca de 31 milhões de toneladas a mais que a Índia, segundo colocado no ranking de produção da hortaliça no mundo, com cerca de 14 milhões de toneladas produzidas. O Brasil, por sua vez, se enquadra em 9º lugar no ranking mundial, com quase 4 milhões de toneladas, o que corresponde a 1,6% da produção mundial (FAO, 2023; IBGE, 2023).

A condução da cultura do tomate em campo é um desafio devido à grande suscetibilidade da planta como um todo à diversas pragas e doenças, pela exigência de diversos tratamentos culturais que auxiliam na prevenção e controle, além de proporcionarem melhor desenvolvimento à cultura, o que pela visão do produtor pode ser então considerada como um risco econômico para quem se dispõe a produzi-la (Luz; Shinzato & Silva, 2007; Wamser et al., 2007), o que não é diferente para a alface,

já que os desafios de produção envolvem desde fatores edafoclimáticos até doenças que influenciam da produção ao consumo.

Dentre as doenças que acometem o tomateiro, a chamada “mancha cinzenta das folhas”, doença causada pelo fungo *Stemphylium* spp., foi uma doença que por muito tempo teve sua importância consideravelmente reduzida, principalmente pelo uso de cultivares resistentes à ação do fungo no campo, no entanto, após um período, foi observada que a incidência da doença em campo voltou a crescer, conduzindo a uma possível perda de resistência (Reis; Boiteux, 2006, 2020).

Em alface, no entanto, um dos problemas que mais tem limitado a produção da cultura no Brasil é o fungo do gênero *Berkeleyomyces* (Berk. & Broome), causador da podridão negra das raízes, demonstrando lesões amarronzadas características nas raízes principais, se tornando enegrecidas com o desenvolvimento da doença, por conta dessa destruição, principalmente de raízes laterais, inicialmente, a planta é estimulada a produzir mais raízes para assim continuar produzindo, deslocando assim sua energia para esse feito, reduzindo os fatores de produção de interesse como as folhas e tamanho, o que afeta diretamente a produtividade (Souza, 2022).

Os sintomas causados por *Stemphylium* spp. são visíveis nas folhas, podendo ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura, porém com mais frequência durante o período inicial da frutificação até o período de colheita, o que colabora para a dificuldade da planta em realizar a fotossíntese, pois diminui a superfície fotossintética da mesma (Reis; Boiteux, 2006a, 2006b). Por seu sintoma se tratar de manchas marrom-escuras de formato irregular, a doença pode ser confundida com outras como a pinta preta (*Alternaria solani*) ou mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.). A semelhança demonstra a necessidade de um diagnóstico preciso para utilização de técnicas adequadas de controle. Devido à grande incidência de pragas e doenças relacionadas ao tomateiro, as técnicas para controle de patógenos são diversas, variando desde às mais simples como o uso de agroquímicos e produtos biológicos, às mais complexas, com as inovações tecnológicas, no que diz respeito à edição gênica, que possibilita a introdução de genes de resistência (Campanhola; Bettiol, 2003; Abreu, 2006; Fonseca; Boiteux, 2021).

Os genes de resistência respondem de acordo com a interação inicial planta-patógeno, com possibilidade de ativação ou não de mecanismos de resistência como resposta hipersensitiva e resistência sistêmica adquirida (Nogueira, 2007). Recentemente, foram identificados alguns indivíduos do gênero *Solanum* spp. que demonstraram resistência à espécie fúngica *Stemphylium solani*, como as cultivares IPA-5 e Floradade (*Solanum lycopersicon*) e a CNPH-1122 (*Solanum habrochaites*), nestes foram observadas a expressão do Gene Sm, sendo este, o controlador da resistência à doença, tendo sido introduzido de *Solanum pimpinellifolium* (Hendrix; Frazier, 1949; Paula; Oliveira, 2001; Reis; Boiteux, 2006c). Quanto à alface, foi-se

identificado em uma cultivar de alface chamada La Brillante demonstrando resistência a fungos do gênero *Berkeleyomyces* spp., sendo considerada uma fonte de resistência para realização de cruzamentos.

