



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO

CARLOS ALBERTO REYES MALDONADO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS

THATIELEN FURINI

Prospecção e quantificação do DNA nuclear de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* (Bixaceae)

ALTA FLORESTA

MATO GROSSO – BRASIL

MARÇO – 2021

THATIELEN FURINI

Prospecção e quantificação do DNA nuclear de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* (Bixaceae)

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Carlos Alberto Reyes Maldonado como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Isane Vera Karsburg

Coorientador: Prof. Dr. José Martins Fernandes

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO – BRASIL
MARÇO – 2021

Ficha catalográfica

CIP – CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

F984p Furini, Thatielen.

Prospecção e quantificação de DNA nuclear de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* (Bixaceae) / Thatielen Furini. – Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2021.

54 f. ; 30 cm. (ilustrações) II.

Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação *Stricto Sensu* (Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2021.

Orientadora: Dra. Isane Vera
Karsburg. Coorientador: Dr. José
Martins Fernandes.

1. Amazônia. 2. Pré-Melhoramento. 3. Urucum. I. Karsburg, I.
V., Dra. II. Fernandes, J. M., Dr. III. Título.

CDU 582.685.6

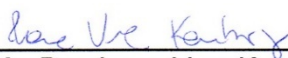
Prospecção e quantificação do DNA nuclear de *Bixa arborea* e *Bixa orellana*
(Bixaceae)

THATIELEN FURINI

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE MATO GROSSO Carlos
Alberto Reyes Maldonado, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento de Plantas para
a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 01 de março de 2021.

Comissão Examinadora



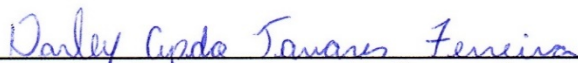
Profa. Dra. Isane Vera Karsburg

Orientadora – UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos
Alberto Reyes Maldonado



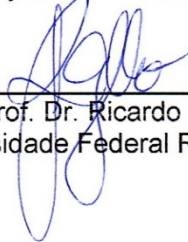
Prof Dr. José Martins Fernandes

Coorientador – UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos
Alberto Reyes Maldonado



Prof. Dr. Darley Aparecido Tavares Ferreira

UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto
Reyes Maldonado



Prof. Dr. Ricardo Gallo

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus que se faz sempre presente nos pequenos e grandes momentos da minha vida, que me permitiu lutar e alcançar os objetivos almejados, por iluminar meu caminho e guiar meus passos. Agradeço também pelas lições, experiências e dificuldades encontradas ao longo dessa jornada, tornando-me ainda mais forte. Obrigada Senhor, por me dares bem mais do que eu preciso e me abençoaes muito mais do que eu mereço. Gratidão por tudo que sou, por tudo que tenho e sei que devo a minha felicidade a Ele.

À minha família, aqueles que constituem a base dessa conquista. Aos meus pais Antônio Furini e Vera Lucia Lino Furini, pelo amor incondicional, carinho, incentivo e pelas lições de vida. Meus irmãos Suellen, Natália e Antônio Gabriel pelo carinho, apoio, confiança e amizade. Todos foram fundamentais para o término do mestrado.

Aos meus amigos Leandro Correia e Juliane Zortea, que disponibilizaram o local e os materiais vegetais para que fosse possível o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Carlos Eduardo Felito, pelo companheirismo, paciência, apoio psicológico, pela força e dedicação transmitida na obtenção desse título de Mestre.

À Universidade Estadual de Mato Grosso-UNEMAT e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP), pelo incentivo e pela oportunidade de realização desse curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora prof.^a. Dr.^a. Isane Vera Karsburg pela oportunidade de desenvolver esse trabalho com uma ótima orientação, pela sua imensa disponibilidade, dedicação, amizade, paciência e confiança. Pelas oportunidades que me proporcionou e por todo o estímulo e incentivo na orientação desse trabalho, compartilhando comigo o seu conhecimento, tanto profissional quanto pessoal. Fui privilegiada em ser sua orientanda.

Ao meu coorientador prof. Dr. José Martins Fernandes, por ser tão prestativo mesmo diante desse período atípico que enfrentamos com a pandemia da Covid-19, não medindo esforços a me auxiliar e ajudar no estudo morfológico das espécies de *Bixa*.

Ao professor, Dr. Darley Aparecido Tavares Ferreira, pela troca de conhecimento, e esclarecimentos de dúvidas durante as análises estatísticas e por aceitar compor a banca de qualificação, agregando conhecimento a este estudo.

Ao Dr. Ricardo Gallo, que tão gentilmente aceitou participar da banca examinadora e colaborar com esta dissertação.

À prof.^a Dr.^a Célia Regina Araújo Soares Lopes por ceder o espaço do Herbário da Amazônia Meridional (HERBAM) para identificação e estudo morfológico das espécies de *Bixa*.

À técnica M.Sc Lúgia Eburneo pela oportunidade de utilizar o laboratório de Didática do Departamento de Biologia da UNEMAT, pela sua atenção, disponibilidade e carinho com que sempre me recebeu, além da grande amizade e incentivo na realização deste trabalho.

À toda equipe do PGMP, pelo apoio durante o mestrado e a todos os professores da pós-graduação, pelos ensinamentos passados para meu conhecimento profissional.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e da Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias em geral e particularmente à Viviane e Rosemeire, pelo auxílio e colaboração sempre que requisitados.

Ao meu grande amigo de coração Joelson de Oliveira Barros, por ser uma pessoa verdadeira e especial a quem tenho um grande apreço e admiração, pelos momentos de consolos, de conversas, de choros, de risadas, pelo carinho, pela diversão até mesmo nos dias tensos de estudos e desesperos compartilhados que passamos juntos nessa jornada, pelas dicas de estudos e principalmente pelo companheirismo e sinceridade.

Aos colegas do laboratório de Citogenética Vegetal e Cultura de Tecidos, Douglas Machado Leite, Leira Pereira Ramos Neves, Mariana Kaori Sasaya pelo companheirismo, auxílio, trocas de conhecimento, apoio e diversão no ambiente de estudo.

Aos amigos que me ajudaram nos trabalhos de campo, sacrificando finais de semana, em prol da ciência: João Paulo Medeiros Schmitt e Luiz Fernando Scatola. Essa dupla foi realmente muito eficiente e divertida.

Aos amigos do Laboratório de Sementes Samiele Camargo de Oliveira Domingues e Edmar Santos Moreira por serem prestativos e sempre dispostos a me ajudar nos momentos que necessitei, gratidão a vocês!!!!

Aos amigos que conquistei: Marcos Vinícius Pazdiora Poletto e Luiz Felipe Gonçalves de Mello Bernardes pelos auxílios na elaboração dos mapas e “altas risadas” para aliviar a ansiedade e o estresse durante essa jornada.

À pesquisadora Bruna Natália Veloso dos Santos e Dr. Wellington Clarindo pela disponibilidade e auxílio na preparação e análise das amostras de citometria de fluxo realizado na Universidade Federal de Viçosa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, a minha eterna gratidão a vocês.

São em momentos assim que analiso o quanto é difícil e complexo escrever uma dissertação.... Muitos dizem que é doloroso escrever uma dissertação, mas na minha opinião, a maior dificuldade mesmo é agradecer a todos aqueles que de alguma maneira estão envolvidos durante este processo. Espero não ter me esquecido de ninguém.

BIOGRAFIA

Thatielen Furini – nascida em 16 de fevereiro de 1983, natural de Alta Floresta-MT, filha de Antonio Furini e Vera Lucia Lino Furini. Residiu na cidade de Londrina-PR, onde concluiu o ensino médio no Colégio Metropolitano no ano de 2000. Em 2005, diplomou-se em Bacharel como Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Norte do Paraná e no ano de 2016 Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso. Em 2019, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, na UNEMAT, sob a orientação da prof.^a Dr.^a Isane Vera Karsburg na linha de pesquisa de Biotecnologia e recursos genéticos vegetais, trabalhando com caracterização morfométrica, biometria de frutos e citometria de fluxo com duas espécies do gênero *Bixa*, submetendo-se à defesa da dissertação em março de 2021.

Uru-ku

Urucum do urucuzeiro
Plantado, secado e esfolado no terreiro
Minha genética no seio
Sua genética no meio

Planta ancestral
Vulgar
Tal Colorau
Um pó que tinge
Tão fino que voa
Iguaria que tempera

Vi Pé vermelho pintar a boca
Manchar vestimentas por inteiro

Sua porção corante vem duns grãos
De um ouriço verde,
cheio de sementes

Willians Andrey

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Gênero <i>Bixa</i>	2
2.2 Caracterização morfoagronômica	3
2.3 Citometria de fluxo	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
4. CAPÍTULO 1- Morfologia fenotípica de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> (Bixaceae) em Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil.....	9
Resumo	9
Abstract	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1 Área de estudo e obtenção do material vegetal	13
2.2 Estudo morfológico dos fenótipos de <i>Bixa</i>	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4. CONCLUSÕES	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
5. CAPÍTULO 2- Quantificação do DNA nuclear e caracterização biométrica dos frutos de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i>	36
Resumo	36
Abstract.....	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 – Área de estudo	39
2.2 – Obtenção do material vegetal.....	39
2.3 – Estudo biométrico dos frutos e sementes.....	44
2.4 – Citometria de fluxo.....	44
2.4.1 – Coleta do material vegetativo	44
2.4.2 – Extrações dos fragmentos foliares	44
2.4.3 – Extração do conteúdo de DNA nuclear.....	44
2.4.4 – Processamento e quantificação do DNA	44

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4. CONCLUSÕES.....	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1- Morfologia fenotípica de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> (Bixaceae) em Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil.....	14
Figura 1. Localização das áreas de coleta de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> no município de Alta Floresta - MT, Brasil.	14
Figura 2. Áreas de coleta das espécies <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> no município de Alta Floresta – MT (2020).....	14
Figura 3. Início da análise de caracterização morfológica dos fenótipos de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> no HERBAM.	15
Figura 4. <i>Bixa arborea</i> fenótipo 1 - A. ramo com folhas, B. fruto, C. semente; <i>Bixa arborea</i> fenótipo 2 - D. folha, E. fruto; <i>Bixa arborea</i> fenótipo 3 – F. folha, G. inflorescência, H. gineceu, I. fruto.	20
Figura 5. Área de localização de <i>Bixa arborea</i> Huber fenótipo 1. Alta Floresta – MT (2020).....	21
Figura 6. Área de localização de <i>Bixa arborea</i> Huber fenótipo 2. Alta Floresta – MT (2020).	22
Figura 7. Área de localização de <i>Bixa arborea</i> Huber fenótipo 3. Alta Floresta – MT (2020).....	23
Figura 8. <i>Bixa arborea</i> fenótipo 4 – A. ramo com folhas, B. fruto; <i>Bixa arborea</i> fenótipo 5 – C. folha, D. fruto; <i>Bixa arborea</i> fenótipo 6 – E. folha, F. fruto.	24
Figura 9. Área de localização de <i>Bixa arborea</i> Huber fenótipo 4. Alta Floresta – MT (2020).....	25
Figura 10. Área de localização de <i>Bixa arborea</i> Huber fenótipo 5. Alta Floresta – MT (2020).....	26
Figura 11. Área de localização de <i>Bixa arborea</i> Huber fenótipo 6. Alta Floresta – MT (2020).....	27
Figura 12. <i>Bixa orellana</i> – A. ramo com folhas, B. Inflorescência, C. Gineceu, D. frutos, E. semente.	28
Figura 13. Área de localização de <i>Bixa orellana</i> fenótipo 7. Alta Floresta – MT (2020).. ..	30
Capítulo 2. Quantificação do DNA nuclear e caracterização biométrica dos frutos de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i>	36

