



## DIVERSIDADE GENÉTICA DO URUCUM

DEQUIGIOVANI, G.<sup>1\*</sup>, RAMOS, S.L.F.R.<sup>1</sup>, ALVES-PEREIRA, A.<sup>1</sup>, FABRI, E.G.<sup>2</sup>, CARVALHO, P.R.N.<sup>3</sup>, SILVA, M.G.<sup>3</sup>, ABDO, M.T.V.N.<sup>4</sup>, MARTINS, A.L.M.<sup>4</sup>, CLEMENT, C.R.<sup>5</sup>, VEASEY, E.A.<sup>1\*</sup>

### Introdução

O urucuzeiro, *Bixa orellana* L., Bixaceae, é um arbusto tropical que ocorre em diversas regiões do Brasil, e vem despontando como uma cultura de grande valor econômico pela produção de corantes naturais (principalmente a bixina) a partir dos arilos de suas sementes. Esta cultura é originária da América, sendo a provável região de origem o Sudoeste da Amazônia (ARCE, 1999; CLEMENT et al., 2010). O Brasil é o maior produtor de urucum, sendo responsável por 57% da produção mundial, estimada entre 10.000 e 12.000 t para o ano de 2015, seguido pelo Peru com 31%, Costa do Marfim e Gana, Quênia, Guatemala, República Dominicana, Bolívia, Equador, Índia e México (FABRI, 2015). O maior produtor no Brasil é o estado de São Paulo, seguido de Rondônia, Pará e Paraná, embora o urucum seja cultivado em diversas regiões do país (FABRI, 2015).

Em função da proibição do uso de corantes sintéticos nas indústrias de alimentos e cosméticos (FERREIRA e FALESI, 1989), o corante natural do urucum, a

---

<sup>1</sup>Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. E-mails: gabriel.dequi@gmail.com; slfr03@hotmail.com; ale.alves.pereira@gmail.com; eaveasey@usp.br

<sup>2</sup>Centro de Horticultura, Instituto Agrônomo, Campinas, SP. E-mail: efabri@iac.sp.gov.br

<sup>3</sup>Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, E-mail: carvalho@ital.sp.gov.br; martags@ital.sp.gov.br

<sup>4</sup>Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Apta Centro Norte, Pindorama, SP. E-mails: mtvilela@apta.sp.gov.br; lmartins@apta.sp.gov.br

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM. E-mail: cclement@inpa.gov.br

\* Autores correspondentes: Elizabeth Ann Veasey (eaveasey@usp.br) e Gabriel Dequigiovanni (gabriel.dequi@gmail.com).



bixina, passou a ser mais valorizado, sendo um dos poucos permitidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Além do potencial pela produção do corante natural, o urucum apresenta outras substâncias importantes para a saúde humana, como o geranilgeraniol, tocotrienóis e outros carotenóides (ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2012), que vêm despertando o interesse dos setores industriais, farmacêuticos, cosméticos e de alimentos (CARVALHO et al., 2010; VALÉRIO et al., 2015).

Os marcadores microssatélites ou *Single Sequence Repeats* (SSR) têm sido amplamente utilizados em estudos genéticos, com aplicações em muitas áreas de pesquisa, incluindo genética de populações, mapeamento genético e processos evolutivos, tanto em plantas cultivadas como em plantas silvestres (VIEIRA et al., 2016). Os SSR são marcadores muito populares devido à herança codominante, sendo muito frequentes, amplamente distribuídos por todo o genoma, permitindo uma boa cobertura de qualquer genoma eucarioto, mostrando elevada diversidade genética, além de apresentar alta reprodutibilidade (AGARWAL et al., 2008; VIEIRA et al., 2016).

Este estudo teve como objetivo inicial caracterizar a diversidade genética do banco de germoplasma do Instituto Agrônômico (IAC) para marcadores moleculares e bioquímicos, bem como a análise de variedades locais e populações selvagens de urucum, coletados em diversas regiões do Brasil, utilizando para tanto 16 marcadores microssatélites.

## **Desenvolvimento**

Nesta palestra iremos abordar a avaliação de 63 acessos de urucum do Banco de Germoplasma do IAC, mantido no Pólo Regional Centro Norte em Pindorama, SP. A maior parte dos acessos da coleção é originária das regiões Norte, Estado de Rondônia, seguido da região Sudeste, estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, Centro-Oeste, estado de Mato Grosso, e do Peru (um acesso), além de 20 acessos sem origem definida. Para as análises moleculares, a extração de DNA seguiu a metodologia de Doyle e Doyle (1990) e a quantificação foi realizada em géis de agarose (1%) corados com GelRed (Biotium). Os acessos foram avaliados com 16 iniciadores de microssatélites, desenvolvidos por Dequigiovanni et al. (2014) e Dequigiovanni et al. (submetido). As reações de polimerase em cadeia (PCR), bem como preparo do mix para estas reações, estão descritas em Dequigiovanni et al. (2014). Os microssatélites foram genotipados em um sequenciador automático (ABI Prism 3130xl capillary sequencer). Os padrões dos microssatélites foram avaliados utilizando o software GENEMAPPER v4.0 software (Applied Biosystems).



Para as análises bioquímicas, os frutos coletados foram secados ao sol. Após a secagem as sementes foram separadas manualmente das cápsulas para as análises. Foram avaliados os caracteres conteúdo de umidade das sementes, lipídeos, carotenoides totais, expressos como bixina, tocotrienóis e geranilgeraniol (PANFILI et al., 2003; HORWITZ, 2005; CARVALHO et al., 2010).