Sendo assim, pela necessidade de introdução desses genes em cultivares presentes no mercado, foi que o estágio realizado, teve abrangência em avaliar híbridos de tomate para resistência à *S. solani* e *S. lycopersici*, bem como realizar a fenotipagem de híbridos de alface que serão utilizados para estudo de herança quanto a resistência à *Berkeleyomyces* spp., além de realizar a avaliação de cultivares quanto ao perfil de carotenoides, visando estimar a presença dessas substâncias comparativamente nas cultivares e seus benefícios.

Objetivo

Objetivos Gerais

- Avaliar novas fontes de resistência à patógenos na cultura da alface e do tomate, e conduzir o estudo de herança, visando avaliar características de interesse dentro do programa de melhoramento desenvolvido pela Embrapa Hortaliças.

Objetivos Específicos

- Avaliar novas fontes de resistência no tomateiro ao *Stemphylium* spp. e conduzir estudo de herança com fontes mais promissoras detectadas pela equipe da Embrapa Hortaliças em acessos da espécie selvagem *Solanum habrochaites*.
- Realizar o estudo de herança de características de interesse econômico na cultura da Alface, concernente ao cruzamento inicial das cultivares de Alface 'Elisa' e 'La Brillante'.
- Quantificar e comparar a quantidade e perfil de carotenoides em 25 cultivares/populações de alface

Atividades desenvolvidas

Atividade 1 – Avaliação de resistência à isolados de *Stemphylium* spp. em populações segregantes derivadas de cruzamentos com as cultivares ‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’ (suscetíveis) e diferentes acessos resistentes de *Solanum habrochaites*.

O experimento foi realizado na área experimental da Embrapa Hortaliças (CNPH), localizado próximo à Rodovia BR 060 Km 9, Brasília–DF, 70351-970 (Figura 1).



Figura 1. Prédio dos Laboratórios – Embrapa Hortaliças (CNPH)

Foram selecionadas para a realização do experimento seis populações F2 envolvendo parentais previamente identificados como resistentes e suscetíveis (Torres, 2023). As 6 populações F2, as quais espera-se que sejam resistentes, foram: (Santa Clara (SC) x CNPH_0417, SC x CNPH_0929, SC x CNPH_1772, Ponderosa (PD) x CNPH_0417, PD x CNPG_0929 e PD x CNPH_1772), 4 híbridos F1 (Resistentes) (SC x CNPH_0417, SLC x CNPH_0929, PD x CNPH_0929 e PD x CNPH_1772). Foram também incluídas plantas dos parentais contrastantes ‘Santa Clara’ e ‘Ponderosa’, ambas suscetíveis (Figura 2).



Figura 2. Packs de sementes dos acessos de tomate utilizados para semeio.

Para semeadura foram utilizadas 14 bandejas de 128 células, sendo utilizadas duas bandejas para cada população F2. Para os demais acessos selecionados foram semeadas 20 células, sendo uma semente por célula e cada bandeja ou parcela semeada devidamente identificadas com placas brancas (Figura 3).



Figura 3. A. Estufa de produção de mudas da EMBRAPA Hortaliças; B. Bandejas semeadas com todos os acessos selecionados.

Foram selecionados sete isolados do patógeno, sendo cinco de *Stemphylium solani* (EH0446, EH1144, EH1145, EH1522 e EH1749) e dois de *Stemphylium lycopersici* (EH2800 e EH2811) da coleção de isolados de fungos e oomicetos do Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPH), os quais foram recuperados utilizando o meio de cultura BDAT (BDA mais 30mg de tetraciclina /L). Foi feita uma placa para cada isolado e as placas foram mantida em incubadora tipo BOD durante aproximadamente 8 dias (Figura 4). Após oito dias foi realizada a transferência de inóculo dos isolados para placas com meio de cultura V8 à 20%, sendo estas dispostas em BOD mantidas sob temperatura média de 25°C e submetidas à luz negra. Aproximadamente sete dias depois, foi realizada novamente a transferência de material para o meio V8 à 6,4%, sendo um meio mais concentrado proporcionando melhor crescimento e esporulação dos fungos. Após aproximadamente sete dias de crescimento, os conídios foram extraídos por raspagem das colônias fúngicas em água com auxílio de uma escova de cerdas macias. A suspensão obtida foi filtrada em gaze dupla, sendo a concentração do inóculo ajustada para 10^4 conídios/mL (Figura 5, 6 e 7).