Figura 1. Localização das espécies de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> estudadas no município de Alta Floresta – MT (2020).	40
Figura 2. Aspectos morfológicos dos frutos de <i>Bixa arborea</i> (G1 a G6) e <i>Bixa orellana</i>	41
Figura 3. Procedimentos metodológicos utilizados durante a realização das análises biométricas de <i>B. arborea</i> . A: Seleção de 30 frutos; B: peso do fruto; C: comprimento total do fruto; D: largura total do fruto; E: espessura do fruto; F: peso e contagem do número de sementes por fruto; G: espessura do pericarpo; H: peso do pericarpo.....	41
Figura 4. Procedimentos metodológicos utilizados durante a realização das análises biométricas de <i>B. orellana</i> . A: Seleção de 30 frutos; B: peso do fruto; C: comprimento total do fruto; D: largura total do fruto; E: espessura do fruto; F: peso e contagem do número de sementes por fruto; G: espessura do pericarpo; H: peso do pericarpo. ...	42
Figura 5. Diagrama metodológico para análise do conteúdo de DNA nuclear dos tecidos foliares de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> por citometria de fluxo. Alta Floresta – MT (2020).	43
Figura 6. Dendrograma obtido pelo método UPGMA para seis genótipos de <i>Bixa arborea</i> e um genótipo de <i>Bixa orellana</i> em Alta Floresta – MT.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de DNA (em pg) apresentado nas repetições de cada um dos genótipos analisados através da Citometria de Fluxo.....	45
Tabela 2. Contribuição relativa de oito variáveis para a divergência genética conforme Singh (1981) dos frutos de <i>Bixa arborea</i> e <i>Bixa orellana</i> em Alta Floresta - MT.....	48

RESUMO

FURINI, Thatielen; M. Sc; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Calos Alberto Reyes Maldonado; março de 2021. Prospecção e quantificação do DNA nuclear de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* (Bixaceae). Professora Orientadora: Dr.^a Isane Vera Karsburg. Coorientador: Prof. Dr. José Martins Fernandes

O Brasil é o país mais rico em biodiversidade, apresentando a maior riqueza em espécies vegetais. *Bixa arborea* e *Bixa orellana*, são duas espécies vegetais semelhantes da família Bixaceae, com ampla distribuição na América do Sul e largamente usada pela população tradicional. As espécies do gênero *Bixa* apresentam um pigmento nas sementes, que vem sendo utilizado pelas populações nativas da América por muito tempo, principalmente na ornamentação do corpo e de utensílios. Hoje, sabe-se que esse pigmento e as folhas de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* são ricos em carotenoides, compostos antioxidantes e vitaminas. Devido à alta concentração desses compostos fitoquímicos, *Bixa orellana* é muito utilizada na indústria alimentícia e têxtil (como corante) e na indústria farmacêutica e de cosmético, além de ser utilizada como fitoterápicos pela população. *Bixa arborea*, além do uso fitoterápico, também é muito empregada na restauração florestal e como fonte de madeira. Nesse contexto, é de extrema importância compreender melhor a morfologia e a genética de *B. arborea* de *B. orellana*, por meio da descrição taxonômica das espécies e da quantificação de DNA nuclear das mesmas, aumentando ainda mais o conhecimento acerca dessas espécies. Também buscou analisar se havia diferença morfológica e genética entre os espécimes de *B. arborea*, para saber se havia a existência de híbridos na população analisada. Para isso, foi realizada a biometria dos frutos e descrição morfológica das duas espécies, além de análise do conteúdo de DNA por meio de citometria de fluxo. A partir disso, foi possível perceber que as duas espécies apresentam muitas semelhanças morfológicas, diferindo basicamente uma da outra pelo aspecto do fruto: *B. arborea* apresentou frutos papilhosos ou parcialmente cobertos por espinhos não flexíveis com comprimento variando de 0,1-1,8 mm, 1–15 sementes, enquanto *B. orellana* apresenta frutos totalmente cobertos por espinhos flexíveis, 40 sementes em média e com comprimento variando de 4 a 9,6 mm. Os espécimes de *B. arborea* apresentaram diferenças morfológicas pontuais, como maior número de estames das flores (fenótipo 3), presença de espinhos no fruto (fenótipo 5 e 6), ausência de espinhos nos frutos (fenótipos 1 e 2) e presença de fruto com ápice mucronatiforme longo (fenótipo 4, 5 e 6), sendo o único fenótipo com essa característica. A quantidade de DNA nuclear não apresentou diferença significativa entre as duas espécies e entre os indivíduos de *B. arborea*, no entanto, encontramos diferenças morfológicas entre as duas espécies, diferindo no formato do fruto, na presença de pelos e no número de sementes. Isso mostra que as espécies são muito próximas geneticamente e, portanto, muito aparentadas. Dessa forma, podemos concluir que as duas espécies não possuem diferenças significativas no tamanho do genoma, apenas em caracteres morfológicos dos frutos e sementes. Isso mostra que os caracteres morfológicos são estruturas chave na identificação desses organismos.

Palavras-chave: Amazônia; Pré-melhoramento; Urucum.

ABSTRACT

FURINI, Thatielen; M. Sc; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Calos Alberto Reyes Maldonado; March 2021. Prospection and quantification of the nuclear DNA of *Bixa arborea* and *Bixa orellana* (Bixaceae). Advisor: Dr^a Isane Vera Karsburg. Co-advisor: Prof Dr. José Martins Fernandes

Brazil is the country richest in biodiversity, changing the greatest wealth in plant species. *Bixa arborea* and *Bixa orellana*, are two similar plant species of the Bixaceae family, with wide distribution in South America, and widely used by the traditional population. The species of the genus *Bixa* present a pigment in the seeds, which has been used by the native populations of America for a long time, mainly in the ornamentation of the body and objects. Today, it is known that this pigment and the leaves of *Bixa arborea* and *Bixa orellana* are rich in carotenoids, antioxidant compounds and vitamins. Required to a high concentration of phytochemicals, *Bixa orellana* is widely used in the food and textile industry (as a dye) and in the pharmaceutical and cosmetic industry, in addition to being used as herbal medicines by the population. *Bixa arborea* besides phytotherapeutic use, is also widely used in forest restoration and as a source of wood. In this context, it is extremely important to better understand the morphology and genetics of *B. arborea* of *B. orellana*, through the taxonomic description of the species and the quantification of nuclear DNA of the species. It also sought to analyze whether there was a morphological and genetic difference between the specimens of *B. arborea*, to find out if there were hybrids in the analyzed population. For this, the biometrics of the fruits and the morphological description of the two species were carried out, in addition to the analysis of the DNA content by means of flow cytometry. From this, it was possible to perceive that the two species present many morphological similarities, differing basically from each other by the aspect of the fruit: *B. arborea* presented papulous fruits or partially covered by non-flexible spines with length varying from 0,1-1,8 mm, 1–15 seeds, while *B. orellana* presents fruits completely covered by flexible spines and with length varying from 4 to 9.6 mm. The specimens of *B. arborea*, specific morphological differences, such as a greater number of flower stamens (phenotype 3), presence of thorns in the fruit (phenotype 5 and 6), absence of thorns in the fruit (phenotypes 1 and 2) and presence of fruit with long mucronatiform apex (as a phenotype), being the only phenotype with this characteristic. The amount of nuclear DNA showed no difference between the two species and between *B. arborea* itself, however, we found morphological differences between the two species, differing in the shape of the fruit, the presence of hair and the number of seeds. This shows that the species are very close genetically and, therefore, very related. Thus, we can conclude that the two species have no differences due to the size of the genome, only in morphology of the fruits and seeds. This shows that the morphological characters are key structures in the identification of these organisms.

Key words: Amazon; Pre-breeding; Annatto.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e possui a flora mais diversa do mundo, com 49,989 espécies (BABY et al., 2005; CALIXTO, 2005; BFG, 2018; FLORA DO BRASIL, 2020). Muitas espécies vegetais são exploradas pela população para fins alimentícios e têm potencial comercial (COSTA, 2007). Outras, além da importância alimentícia, também configuram como importantes fontes fitoterápicas sendo largamente utilizadas como medicação (COSTA, 2007; NETO et al., 2018). Entre estas plantas temos as espécies do gênero *Bixa*, conhecidas como urucum (GARCIA et al., 2012; PILLAI et al., 2018). No Brasil, ocorrem as espécies *Bixa arborea* Huber, *Bixa excelsa* Gleason & Krukoff e *Bixa orellana* L. (ANTAR, 2020).

B. arborea e *B. orellana*, embora sejam duas espécies nativas do Brasil, não são endêmicas do nosso território, ocorrendo de forma nativa em toda a América do Sul e atualmente presente em plantações na África e na Ásia (RADDATZ-MOTA et al., 2017). As duas espécies são morfologicamente próximas e são exploradas pela população (LORENZI e MATOS, 2008). *B. orellana* é usada para a extração do pigmento como fonte fitoterápica e *B. arborea* é utilizada na restauração florestal, como fonte de madeira, por apresentar crescimento rápido e também em tratamentos fitoterápicos (LORENZI e MATOS, 2008; CASTRO et al., 2009; RADDATZ-MOTA et al., 2017).

O pigmento de *B. orellana* é largamente utilizado pela indústria alimentícia como corante, por apresentar altos teores de bixina e carotenoides, substâncias que proporcionam às sementes a cor laranja-avermelhada (RADDATZ-MOTA et al., 2017). Esse pigmento é muito utilizado também *in natura* pelas comunidades tradicionais (CASTRO et al., 2009; NETO et al., 2018; SILVA et al., 2018; DEQUIGIOVANNI et al., 2018).

O gênero *Bixa* apresenta uma ampla diversidade de espécies que apresentam alta variabilidade genética (DIAS et al., 2017; ANTAR, 2020). Assim, estudos morfoagronômicos e genéticos para as duas espécies mencionadas são importantes por apresentarem uso popular, valor comercial e utilizadas na recuperação de áreas degradadas (RADDATZ-MOTA et al., 2017). Desenvolver estudos que possam contribuir na caracterização cromossômica e fenotípica, permitem o melhoramento genético das mesmas.