Foram realizadas análises de agrupamento e análises de coordenadas principais para os caracteres bioquímicos, mostrando uma nítida separação dos acessos de Rondônia, os quais foram agrupados em três grupos, onde foram incluídos também dois acessos de Minas Gerais, um de Mato Grosso e oito acessos de origem desconhecida. Esses grupos apresentaram valores superiores aos demais grupos para todos os caracteres bioquímicos. A análise de coordenadas principais mostrou também que os acessos de Rondônia estão correlacionados positivamente com valores elevados dos cinco caracteres bioquímicos avaliados.

Foi observado um total de 73 alelos na caracterização dos 63 acessos de urucum, com média de 4,56 alelos por loco. A heterozigosidade observada média ( $H_O$ ) foi bem menor que a heterozigosidade média esperada ( $H_E$ ), mostrando um déficit de heterozigotos na coleção de germoplasma. Carvalho et al. (2005) também observaram, com marcadores isozimáticos, níveis menores de  $H_O$  quando comparados com  $H_E$  na avaliação de 60 acessos de bancos de germoplasma de urucum do Brasil. Os baixos valores de  $H_O$  quando comparados à  $H_E$ , aliada a elevados valores para o índice de fixação, mostram a presença de endogamia e provável autofecundação na espécie. Rivera-Madrid et al. (2006), conduzindo polinizações controladas em acessos de urucum no México, sugeriram que a espécie pode se reproduzir tanto por fecundação cruzada como por autofecundação. Vilares et al. (1992) já haviam concluído que a espécie pode se reproduzir por autofecundação. Estudos bem detalhados sobre a biologia reprodutiva na Índia, realizados por Joseph et al. (2012), concluíram que o urucum apresenta polinização cruzada, podendo também se reproduzir por autofecundação.

## **Conclusões**

A caracterização molecular e bioquímica dos acessos do banco de germoplasma de urucum do IAC mostrou níveis moderados de diversidade genética, com déficits de heterozigotos na coleção. Mostrou também a nítida separação, tanto para caracteres bioquímicos como para os moleculares, dos acessos da região Norte, especificamente, de Rondônia, dos demais acessos da coleção originários do Sudeste e Centro-Oeste. Mostrou também que os acessos de Rondônia apresentam os valores



mais elevados para todos os caracteres bioquímicos apresentados, podendo-se destacar alguns indivíduos com valores mais elevados para tais caracteres.

### Referências Bibliográficas

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, v.27, p.617-631, 2008.
- ALBUQUERQUE, C.L.C.; MEIRELES, M.A.A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. *Journal of Supercritical Fluids*, v.66, p.86–94, 2012.
- ARCE, J. El achiote *Bixa orellana* L. cultivo promisorio para el trópico. Turrialba, Costa Rica: Earth, 1999. p. 149.
- CARVALHO, P.R.N.; SILVA, M.G.; FABRI, E.G.; TAVARES, P.E.R.; MARTINS, A.L.M.; SPATTI, L.R. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do Instituto Agrônomo (IAC). *Bragantia*, v. 69, n. 3, p519-524, 2010.
- CARVALHO, J.F.R.P.; ROBINSON, I.P.; ALFENAS, A.C. Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (*Bixa orellana* L.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, p.653-660, 2005.
- CLEMENT, C.R.; CRISTO-ARAÚJO, M.; D'EECKENBRUGGE, G.C.; ALVES PEREIRA, A.; PIKANÇO-RODRIGUES, D. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity*, v.2, p.72-106, 2010.
- DEQUIGIOVANNI, G.; RAMOS, S.L.F.; ZUCCHI, M.I.; BAJAY, M.M.; PINHEIRO, J.B.; FABRI, E.G.; BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Bixa orellana*, an important source of natural dyes. *Genetics and Molecular Research*, v.13, p.9097-9102, 2014.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.
- FABRI, E.G. Demanda por corantes naturais aquece mercado brasileiro de urucum. Sociedade Nacional de Agricultura. Notícia publicada em 21/07/2015. In: <http://sna.agr.br/demanda-por-corantes-naturais-aquece-mercado-brasileiro-de-urucum/> (Acesso em 26/11/2015).
- FERREIRA, W.A.; FALES, I.C. Características nutricionais do fruto e teor de bixina em urucum (*Bixa orellana* L.). Belém: EMBRAPA-CPAT, 1989. 31p.
- HORWITZ, W. (Ed). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005.



- JOSEPH, N.; SIRIL, E.A.; NAIR, G.M. Reproductive characterization and preliminary studies on controlled breeding of Annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant Systematics and Evolution*, v.298, p.239–250, 2012.
- PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO M. Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.3940-3944, 2003.
- RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-GM, R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HUGES HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae*, v.109, p.165-172, 2006.
- VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, v.39, p.312-328, 2016.
- VILARES, A.S.; SÃO JOSÉ, A.B.; REBOUÇAS, T.N.H.; et al. Estudo da biologia floral de urucueiro (*Bixa orellana* L.). *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, v.1, p.101-105, 1992.
- VALÉRIO, M.A.; RAMOS, M.I.L.; BRAGA NETO, J.A., MACEDO, M.L.R. Annatto seed residue (*Bixa orellana* L.): nutritional quality. *Food Science and Technology*, v.35, p.326-330, 2015.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro e bolsas de estudos. E ao Instituto Agrônômico (IAC/APTA), pelo fornecimento das amostras do Banco de Germoplasma de Urucum.