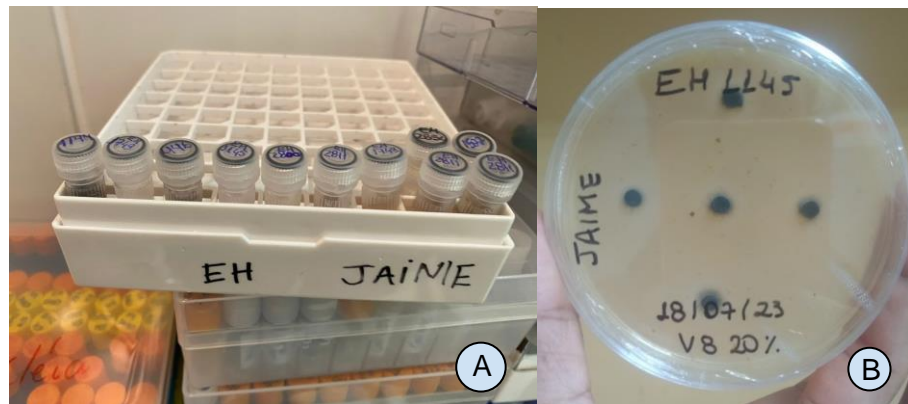


Figura 4. A. Isolados em câmara fria selecionados para inoculação; B. Isolado EH-1145 recuperado em meio V8 à 20%

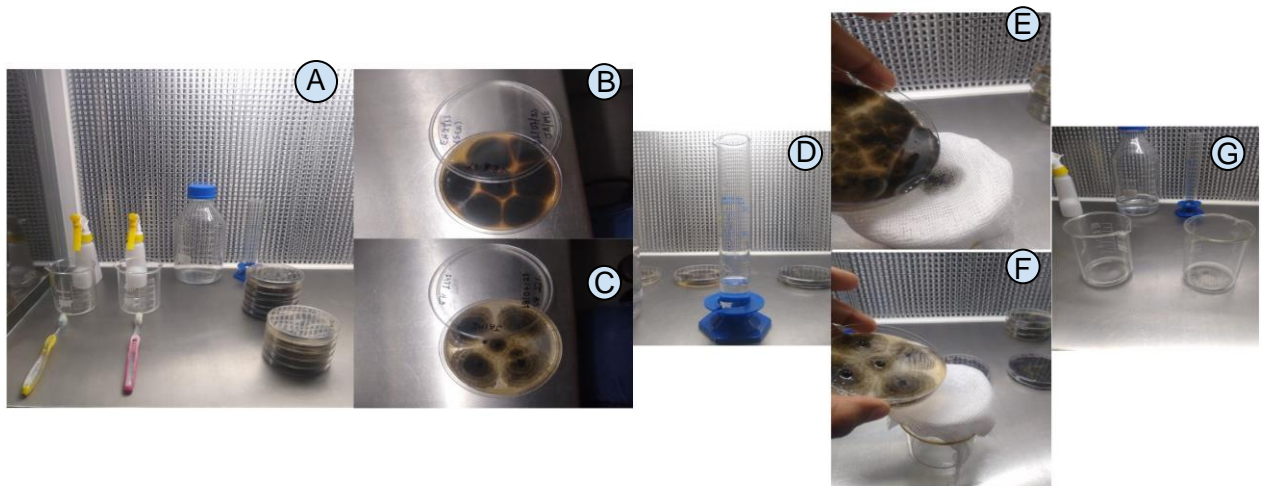


Figura 5. Preparação de inóculo (A. Materiais utilizados para preparação; B, C. Placas com isolados de *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*; D. Proveta com 20 mL de água destilada; E,F. Suspensão de conídios sendo filtrada em dupla gaze; G. Suspensão após filtração).