Atualmente uma das maiores preocupações dos programas de melhoramento genético se baseia no fenômeno conhecido como gargalo de fenotipagem (*phenotyping bottleneck*), ou seja, na lacuna de informações que existe hoje acerca da relação entre fenótipo e genótipo (DHONDT et al., 2013; SANTOS & YASSITEPE, 2014). Nesse contexto, um dos maiores desafios para estudos de melhoramento genético, estudos evolutivos e genéticos, é entender como as características morfológicas da planta estão relacionadas com o genótipo e com outros fatores externos à planta (DHONDT et al., 2013). Portanto, estudos que caracterizam o genótipo e o fenótipo das plantas é essencial para auxiliar no processo de seleção de variedades mais adequadas ao cultivo e ao mercado consumidor, entender a biologia, conhecer o histórico evolutivo, relações filogenéticas e ecológicas.

Nesse contexto, o trabalho tem como finalidade realizar a descrição morfológica, biométrica e quantificação do DNA nuclear de duas espécies botânicas muito utilizadas na alimentação e também para fins fitoterápicos, *B. arborea* e *B. orellana*. Pela semelhança entre as duas espécies, no primeiro capítulo iremos (i) diferenciar uma espécie da outra morfológicamente e (ii) analisar a existência de diferenças entre os fenótipos de *B. arborea*; e no segundo capítulo faremos (i) a quantificação do DNA nuclear das duas espécies para diferenciá-las geneticamente uma da outra e (ii) a biometria dos frutos para entender a relação entre fenótipo e genótipo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Bixa*

O gênero *Bixa* L. está representado por cinco espécies com distribuição na América Tropical, pertencente à família Bixaceae Kunth, ordem Malvales Berchtold & J. Presl (STEVENSON, 2001 em diante; SILVA et al., 2018). As suas espécies são conhecidas como urucum e muito utilizadas pela população para diversos fins: alimentícios, medicinais, ornamentais e mais recentemente, para restauração florestal (LORENZI e MATOS, 2008; GARCIA et al., 2012; PILLAI et al., 2018).

As espécies desse gênero apresentam liberação de seiva amarelada ou avermelhada, com inflorescências terminais, paniculares e flores actinomorfas; os

frutos são constituídos por cápsulas loculicidas, bivalvares, inermes ou com espinhos flexíveis; e, inúmeras sementes glabras e de cor variando do laranja ao vermelho (ANTAR, 2020).

As três espécies de *Bixa* que ocorrem no Brasil podem se apresentar como arbustos ou árvores de até 5 metros de altura, ocorrendo em quase todos os biomas brasileiros, em áreas de terra firme ou em ambientes úmidos, como em várzeas e em matas de galeria (NETO et al., 2018; ANTAR, 2020).

B. arborea e *B. orellana* estão entre as três espécies que ocorrem no Brasil. Foco do presente estudo, *B. Arborea*, pode ser encontrada como arbusto ou árvore e apresenta como características morfológicas diagnósticas as folhas com base arredondadas, ausência ou presença de nectários extraflorais inconspícuos no ápice dos pedicelos e frutos achatados e inermes (ANTAR, 2020). Ainda, de acordo com Antar (2020), a espécie é nativa do Brasil, embora não endêmica, presente em florestas de terra firme e pluvial, bem como, em matas de galeria e ciliares nos domínios fitogeográficos da Amazônia e Mata Atlântica.

B. orellana é encontrada na forma de árvore ou arbusto, com a base das folhas truncadas ou cordadas, nectários extraflorais conspícuos no ápice dos pedicelos e frutos não achatados com espinhos flexíveis (REVILLA, 2001; ANTAR, 2020). Ocorre na Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, em matas de galeria e ciliares, florestas de terra firme e de várzea, em áreas de savana amazônica, restinga e em florestas pluviais e estacionais semidecíduais (ANTAR, 2020).

2.2 Caracterização morfoagronômica

O Brasil é um país rico em espécies vegetais (CALIXTO, 2005) as quais possuem uma ampla gama de utilização pela população, pela indústria alimentícia, na ornamentação e restauração florestal.

No entanto, dessa diversidade apenas 10% tiveram seu potencial genético analisado (TRAESSEL et al., 2017). Um dos métodos para analisar a diversidade genética das espécies, muitas vezes para embasar estudos de melhoramento vegetal, é se basear nas características morfológicas das espécies (SHIMOYA et al., 2002).

Estudos morfoagronômicos permitem entender como os fenótipos respondem às características ambientais (VIANA et al., 2009; MENEZES et al., 2011), também

permitem enriquecer os estudos genéticos, pois aumenta o conhecimento sobre a diversidade (GONÇALVES et al., 2014) o que possibilita subsídio para o desenvolvimento e aprimoramento dos programas de melhoramento genético (CRUZ et al., 2014). Estudos morfológicos das espécies vegetais, realizados por meio das análises dos caracteres morfoagronômicos são úteis para selecionar culturas cada vez mais produtivas (FUKUDA, 1999).

2.3 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo surgiu durante a segunda guerra mundial como uma ferramenta para testar as máscaras de gás e avaliar possíveis micropartículas nocivas presentes em aerossóis (COSTA, 2018). Essa técnica consiste de um sistema em que células coradas passam por um detector fotoelétrico e a partir disso é realizada a contagem celular (BRAGA et al., 2016). De acordo com Costa (2018) a técnica se baseia na fluorescência emitida pelas partículas. Essa fluorescência, em seguida, será convertida em gráficos, a partir dos quais pode-se analisar o cariótipo das espécies.

Após seu desenvolvimento, por muito tempo o uso da citometria de fluxo ficou restrita ao estudo do DNA humano (BRAGA et al., 2016), mas a partir da década de 80, essa técnica passou a ser empregada em estudos de células vegetais (DOLEZEL, 1997).

Cavalier-Smith (1985) apontam que os estudos relacionados à quantificação do DNA em plantas estão ligados ao questionamento sobre o porquê de alguns organismos eucariontes apresentarem um número tão superior de genes, sendo que esse número não se relaciona com o grau de complexidade apresentado pelo organismo, levando os pesquisadores ao chamado paradoxo C (sendo C utilizado para expressar o tamanho do genoma) surgindo a partir daí inúmeros questionamentos e pesquisas correlacionadas, ampliando assim a utilização de métodos como citometria de fluxo.

Pela razão de grande parte do DNA dos eucariotos estar presente no núcleo da célula, a citometria de fluxo tem demonstrado ser uma ótima metodologia para realizar a contagem do DNA (LOUREIRO e SANTOS, 2007). Essa quantificação do DNA mostrou-se muito relevante nos processos de classificação dos nucleótipos e no

entendimento de como o material genético e celular responde aos estímulos externos (BRAGA et al., 2016).

A vantagem em utilizar citometria de fluxo reside na facilidade e rapidez no preparo da amostra, o que permite à análise de muitas amostras e muitos núcleos, detecta diferença nas quantidades de DNA e pode se utilizar qualquer tipo de tecido (BENNET e LEITCH, 1995). A citometria de fluxo é utilizada em estudos de melhoramento de plantas, para avaliar aberrações cromossômicas, verificar níveis de ploidia a partir de cruzamentos, além de permitir identificar híbrido (DOLEZEL, 1997).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABY, A. R.; MACIEL, C. P. M.; SANTOS, I. M. N. S.; DIAS, T. C. de S.; KANEKO, T.M; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R. Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, vol. 17, n. 1, pp. 78-82, 2005.
- BENNET, M. D., LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, vol. 76, pp. 113-176, 1995.
- BFG - The Brazil Flora Group Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, vol. 69, n. 4, pp. 1513-1527, 2018.
- BRAGA, K. M. S. PIMENTA, V. S. C.; RODRIGUES, F. A. SANTOS, T. P. ARAÚJO, E. G. Citometria de Fluxo: Histórico, Princípios Básicos e Aplicações em Pesquisa. **Enciclopédia Biosfera**, vol.13 n. 23, pp. 303-319, 2016.
- CALIXTO, J. B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal Ethnopharmacol.** vol. 100, pp. 131–134, 2005.
- CASTRO, C. B.; MARTINS, C. S.; FALES, I. C.; NAZARE, R. F. R.; KATO, O. H.; BENCHIMOL, R. L.; VENTURIERI, M. M. A Cultura do Urucum. Brasília, **Embrapa Informação Tecnológica**, ed. 2ª, p. 61, 2009.
- CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote gene numbers, non-coding DNA and genome size. In: CAVALIER SMITH, T. **The evolution of genome size**. Chichester: John Wiley & Sons, pp.1-36, 1985.
- COSTA, C. K. **Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e Aplicação de seu óleo em formulação cosmética**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, p. 115, 2007.
- COSTA, L. A. S. **Primeira lista de plantas tropicais propostas como padrões de referência para estimativa de tamanho do genoma por citometria de fluxo**. Dissertação. Recife, PE, p. 84, 2018.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: Editora Viçosa, vol. 2, p. 668, 2014.
- DEQUIGIOVANNI, G.; RAMOS, S. L. F.; ALVES-PEREIRA, A.; FABRI, E. G.; PICANÇO-RODRIGUES, D.; CLEMENT, C. R.; GEPTS, P.; VEASEY, E. A. Highly structured genetic diversity of *Bixa orellana* var. *urucurana*, the wild ancestor of annatto, in Brazilian Amazonia. **PLoS ONE**, vol. 13, n. 6, pp. 1-19, 2018.
- DHONDT, S.; WUYTS, N.; INZÉ, D. Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. **Trends in Plant Science**, vol.18, n. 8, pp. 428-439, 2013.
- DIAS, N. O.; REBOUCAS, T. N. H; SAO JOSE, A. R; AMARAL, C. L. F. Morpho-agronomic characterization and estimates of genetic parameters in annatto plant. **Horticultura Brasileira**, vol. 35, n. 2, 2017.
- DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: WUV-Universitätsverlag, pp.80-90, 1997.

FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 01 mar. 2021

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. S. O.; PORTO, M. C. M. **Caracterização e avaliação de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, p.161, 1998.

GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, vol. 42, n. 8, pp. 1510-1517, 2012.

GONÇALVES, D. L.; AMBROZIO, V. C.; BARELLI, M. A. A.; NEVES, L. G.; SOBRINHO, S. P.; LUZ, P. B.; SILVA, C. R. Divergência genética de acessos tradicionais de feijoeiros através de características da semente. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, pp. 1671-1681, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2ª. ed. p. 544, 2008.

LOUREIRO, J.C.M., SANTOS C. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal**. Tese, Universidade de Aveiro, Portugal, Aveiro, p. 246, 2007.

MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; LOPES, H. M.; PEREIRA, M. B. Caracterização morfoagronômica em arroz vermelho e arroz de sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol. 41, n. 4, pp. 490-499, 2011.

NETO, A. C. A.; SANTOS, O. O.; FERREIRA, D. M.; NUNES, R. T. C.; PÚBLIO, A. P. P. B.; AMARAL, C. L. F. Germination and vigor of *Bixa orellana* L. seeds pre-soaked in a plant biostimulant. **Floresta**, Curitiba, vol. 48, n. 3, pp. 293-302, 2018.

PILLAI, S.; SONI, S.; DHULAP, S.; HIRWANI, R. R. Pharmacological and cosmeceutical applications of *Bixa orellana* L.: a review of the scientific and patent literature. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, vol. 9, n. 4, pp. 281-289, 2018.