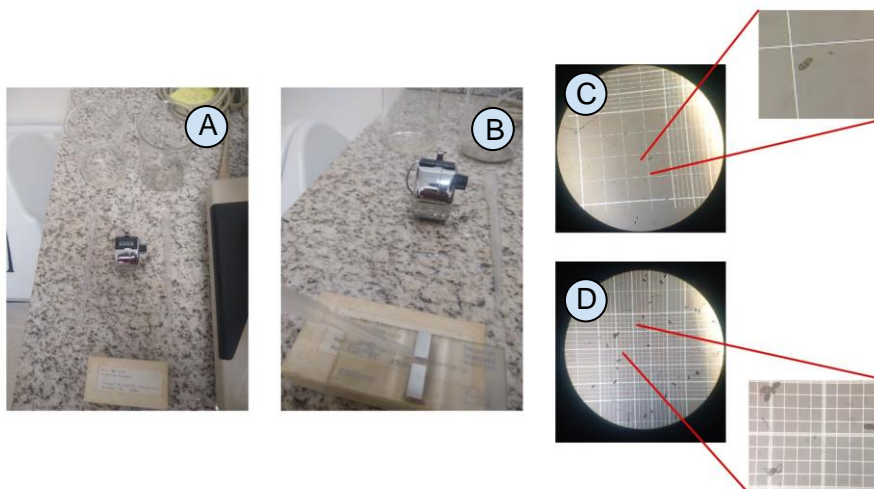


Figura 6. Preparação de inóculo (A. Materiais utilizados para contagem de conídios; B. Suspensão sendo colocada na câmara de Neubauer; C,D. Observação de conídios em microscópio).

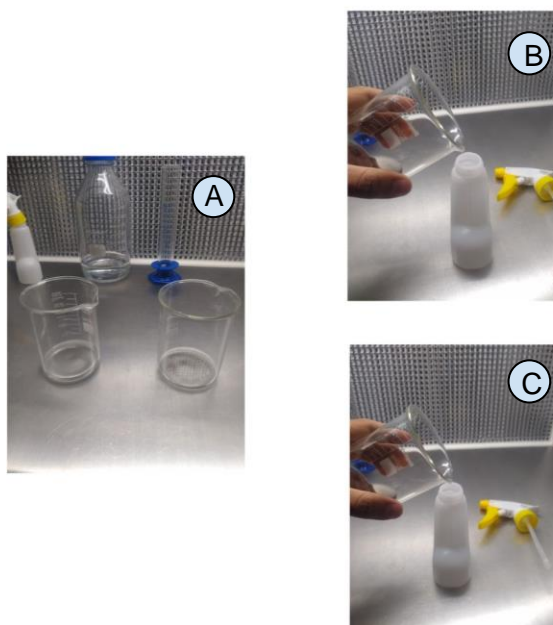


Figura 7. Preparação de inóculo (A. Materiais utilizados; B,C. Inóculos sendo colocados em pulverizador).

As plantas foram inoculadas uma vez ainda nas bandejas, sendo aspergidas com a suspensão de conídios com o auxílio de um borrifador manual, até o ponto de escoamento. Em seguida, submetidas à câmara úmida, que foram feitas com uma

lona plástica transparente, cobrindo as plantas por 48 horas, de modo a proporcionar melhor e mais rápido desenvolvimento do fungo nas plantas pelo favorecimento de um microclima no local (Figura 8).



Figura 8. Indivíduos que receberam inóculo em câmara úmida.

A reação dos acessos e cultivares aos isolados de *S. lycopersici* foi caracterizada com base em parâmetros epidemiológicos: período de incubação (PI) e a severidade final. A severidade da doença será avaliada aos 7 e 15 dias após a inoculação (DAI), visualmente em quatro folhas por planta, usando uma escala descritiva de 0 a 4 (Cho et al. 2001): 0 = sem sintomas; 1 = Entre 1–3 pontos necróticos nas folhas; 2 = Entre 4–6 pontos necróticos nas folhas; 3 = Sete ou mais manchas foliares, mas sem coalescência de manchas; 4 = Mais de sete manchas foliares com coalescência de lesões e/ou queda das folhas. A severidade final foi medida na última avaliação (15 dias após a inoculação). Com base nas notas obtidas nessa avaliação, foi calculado o índice da doença (ID), através da fórmula de McKinney (1923), onde $ID (\%) = 100.S[(f.v)/(n.x)]$; sendo f = número de plantas com a mesma nota; v = nota observada; n = número total de plantas avaliadas e x = nota máxima da escala. Os genótipos que não demonstraram sintomas da mancha de estenfílio tiveram o PI ajustado para 16 dias, correspondendo ao período de avaliação total (15) mais um dia (Miranda et al., 2010). Os dados de PI e ID serão submetidos à análise de variância (ANOVA), ao teste de qui-quadrado.



Figura 9. Plantas de tomate apresentando sintomas 5 DAI.