RADDATZ-MOTA, D.; PÉREZ-FLORES, L. J.; CARRARI, F.; MENDOZAESPINOZA, J. A.; LEÓN-SÁNCHEZ, F. D.; PINZÓN-LÓPEZ, L. L.; GODOY-HERNÁNDEZ, G.; RIVERA-CABRERA, F. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of Food, Science and Technology**, vol. 54, n. 6, pp.1729–1741, 2017.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus, **Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico**, 2ª ed. pp. 201-205, 2001.

SANTOS, T. T.; YASSITEPE, J. E. C. T. Fenotipagem de plantas em larga escala: um novo campo de aplicação para a visão computacional na agricultura. In: MASSRUHÁ, S. M. F. S.; LEITE, M. A. A.; LUCHIARI JUNIOR, A.; ROMANI, L. A. S. **Tecnologias da Informação e Comunicação e suas relações com a agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, p. 85–100, 2014.

SHIMOYA, A.; PEREIRA, A. V.; FERREIRA, R. P.; CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Repetibilidade de características forrageiras do capim-elefante. **Scientia Agricola**, vol. 59, pp. 227-234, 2002.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. RIVERA-MADRID, R. The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (Achiote). **Planta**, vol. 248, pp. 267–277, 2018.

STEVENS, P. F. (2001 em diante) Angiosperm phylogeny website, Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. Available at <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>>. Access on 26 September 2020.

TRAESEL, G. K.; DE ARAÚJO, F. H. S.; CASTRO, L. H. A.; DE LIMA, F. F.; MENEGATI, S. E. L. T.; JUSTI, P. N.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; ARGANDOÑA, E. J. S.; OESTERREICH, A. S. Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. **Journal of Medicinal Food**. v. 20, p. 804-811, 2017.

VIANA, B. L.; MELLO, A. C. L.; LIRA, M. A.; DUBEUX JÚNIOR, J. C. B.; SANTOS, M.V. F.; CUNHA, M. V.; FERREIRA, G. D. G. Repetibilidade e respostas de características morfofisiológicas e produtivas de capim-elefante de porte baixo sob pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 44, n.12, pp. 1731-1738, 2009.

4. CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA FENOTÍPICA DE *Bixa arborea* e *Bixa orellana* (Bixaceae) EM ALTA FLORESTA, MATO GROSSO, BRASIL

FURINI, Thatielen; M. Sc; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Calos Alberto Reyes Maldonado; março de 2021. Morfologia fenotípica de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* (Bixaceae) em Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. Professora Orientadora: Dr.^a Isane Vera Karsburg. Coorientador: Prof. Dr. José Martins Fernandes.

RESUMO

Bixa arborea e *Bixa orellana*, são duas espécies vegetais da família Bixaceae, com ampla distribuição na América do Sul e largamente usada pela população tradicional. As espécies do gênero *Bixa* apresentam um pigmento avermelhado nas sementes, que vem sendo utilizado pelas populações nativas por muito tempo. Os compostos fitoquímicos presentes nas sementes de *Bixa orellana* também são muito utilizados na indústria alimentícia e têxtil (como corante). *Bixa arborea* além do uso fitoterápico das folhas, também é muito empregada na restauração florestal e como fonte de madeira. Nesse contexto, é de extrema importância diferenciar *B. arborea* de *B. orellana* por meio de diagnoses morfológicas para compreender melhor os caracteres que separam as duas espécies. Também buscou analisar as diferenças morfológicas existentes entre os espécimes de *B. arborea*, para avaliar a existência de híbridos na população analisada. Para isso, foi realizado diagnoses morfológicas para as duas espécies. A partir disso, foi possível perceber que as duas espécies apresentam muitas semelhanças morfológicas, diferindo basicamente uma da outra pelo aspecto do fruto: *B. arborea* apresentou frutos papilhosos ou parcialmente cobertos por espinhos não flexíveis com comprimento variando de 0,1-1,8 mm, enquanto *B. orellana* apresenta frutos totalmente cobertos por espinhos flexíveis e com comprimento variando de 4 a 9,6 mm. A quantidade média de sementes nos frutos de *B. orellana* foi maior que o encontrado nos frutos de *B. arborea*. Portanto, nosso trabalho mostrou que as duas espécies apresentam diferenças fenotípicas, as quais podem ser utilizadas na identificação e diferenciação uma da outra.

Palavras-chave: caracteres morfoagronômicos; urucum; colorau

ABSTRACT

Bixa arborea and *Bixa orellana*, are two plant species of the Bixaceae family, with wide distribution in South America, and widely used by the traditional population. The species of the genus *Bixa* have a red to reddish pigment in the seeds, which has been used by native populations for a long time. The phytochemicals present in the seeds of *Bixa orellana* are also widely used in the food and textile industry (as a dye). *Bixa arborea*, in addition to the phytotherapeutic use of leaves, is also widely used in forest restoration and as a source of wood. In this context, it is extremely important to

differentiate *B. arborea* from *B. orellana* by means of morphological diagnoses to better understand the characters that separate the two species. It also sought to analyze the morphological differences between *B. arborea* specimens, to assess the existence of hybrids in the analyzed population. For this, morphological diagnoses were carried out for both species. From this, it was possible to notice that the two species have many morphological similarities, differing basically from each other by the aspect of the fruit: *B. arborea* presented papulous fruits or partially covered by non-flexible spines with length ranging from 0.1-1.8 mm, while *B. orellana* presents fruits totally covered by flexible spines and with length varying from 4 to 9.6 mm. The average amount of seeds in the fruits of *B. orellana* was higher than that found in the fruits of *B. arborea*. Therefore, our work showed that the two species show phenotypic differences, which can be used to identify and differentiate one from the other.

Keywords: morpho-agronomic characters; annatto; paprika

1. INTRODUÇÃO

A família Bixaceae, ordem Malvales, possui distribuição pantropical, representada por quatro gêneros e 21 espécies (STEVENS, 2001 em diante; APG, 2016). É caracterizada pela presença de canais secretores; células não vasculares como acúmulo de resina; tricomas glandulares e tricomas tectores unicelulares; folhas alternas; inflorescência terminal; flores maiores que 2,5 cm de diâmetro; parede celular anelar, desenvolvimento centrífugo, 5 ou 10 traços fasciculares; estigma ligeiramente lobulado; muitos óvulos por carpelo, micrópila em zigue-zague, funículos longos; cotilédones espatulados, curvados ou dobrados (STEVENS, 2001 em diante; SOUZA e LORENZI, 2019).

No Brasil, a família está amplamente distribuída em todo o seu território, constituída pelos gêneros *Bixa* L. (*B. arborea* Huber, *B. excelsa* Gleason & Krukoff, *B. orellana* L.) e *Cochlospermum* Kunth (*C. orinocense* (Kunth) Steud., *C. regium* (Mart. ex Schrank) Pilg. e *C. vitifolium* (Willd.) Spreng.), com total de seis espécies (ANTAR, 2020).

O gênero *Bixa* é nativo na América Tropical e possui cinco espécies, caracterizado como árvores; presença de flavonas, flavonóis, sulfatos de flavonoides e ausência de taninos não hidrolisáveis; pecíolo com feixe medular; cálice com glândulas abaxiais emparelhadas, corola imbricada; anteras em forma de U invertido, com poros ou fendas medianas; gineceu 2-4 carpelos, oposto ao cálice, carpelos individuais inicialmente não visíveis, placentação parietal; tegumento externo do óvulo

com 3-6 células, tegumento interno com 4-5 células, tecido parietal com cerca de 2 células, capa nucelar com cerca de 4 células de espessura; fruto suavemente espinhoso; testa polposa; n = 7 (STEVENS, 2001 em diante).

B. orellana é muito utilizada pela população tradicional como fonte de pigmento vermelho (ALONSO, 2004). Esse pigmento é empregado na ornamentação do corpo pelos povos nativos da América e também comercialmente como fonte de corantes naturais utilizados pelas indústrias alimentícias, cosméticas e têxteis (GARCIA et al., 2012; MANTOVANI et al., 2013; DEMCZUK e RIBANI, 2015; RIVERA-MADRID et al., 2016). Além disso, *B. arborea* e *B. orellana* são empregadas na ornamentação, na restauração florestal, preparo de fitoterápico tradicional e na indústria farmacêutica (LORENZI e MATOS, 2008; PILLAI et al., 2018).

Diversas são as características químicas encontradas em *B. arborea* e *B. orellana*, que proporcionam o interesse da indústria (GARCIA et al., 2012; PILLAI et al., 2018). Atualmente, o corante produzido a partir das sementes de *B. orellana* é um dos mais utilizados em todo o mundo, uma vez que as sementes são ricas em carotenoides, bixinas e norbixinas, que garantem a cor avermelhada às sementes (OLIVEIRA, 2005; SOARES et al., 2011).

Embora a utilização de *Bixa* como fonte de pigmento não seja recente, uma vez que as populações nativas da América já a utilizavam para ornamentação do corpo e utensílios, proteção contra picadas de insetos e como proteção solar, nas últimas décadas houve uma preferência pelos sintéticos (CORRÊA e PENNA, 1984; CASTRO et al., 2009), gradualmente substituído por corantes naturais a base de *B. orellana* (MERCADANTE et al., 1997). Atualmente, com a preferência por produtos naturais, o Brasil é um dos maiores produtores de corantes à base de *Bixa*, exportando para diversos países, só em 2017 o país produziu 9.243.475 toneladas de urucum, sendo o maior produtor mundial (MERCADANTE et al., 1997; IBGE, 2019).

A indústria alimentícia é o principal destino dos corantes produzidos a partir de *B. orellana*, onde é empregado para colorir queijos, manteigas e embutidos como salsichas (MOREIRA, 2013). Isso se deve principalmente porque o corante a base de urucum é um dos poucos permitidos pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) (MOREIRA, 2013). Estudos têm mostrado ainda que os produtos à base de *Bixa* são ricos em compostos antioxidantes, usados em carnes e alimentos derivados (GARCIA

et al., 2012; PILLAI et al., 2018). Dessa forma, os compostos antioxidantes podem diminuir a rancidez lipídica de produtos cárneos, como demonstrado por Garcia et al. (2012).

Além dos compostos químicos supracitados, as espécies de *Bixa* utilizadas como fonte de condimento, são ricas em vitaminas A e E (OLIVEIRA et al., 2003), também são utilizadas como fitoterápico contra o câncer, contra doenças oportunistas decorrentes do HIV, como antibiótico e anti-inflamatório (GARCIA et al., 2012; RIVERA-MADRID et al., 2016). A presença de antioxidantes e carotenoides contribuem para bixina ser largamente utilizada na indústria farmacêutica e de cosméticos (PILLAI et al., 2018).

As espécies de *Bixa* possuem uma ampla taxa de variedade genética (DIAS et al., 2017). Dessa forma, estudos morfoagronômicos são necessários para conhecer a morfologia dos diferentes genótipos (AMARAL, 2012). Além de permitir o entendimento de como os espécimes respondem à influência ambiental (FRANCO et al., 2002), inicialmente demonstrada pela morfologia.

A caracterização morfológica e agronômica dos diferentes genótipos de *Bixa*, também permite conhecer a diversidade genética e cria subsídio para estudos de melhoramento genético, facilitando a escolha de genótipos mais viáveis e com maior produtividade (JESUS et al., 2014; FERRAZ et al., 2016). Uma das formas de realizar essa caracterização é através do estudo morfológico dos frutos e sementes, que é uma importante ferramenta para trabalhos de variabilidade genética de uma espécie, pois conhecer a variabilidade fenotípica facilita o processo de melhoramento genético (FENNER, 1993; MACHADO, 2015).

Pelo fato das espécies *B. arborea* e *B. orellana* apresentarem importância tradicional, comercial e na recuperação de áreas degradadas (RADDATZ-MOTA et al., 2017), justifica-se o desenvolvimento de estudos com a caracterização morfoagronômica e, posteriormente, o melhoramento genético de espécimes potenciais.

O capítulo tem como objetivo apresentar a morfologia dos frutos e sementes de fenótipos de *B. arborea* e *B. orellana* no município de Alta Floresta, Mato Grosso, com chave para identificação dos fenótipos, diagnoses morfológicas, ilustrações, fotos e comentários com contribuições de morfologia e ecologia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e obtenção do material vegetal

O município de Alta Floresta está localizado no extremo Norte do estado de Mato Grosso, Brasil (56° 05' 10" W e 09° 52' 32" S), a 830 km da capital Cuiabá; apresenta um clima tropical quente úmido, com temperaturas médias elevadas (23 a 26°C) durante o ano, com máximas diárias de 34 a 37°C; os índices de pluviosidade anual acusam valores de 1.700 a 1.800 mm e ocorrem duas estações climáticas bem definidas - inverno seco e verão chuvoso (ZAPPI et al., 2011; PMAF, 2021).

A vegetação é formada predominantemente por Floresta ombrófila aberta e densa, Floresta estacional semidecidual e decidual e disjunções de cerrado (ZAPPI et al., 2011; PMAF, 2021). As principais atividades econômicas são prestação de serviços (turismo ecológico, bares e restaurantes, supermercados e lojas variadas), agricultura, principalmente soja, milho e arroz e pecuária leiteira e de corte (IBGE, 2021; PMAF, 2021).

Os seis fenótipos de *B. arborea* foram coletados na propriedade de Terezinha Ruella de Oliveira (T.R.O), localizada na Estrada Vicinal 1ª Oeste, à 13km da área urbana de Alta Floresta. O fenótipo de *B. orellana* foi coletado no Bairro Boa Esperança, rua Perimetral NW, nº 1.300, no perímetro urbano de Alta Floresta (Figura 1). Os dois locais de coleta estão à uma distância aproximada de 5km (Figura 2).

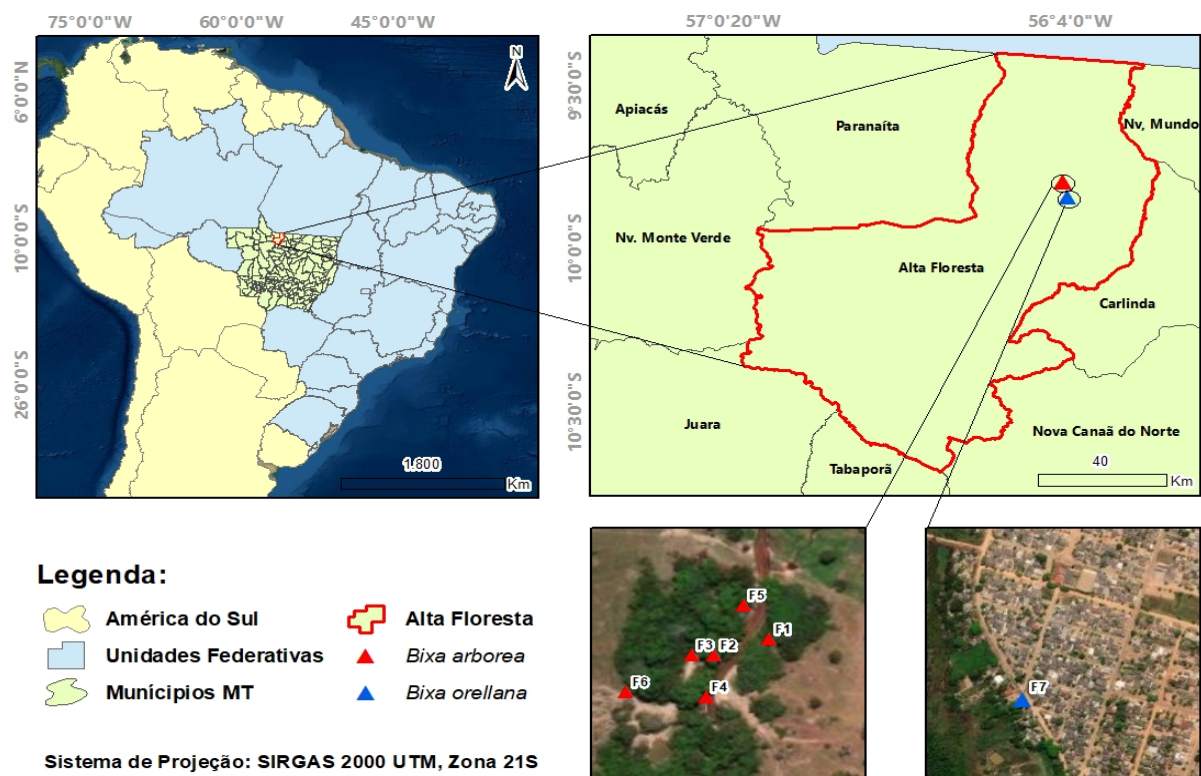


Figura 1. Localização das áreas de coleta de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* no município de Alta Floresta - MT, Brasil. Fonte: Marcos V. P. Poletto.

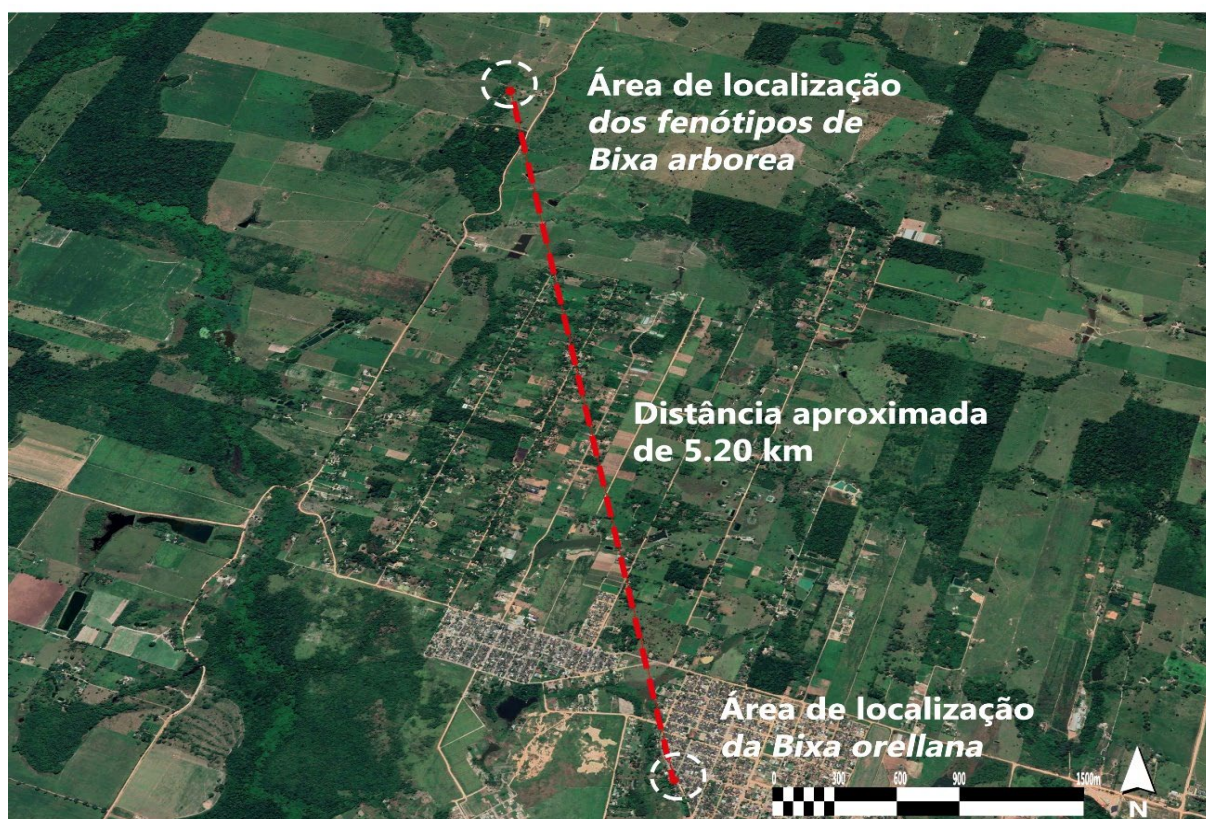


Figura 2. Áreas de coleta das espécies *Bixa arborea* e *Bixa orellana* no município de Alta Floresta – MT (2020). Fonte: Thatielen Furini.

As coletas dos fenótipos foram realizadas mediante a retirada de ramos férteis e herborizados de acordo com técnicas usuais (FIDALGO e BONONI, 1989); as identificações foram confirmadas com base nas obras originais (LINNAEUS, 1753; HUBER, 1910) e informações disponíveis no site Flora do Brasil (ANTAR, 2020); os materiais foram preparados e incorporados na coleção do Herbário da Amazônia Meridional (HERBAM), da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Alta Floresta.

2.2 Estudo morfológico dos fenótipos de *Bixa*

As diagnoses morfológicas de *B. arborea* e *B. orellana* foram realizadas no Laboratório de Morfologia Vegetal, localizado nas dependências do HERBAM, entre março e setembro de 2020. Foram realizadas a partir de informações qualitativas e quantitativas dos espécimes, fazendo uso de materiais desidratados (partes vegetativas e carpológicas) e reidratados (flores) com o uso de régua, papel milimetrado e um estereomicroscópio (Figura 3). A terminologia foi baseada em Radford et al. (1974) e Barroso et al. (1999); para a realização das ilustrações, imagens dos caracteres diagnósticos dos espécimes foram selecionados e ilustrados por especialista na cidade de Viçosa, Estado de Minas Gerais.



Figura 3. Início da análise de caracterização morfológica dos fenótipos de *B. arborea* e *B. orellana* no HERBAM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio das diagnoses morfológicas foi possível verificar várias características importantes na distinção dos indivíduos analisados, aqui nomeados de fenótipos: tipo de base do limbo foliar, número de estames por flor, formato e comprimento do ápice do fruto, presença ou ausência de espinhos nos frutos, e comprimento e flexibilidade dos espinhos. Demonstraram-se, importantes, na distinção dos fenótipos apresentados na chave de identificação a seguir.