A expectativa é que as notas seriam baixas, devido à possível herança do gene de resistência para as progênies obtidas por autofecundação dos cruzamentos prévios com indivíduos que possuíam o gene de resistência, os quais demonstraram ser os mais promissores em estudos prévios na Embrapa Hortaliças (Torres, 2023).

Atividade 2 – Fenotipagem de famílias $F_{2:3}$ advindas do cruzamento inicial das cultivares de alface ‘Elisa’ (suscetível) e ‘La Brillante’ (resistente)

O experimento foi realizado na área experimental da Embrapa Hortaliças. As plantas foram dispostas em campo e distribuídas em 14 linhas, sendo progênies de alface $F_{2:3}$ provenientes do cruzamento inicial das cultivares ‘Elisa’ e ‘La Brillante’. Das plantas avaliadas na geração F_2 foram selecionadas as que se apresentaram mais promissoras para a resistência aos fungos de solo do gênero *Berkeleyomyces* (Perdomo, 2022), seguindo para o campo essas oriundas da autofecundação. Foram transplantadas para o campo 13 plantas de cada genótipo, com total de 323 genótipos e 4.200 plantas de alface, sendo estas conduzidas normalmente, com irrigação por gotejamento e controle de plantas daninhas por capina manual.



Figura 10. Campo experimental de alface

Após realizar observação das principais características fenotípicas que diferiam as duas cultivares utilizadas como parentais, foi feita uma revisão de literatura, visando elencar as características que denotavam maior importância quanto à produção e mercado consumidor. Foram então estabelecidas cinco características fenotípicas para serem avaliadas, sendo elas, borda, coloração e rugosidade foliar, formato ou arquitetura da planta e deficiência de cálcio (Tipburn).

Para que fosse possível a avaliação individual das plantas de cada progênie, foram desenvolvidas tabelas de avaliação que dispusessem todas as plantas presentes no campo. As avaliações foram realizadas em torno de cinco dias, sendo a cada dia avaliada uma característica.

Para cada característica foi estabelecida uma escala de notas, para que pudesse ser realizada a diferenciação propriamente dita no momento de avaliação, sendo os parâmetros estabelecidos visualmente (Tabela 1).

Tabela 1. Características Fenotípicas avaliadas e Escala de Notas.

Característica	Escala de Notas
Borda da lâmina foliar	Serreada (1) Lisa (2)
Cor da folhagem	Verde Amarelado (1) Verde Claro (2) Verde Escuro (3)
Porte da planta	Prostrado (1) Tubular (2)

	Ereto (3) Cabeça (4)
Rugosidade foliar	Ausente (1) Suave (2) Intermediário (3) Intenso (4)
Deficiência de cálcio (Tipburn)	Ausente (1) Suave (2) Intermediário (3) Severo (4)

Após avaliação, os dados foram reorganizados em diferentes tabelas para futuras análises e observação da herança dos caracteres fenotípicos de interesse (Figura 11).



Figura 11. Ilustração das diferentes tipologias de plantas entre indivíduos com diferentes características fenotípicas.

Com isso, foi possível notar indivíduos similares aos parentais com possibilidade de apresentarem resistência, porém com progênes ainda com uma alta variabilidade é difícil afirmar que isso seja concreto, por isso a necessidade de continuação do programa de melhoramento de alface com foco em resistência à podridão negra das raízes.

Atividade 3 – Extração e fenotipagem de teores e tipos carotenoides e avaliação de características de interesse e resistência ao oídio em uma coleção de 25 cultivares de alface

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Hortaliças e foram realizadas algumas análises laboratoriais no laboratório de genômica II, nas dependências da instituição. Foram selecionadas 25 cultivares/populações de alface

(**Tabela 2**) para condução do experimento, sendo dispostas em campo experimental 13 plantas de cada cultivar. As plantas foram conduzidas normalmente com irrigação por gotejamento, sendo realizado o controle de plantas daninhas através da capina manual.