A relevância da morfologia vegetal na interpretação da variabilidade fenotípica pode ser observada no trabalho de Suassuna et al. (2016), que realizaram a caracterização de variedades de amendoim (*Arachis hypogaea* L, Fabaceae) provenientes do Parque Nacional do Xingu, estado de Mato Grosso, onde diferenciaram 14 variedades cultivadas pelos índios Kayabi, destacando-se o hábito de crescimento, altura e pigmentação da haste, indumento foliar, cor do estandarte e do ginóforo, comprimento do fruto, padrão de constrição e tipo de ápice do fruto, e comprimento e cor da semente.

Chave para identificação de seis fenótipos de *B. arborea* e *B. orellana* em Alta Floresta, Mato Grosso

1. Frutos totalmente cobertos por espinhos, 4–9,6 mm compr., flexíveis*Bixa orellana*
1. Frutos papilosos ou parcialmente cobertos por espinhos, 0,1–1,8 mm compr., não flexíveis*Bixa arborea*
 2. Frutos com ápice mucronatiforme longo, 3-6 mm compr.*B. arborea* **fenótipo 4**
 2. Frutos com ápice mucronatiforme curto, 0,8-2,8 mm compr., raramente truncado
 3. Frutos com espinhos evidentes ao longo das faces, espinhos maiores 1,3–2,5 mm compr.
 4. Folhas com base truncada; frutos 2,6–3,2 × 1,8–2,7 cm, elípticos raramente obovados *B. arborea***fenótipo 5**
 4. Folhas com base cordada; frutos 2,4–3,3 × 2,4–2,9 cm, transversalmente elípticos..... *B. arborea*.....**fenótipo 6**
 3. Frutos lisos ou raramente com espinhos vestigiais e esparsos, quando presente 0,1-0,5 mm compr.

5. Flores com 203–300 estames; frutos curtamente elípticos a transversalmente elípticos
6. Flores com 230-285 estames; frutos curtamente elípticos,.....*B. arborea* **fenótipo 1**
6. Flores com 203–300 estames.....*B. arborea* **fenótipo 2**
5. Flores com 397-460 estames; frutos curtamente oblongos*B. arborea* **fenótipo 3**

3.1 *Bixa arborea* Huber, Bol. Mus. Goeldi Hist. Nat. Ethnogr. 6: 87. 1910.

Arbustos a árvores, 3-7 m alt.; ramos jovens lepidotos, com nectários extraflorais nos nós, elevados, sésseis, planos, obovados, circulares a semicirculares. Estípulas caducas. Folhas alternas, simples, pecíolo cilíndrico, lâmina ovada, margens sinuosas a levemente sinuosas. Inflorescências em panículas terminais; brácteas caducas presentes nas ramificações das inflorescências; pedicelo geralmente com cinco nectários extraflorais abaixo do cálice, lenticulares; flores pentâmeras, actinomorfas, dialissépalas e dialipétalas; estames livres, anteras rimosas; ovário unilocular, bicarpelar, óvulos com placentação parietal, estilete terminal, estigma lobado. Fruto tipo cápsula loculicida, bivalvar, papiloso ou curtamente equinado, espinhos não flexíveis quando presentes, indeiscente. Sementes numerosas, glabras, obtriangulares, testa carnosa, alaranjada, arilo branco, discreto.

B. arborea assemelha-se à *B. orellana* quanto às características vegetativas e florais (cálice, corola e androceu), mas facilmente diferenciada pelos frutos comprimidos e esparsamente papilosos (HUBER, 1910), enquanto que a segunda espécie possui frutos não comprimidos e equinados, com espinhos flexíveis.

No presente trabalho foi possível verificar que raramente os frutos são papilosos (tubérculos diminutos), sendo muito comum a presença de espinhos curtos nos materiais analisados de Alta Floresta, que variam desde 0,1 até 2,5 mm de comprimento, sempre rígidos (não flexíveis), o que pode ser enquadrado como frutos curtamente equinados. Informações não encontradas até agora na literatura de taxonomia (HUBER, 1910; BAER, 1976; POPPENDIECK, 1981; CHRISTENHUSZ, 2012), nem no site da Flora do Brasil (ANTAR, 2020).

Também foi proposto para os frutos das duas espécies o uso do termo “mucronatiforme” como uma adaptação à terminologia proposta por Radford et al., (1974), como sendo aquele ápice com a proporção 3:1 (comprimento x largura), reto e rígido, útil na distinção dos fenótipos estudados.

A espécie não é endêmica do Brasil e ocorre em Floresta Ciliar ou Matas de Galeria, Floresta de Terra Firme, Floresta Ombrófila dos domínios fitogeográficos: Amazônico e de Mata Atlântica, estando presente nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins (Norte), Bahia (Nordeste), Mato Grosso (Centro-Oeste), Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Sudeste) (LLERAS, 2012; ANTAR, 2020). Conhecida popularmente como urucu-da-mata no Estado de Mato Grosso, ocorre em Floresta Ombrófila Aberta Submontana com Cipós, Floresta Ombrófila Densa Aluvial e Submontana e em Formação Savânica Parque com Floresta de Galeria (BORGES et al., 2014).

Em Alta Floresta foi coletada em uma área de Floresta Ciliar, caracterizada como uma monodominância devido à densidade de indivíduos na área, além de indivíduos esparsos em alguns trechos da propriedade. Segundo Lleras (2012), estudos fitossociológicos indicam que a espécie é bastante frequente nas áreas de ocorrência, sendo encontrado até 266 indivíduos por hectare. Em alta densidade das populações de *B. arborea* há uma garantia de uma alta variabilidade fenotípica, pois quanto maior a população, maior é o fluxo gênico e a variabilidade genética intrapopulacional (KAGEYAMA e GANDARA, 1998; PRIMACK e RODRIGUES, 2001; NEWBOLD et al., 2015). No entanto, populações pequenas e isoladas geralmente estão sujeitas à perda da variabilidade genética devido ao aumento da endogamia e deriva genética (PRIMACK e RODRIGUES, 2001; CUSHMAN et al., 2016) o que é o caso das populações estudadas.

Bixa arborea é uma espécie que ocorre em ambientes próximos a corpos d'água, geralmente associados à vegetação ripária ou ciliar (SILVA et al., 2017). A população de *B. arborea* amostrada apresentou uma alta densidade de indivíduos, o que pode ser influenciado pela relação, solo água e planta, pois diversos estudos mostram que monodominância e a alta abundância de espécies vegetais em determinados ambientes se deve a essa relação (VAN DER VALK, 1981; ARIEIRA e CUNHA, 2006).

3.2 *Bixa arborea* fenótipo 1. Figura: 4A-C

Árvore, 6 m alt. Estípulas 9–10 mm compr., lanceoladas. Pecíolo 3,5–7,5 cm compr., glabrescente a esparsamente lepidoto, lâmina 9–19 × 6–11,2 cm, base cordada, ápice cuspidado a caudado, face adaxial glabra e face abaxial esparsamente lepidota. Brácteas 5–6 x 3,5–4 mm, oblongas, caducas; pedicelo 6–8 mm compr.; sépalas 7,5–8 x 8–9 mm, oblatas, esparsamente lepidotas, cimbiformes, pétalas 22–27 x 13–15 mm, obovadas, glabras, pontos translúcidos e rajas alaranjadas presentes; 230–285 estames, filetes 14–18 mm compr., anteras 1,3–1,8 mm compr.; ovário 2,8–3 x 2,7–3 mm, ovado, espinhos presentes, estilete 15–16 mm compr., estigma 0,3–0,5 mm compr. Frutos 1,6–3 × 1,8–2,8 cm, curtamente elípticos, base aguda, ápice mucronatiforme curto, 1–1,7 mm compr., lisos, raramente com espinhos curtos, 0,1–0,5 mm compr., linhas transversais evidentes; (1–)3–13 sementes, 4,2–5 x 2,3–3,8 mm, obtriangular, sarcotesta rugosa, caramelo. Material testemunho: *J. M. Fernandes et al.*, 1554 (HERBAM), *T. Furini et al.*, 04 (HERBAM).

Comentário: o fenótipo 1 foi coletado a 10 metros da margem do rio e cerca de 6 metros de altitude em relação ao nível do rio (239 metros de altitude em relação ao nível do mar), associado a um solo arenoso de encosta, parcialmente úmido (Figura 5).

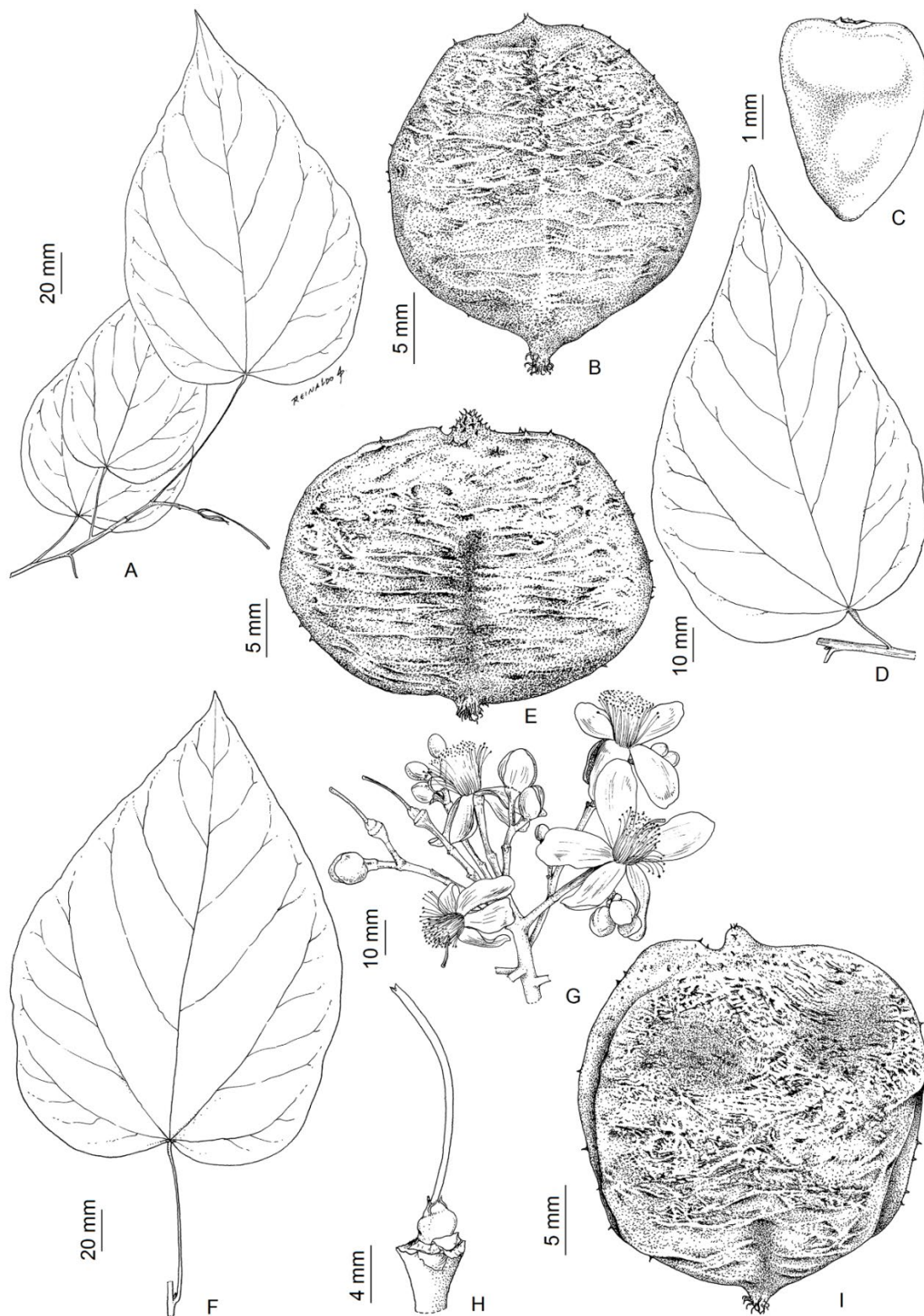


Figura 4. *Bixa arborea* fenótipo 1 - A. ramo com folhas, B. fruto, C. semente; *Bixa arborea* fenótipo 2 - D. folha, E. fruto; *Bixa arborea* fenótipo 3 - F. folha, G. inflorescência, H. gineceu, I. fruto. Ilustrador: Reinaldo Antonio Pinto.