Tabela 2. Cultivares e populações de alface avaliadas incluídas na atividade 3

Cultivares
Autumn gold
Argeles
Bedford
Belíssimo
Caipira
Classic
Colorado
Dandie
Ithaca
La Brillante
Laitue Passion Blonde à Graine Blanele
Pennlake
PI 342444
Regina
Salinas 88_27
UC_02203
UC_02204
UC_02206
UC_07106
UC_12100
UC_12101
UC_12103
UCDM_10
Vanda

A avaliação em campo foi realizada por planta individual para seis características fenotípicas, sendo elas, borda foliar, coloração e rugosidade foliar, formato/porte das plantas, deficiência de cálcio e resistência à oídio (**Tabelas 1 & 3**). Para avaliar cada característica foram utilizadas escalas de notas visando a diferenciação e individualização das plantas. Sendo adicionada ao estudo feito anteriormente na Tabela 1 a característica avaliada quanto ao oídio (Tabela 3).

Tabela 3. Escala de Notas para a reação ao oídio.

Característica	Escala de Notas
Oídio	Ausente (nota = 1)

Presente nas folhas basais com baixa intensidade e ausente nas folhas superiores (**nota = 2**)

Presente nas folhas basais com alta intensidade e ausente nas folhas superiores (**nota = 3**)

Presente nas folhas basais e superiores com baixa intensidade (**nota = 4**)

Presente nas folhas basais e superiores com alta intensidade (**nota = 5**)



Figura 12. Aspecto das cultivares de alface avaliadas em campo para resposta ao oídio e para carotenoides

Foi coletada uma folha de cada cultivar para extração de carotenoides, sendo padronizadas duas amostras de cada folha com peso de aproximadamente 2,0 g, estimado com balança analítica de precisão. Em ambiente escuro, cada amostra foi triturada separadamente em liquidificador com adição de acetona. A acetona foi utilizada para solubilizar os carotenoides presentes na folha. Posteriormente as amostras foram filtradas com a utilização de papel filtro para separação da parte sólida (fragmentos celulares) e coleta do extrato contendo carotenoides e clorofila dissolvidos em acetona. O próximo passo foi a transferência dos carotenoides da acetona para o éter de petróleo. Para isso, o extrato foi transferido para um funil de separação e foi adicionado éter de petróleo em volume igual ao da acetona. Nesta etapa formaram-se duas fases: uma superior com éter e carotenoides (de cor

amarelada) e uma inferior transparente contendo a acetona com água. Foram feitas entre 4-6 lavagens com água destilada, de modo a remover toda a acetona que é mais pesada que o éter e permanece na fase inferior, tomando cuidado para não deixar passar a fase de éter com os carotenoides. Filtrou-se novamente em fibra de vidro e Sulfato de sódio para evitar que haja passagem de água e interfira no processo. O extrato final é transferido para um balão de fundo redondo e submetido à alta pressão e temperatura constante de 30°C para evaporação do éter e concentração das demais substâncias, sendo então tampado com Parafilm, envolvido com papel alumínio e posto em geladeira para conservação.



Figura 13. Parte dos elementos da análise em laboratório

Durante o processo após a segunda filtragem, foi retirada uma amostra para ser submetida ao espectrofotômetro para realização de quantificação de carotenoides através do uso da equação: $\frac{(ABS \times VE \times 1000000)}{(100 \times 1850 \times P)}$, sendo, ABS = Absorbância, VE = Volume do éter e P = peso da amostra.

Além da realização da quantificação com Espectrofotômetro, o processo continuou para utilização em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC). O concentrado final foi retirado da geladeira, adicionou-se acetona própria para HPLC e transferindo com o auxílio de uma seringa de vidro para um frasco de vidro. Após a análise em HPLC os resultados foram transmitidos para um computador e salvos em arquivos no formato .lcd, sendo extraídos os perfis (cromatograma) com os picos representativos das amostras. A análise foi feita em um aparelho Shimadzu utilizando-se uma coluna de fase reversa C-18 (Waters Spherisorb) e uma mistura de acetonitrila:metanol:acetato de etila na proporção de 8:1:1 como fase móvel (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).



Figura 14. Espectrofotômetro, HPLC e Coluna C-18

Os picos foram identificados baseado em Rodriguez-amaya (2001) e Silva Filho (2011), e quantificados os carotenoides totais, B-caroteno e clorofila por meio de porcentagem, além do B-caroteno ter sido também quantificado utilizando os dados referentes à medição pelo espectrofotômetro.

Outras atividades suplementares

Foi realizado o auxílio em trabalhos de mestrados e doutorandos nos laboratórios de Melhoramento Genético, Fitopatologia, Virologia e Pós-colheita.

Conclusão

A Embrapa Hortaliças proporciona uma ótima experiência para o estudante de agronomia, demonstrando a possibilidade de uma vivência interdisciplinar, e desenvolvimento das habilidades de pesquisa e desenvolvimento do aluno para atuar como futuro profissional. Os trabalhos desenvolvidos são de caráter importante para o desenvolvimento de cultivares resistentes a patógenos bem como fonte nutricional importante para os consumidores, desse modo, denota-se a importância da realização do presente trabalho, assim como a continuidade dos experimentos citados. Com relação à experiência pessoal, reconheço que pude aplicar os meus conhecimentos adquiridos na graduação de forma prática e eficaz, possibilitando assim o melhor desenvolvimento das minhas habilidades como engenheiro agrônomo, o que considero de suma importância, já que preciso dessas habilidades para o futuro.

Considerações Finais

O presente trabalho trouxe dados de experimentos que ainda estão sendo finalizados, por esse motivo, não denota os resultados que serão obtidos após a realização das análises estatísticas.

Referências Bibliográficas

ABREU, Carlos Luiz Milhomem de. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais. 2006.

BARCELOUX, D.G. Potatoes, tomatoes, and solanine toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). **Disease-a-month**, v. 55, n. 6, p. 391-402, 2009.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 279pp, 2003.

DORAIS, M.; EHRET, D.L.; PAPADOPOULOS, A.P. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 231-250, 2008.

DE SOUZA, RUTHE LIMA et al. Identificação molecular e patogenicidade de espécies de *Berkeleyomyces* associadas a hortaliças no Brasil com ênfase na cultura da Alface. 2022.

FAO. World Agricultural Information Center, 22 de Mar. de 2023. Disponível em: <<https://fenix.fao.org/faostat/internal/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 10 de Ago. de 2023.

FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L. S. Biotecnologia no melhoramento genético de plantas para resistência a patógenos: Exemplos da aplicação de sistemas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) no tomateiro (Capítulo 5). In: RIOS J.A.; ALMEIDA L.C.; SOUZA E.B. (Org.). Resistência de plantas a patógenos. 1ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. 1, p. 121-167, 2021.

HENDRIX, J.W.; FRAZIER, W.A. Studies on the inheritance of *Stemphylium* resistance in tomatoes. Hawaii Agricultural Experiment Station, Technical Bulletin 8, 1949.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - Julho/2023. IBGE, 2023. Acesso em: 10 de Ago. de 2023. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>>.

KIMURA, S.; SINHA, N. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2008, n. 11, p. pdb. emo105, 2008.

LUZ, J. M. Q.; SHINZATO, A. V.; SILVA, M. A. D. Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. **Biosci. j.(Online)**, 2007.

NOGUEIRA, A.C.W. **Caracterização de genes de resistência a patógenos em eucalipto (*Eucalyptus* spp.), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

PAULA, R.S.; OLIVEIRA, W.F. Resistência de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a *Stemphylium solani* Weber. Pesquisa Agropecuária Tropical 31: 139-145, 2001.

PERDOMO D. N. Caracterização de fontes de resistência genética contra espécies de *Berkeleyomyces* e *Septoria lactucae* em *Lactuca sativa*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2022.

REIS, A.; BOITEUX, L.S. Mancha-de-estenfilio: ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 41. Embrapa Hortaliças 8p, 2006a.

REIS, A.; BOITEUX, L.S. Círculo de plantas hospedeiras de isolados de *Stemphylium solani*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 18, Embrapa Hortalias, 8p, 2006b.

REIS, A.; BOITEUX, L.S. Resistencia de acessos de Lycopersicon a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22, Embrapa Hortalias, 8p, 2006c.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. et al. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI press, 2001.

SILVA FILHO, J. G. Diversidade dos pigmentos e do gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase (Via biossintética dos carotenóides) em quatro espécies do gênero *Capsicum* L. Tese de mestrado. Universidade de Brasília. 2011.

TORRES T. B. Mancha de *Stemphylium*: Etiologia, gama de hospedeiras e identificação de novas fontes de resistência em *Capsicum* e tomateiro. Tese de Doutorado Fitopatologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 135 pp., 2023.

WAMSER, Anderson Fernando et al. Produção do tomateiro em função dos sistemas de condução de plantas. Horticultura Brasileira, v. 25, p. 238-243, 2007.