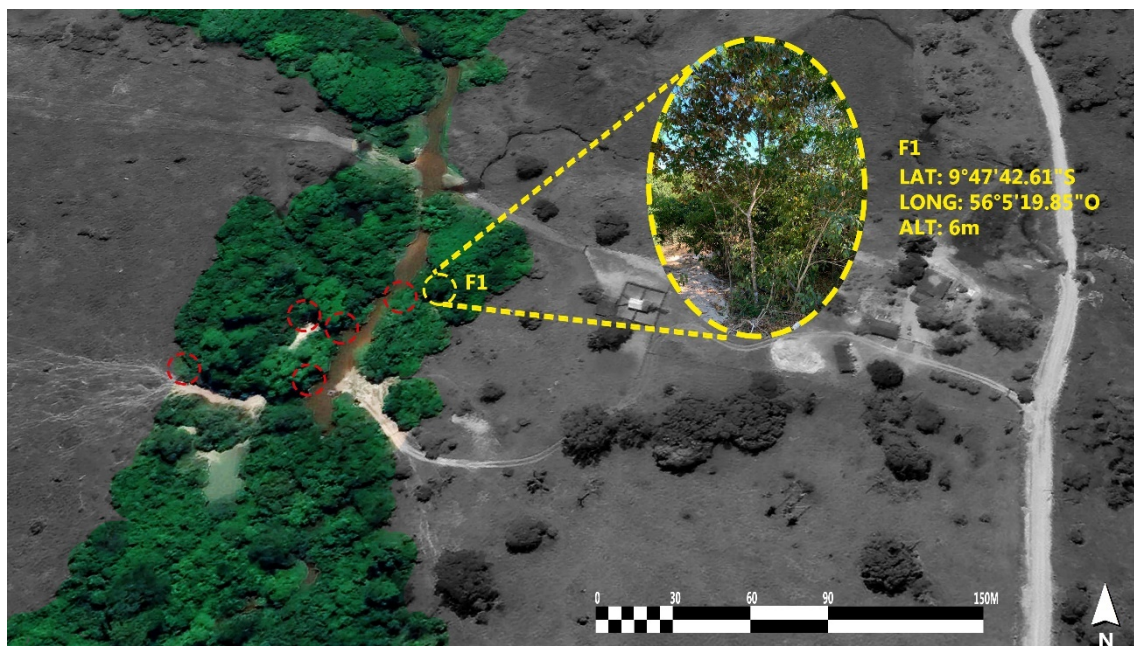


Figura 5. Área de localização de *Bixa arborea* Huber fenótipo 1. Alta Floresta – MT (2020).
Fonte: Thatielen Furini.

3.3 *Bixa arborea* fenótipo 2. Figura: 4D-E

Árvore, 4 m alt. Estípulas ca 13 mm compr., lanceoladas. Pecíolo 2,3–6,5cm compr., lâmina 12–21,3 × 4–10,3 cm, base levemente cordada a truncada, ápice cuspidado a caudado, faces adaxial glabra e abaxial lepidota. Brácteas 4–6 x 3,5–4 mm oblongas, caducas; sépalas 8,5–9 x 8–9 mm, oblatas a circulares, lepidotas, pontos translúcidos alaranjados no ápice, pétalas 26–30 x 16–20 mm, obovadas, glabras, pontos translúcidos e rajas alaranjadas presentes; 203–300 estames, filetes 15–18 mm compr., anteras 1,5–2 mm compr.; ovário 2,5–3 x 2–2,1 mm, ovado, espinhos presentes, estilete 16–17 mm compr., estigma 0,4–0,5 mm compr. Frutos 2,2–2,8 × 2,5–3,2 cm, transversalmente elípticos, base obtusa, ápice mucronatiforme curto, 1–2,8 mm compr., lisos, raramente com espinhos curtos, 0,1–0,5 mm compr., linhas transversais evidentes; 5–10 sementes, 4,5–5,0 × 4,0–4,8 mm, obtriangular, sarcotesta rugosa, caramelo. Material testemunho: *J. M. Fernandes et al.*, 1556 (HERBAM), *T. Furini et al.*, 05 (HERBAM).

Comentário: o fenótipo 2 foi coletado as margens do rio com cerca de 1 metro de altitude em relação ao nível do rio. Está localizado em uma área periodicamente inundada com solo arenoso (Figura 6).

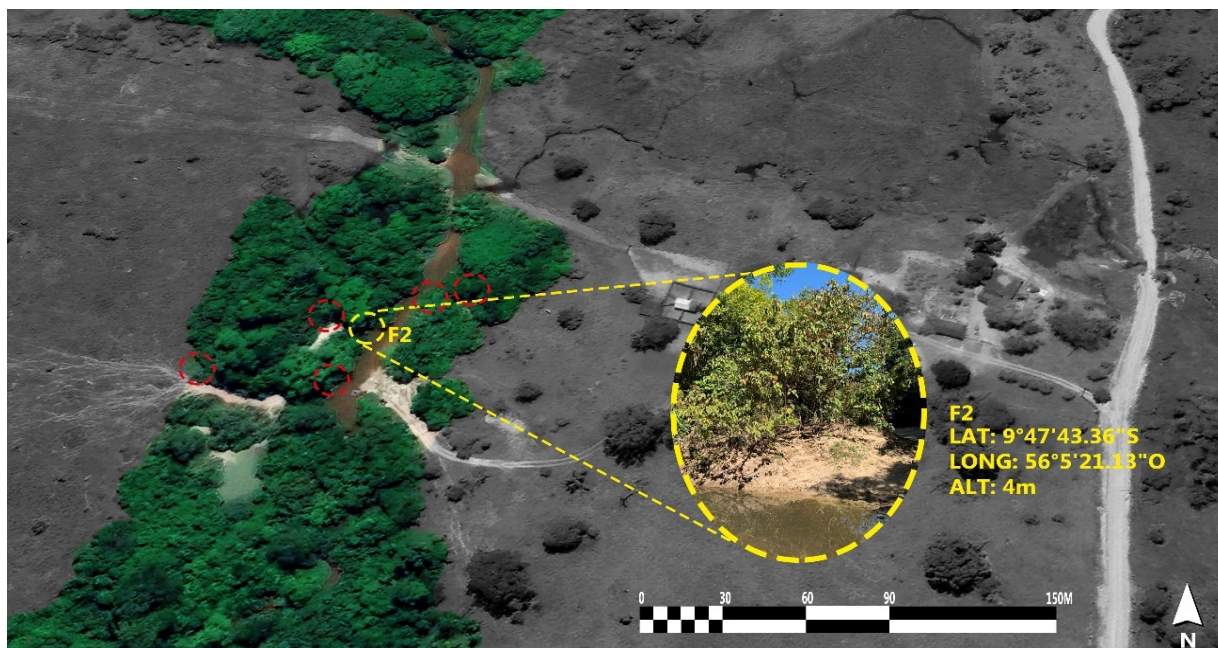


Figura 6. Área de localização de *Bixa arborea* Huber fenótipo 2. Alta Floresta – MT (2020).
Fonte: Thatielen Furini.

3.4 *Bixa arborea* fenótipo 3. Figuras: 4F-I

Árvore, 6,5 m alt. Estípulas ca. 15 mm compr., lanceoladas. Pecíolo 4,0–7,5 cm compr., lâmina 12,6–24 × 8,7–15 cm, base cordada, ápice curtamente cuspidado, faces adaxial glabra e abaxial lepidota. Brácteas 4,8 x 2,5 mm amplo elípticas, caducas; sépalas 8,5–9 x 5,5–8 mm, amplo elípticas, raramente circulares, lepidotas, pontos translúcidos alaranjados no ápice; pétalas 15–29 x 8–14 mm, obovadas, glabras, pontos translúcidos e rajadas alaranjadas presentes; 397–460 estames, filetes 14–16 cm compr., anteras 1,1–1,7 mm compr.; ovário 3–3,2 x 2,8–3 mm, ovado, espinhos presentes, estilete 15–16,8 mm compr., estigma 0,2–0,6 mm compr. Frutos 2,6–3,5 × 1,8–2,3 cm, curtamente oblongos, base truncada a levemente aguda, ápice mucronatiforme curto, 0,8–2 mm compr., lisos, raramente com espinhos curtos, 0,1–0,5 mm compr., linhas transversais evidentes; 3–8 sementes, 5–5,2 × 4,2–4,5 mm, obtriangular, sarcotesta rugosa, caramelo. Material testemunho: *J. M. Fernandes et al.*, 1557 (HERBAM), *T. Furini et al.*, 06 (HERBAM).

Comentário: o fenótipo 3 foi coletado em uma área com solo arenoso, próximo à margem do rio com cerca de 4 metros de altitude em relação ao nível do rio (Figura 7).

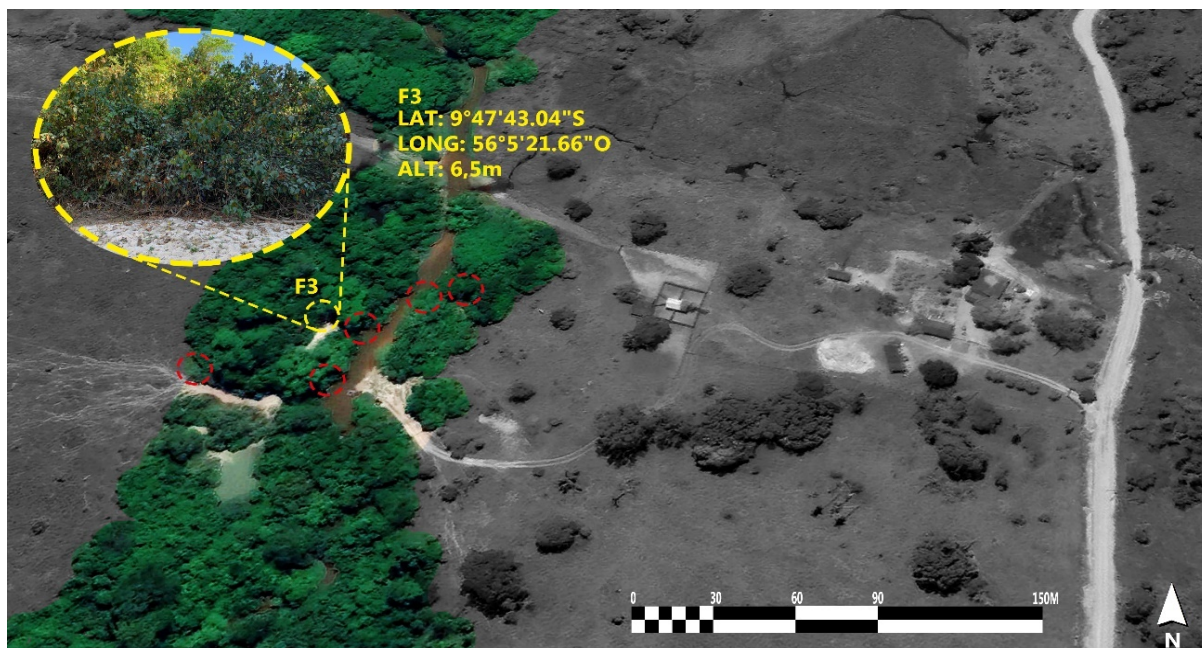


Figura 7. Área de localização de *Bixa arborea* Huber fenótipo 3. Alta Floresta – MT (2020).
Fonte: Thatielen Furini.

3.5 *Bixa arborea* fenótipo 4. Figuras: 8A-B

Arbusto, 4 m alt. Estípulas 24 mm compr., lanceoladas. Pecíolo 9–11 cm compr., lâmina 28,5–30 × 17,6–20 cm, base truncada a cordada, ápice cuspidado, faces adaxial glabra e abaxial lepidota. Flores não observadas. Frutos 2,7–4 × 2,4–3 cm, amplo elípticos, linhas transversais evidentes, espinhos curtos e esparsos, base aguda, ápice mucronatiforme longo, 3–6 mm compr., espinhos 0,8–2 mm compr.; 6–15 sementes, 3,2–5,2 × 2,7–3,5 mm, obtriangular, sarcotesta rugosa, caramelo escuro. Material testemunho: *J. M. Fernandes et al.*, 1560 (HERBAM).

Comentário: o fenótipo 4 foi encontrado nas margens do rio, em uma área com solo periodicamente inundado, a 0,5 metro de altitude em relação ao nível do rio (Figura 9). Observa-se que o fenótipo 4 está localizado na mesma altitude que o fenótipo 5, mas o primeiro apresenta ápice mucronatiforme longo entre 3 a 6 mm compr., enquanto que o segundo possui ápice mucronatiforme curto entre 1,0 a 2,0 mm compr.

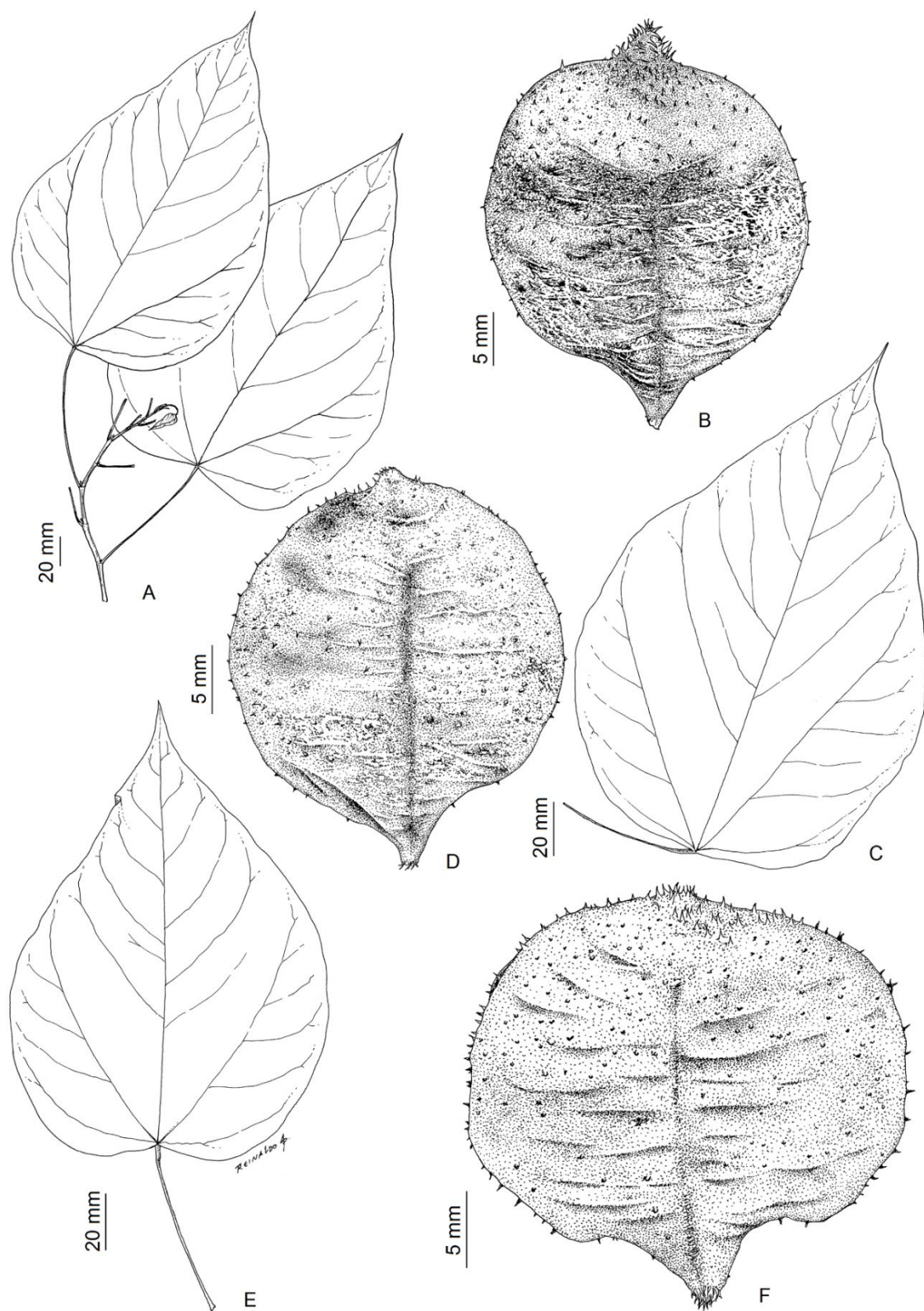


Figura 8. *Bixa arborea* fenótipo 4 – A. ramo com folhas, B. fruto; *Bixa arborea* fenótipo 5 – C. folha, D. fruto; *Bixa arborea* fenótipo 6 – E. folha, F. fruto. Ilustrador: Reinaldo Antonio Pinto.

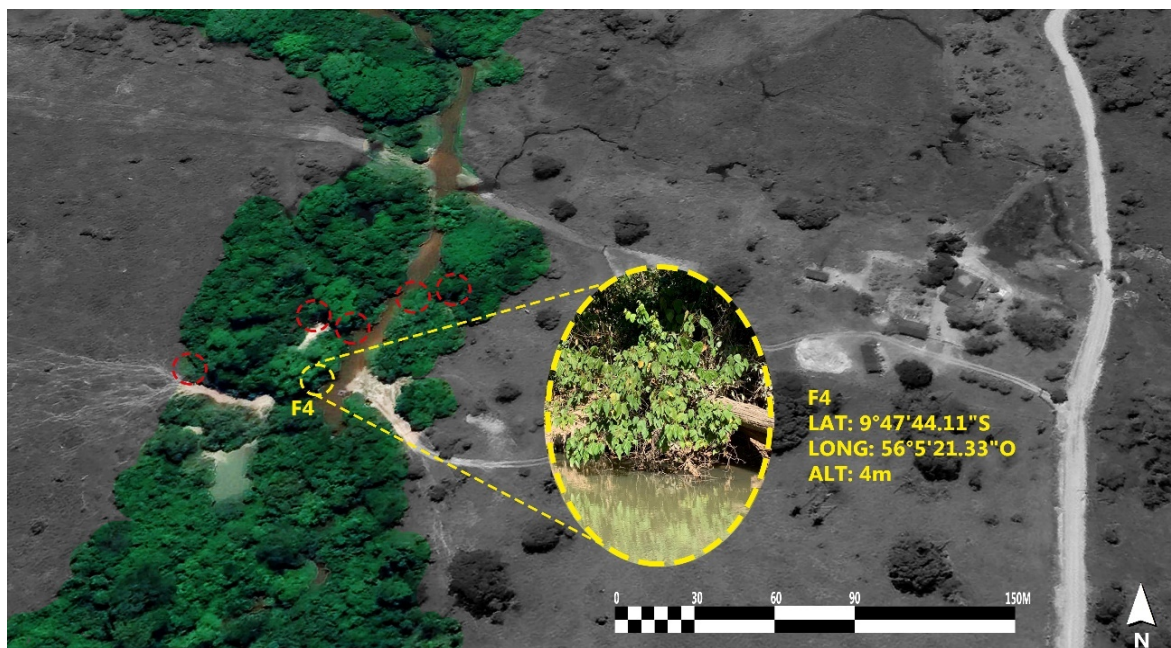


Figura 9. Área de localização de *Bixa arborea* Huber fenótipo 4. Alta Floresta – MT (2020).
Fonte: Thatielen Furini.

3.6 *Bixa arborea* fenótipo 5. Figura 8C-D

Arbusto, 5 m alt. Estípulas 15mm. Folhas alternas, pecíolo 4,7–9 cm compr., lepidoto, lâmina 20,6–26,3 × 12,2–15,2 cm, base truncada, ápice cuspidado, faces adaxial glabra e abaxial lepidota. Flores não observadas. Frutos 2,6–3,2 × 1,8–2,7 cm, elípticos, raramente obovados, base aguda, ápice mucronatiforme curto, 1,0–2,0 mm compr., raramente truncado, espinhos maiores 0,3–1,8 mm compr., linhas transversais evidentes; 4–13 sementes, 5,0–5,3 × 3,8–5,1 mm obtriangular, sarcotesta rugosa, caramelo. Material testemunho: *J. M. Fernandes et al.*, 1558 (HERBAM).

Comentário: fenótipo 5 foi encontrado as margens do rio, em solo argiloso e submetido a frequente inundação, com altitude de 0,5 metro ao nível do rio (Figura 10).

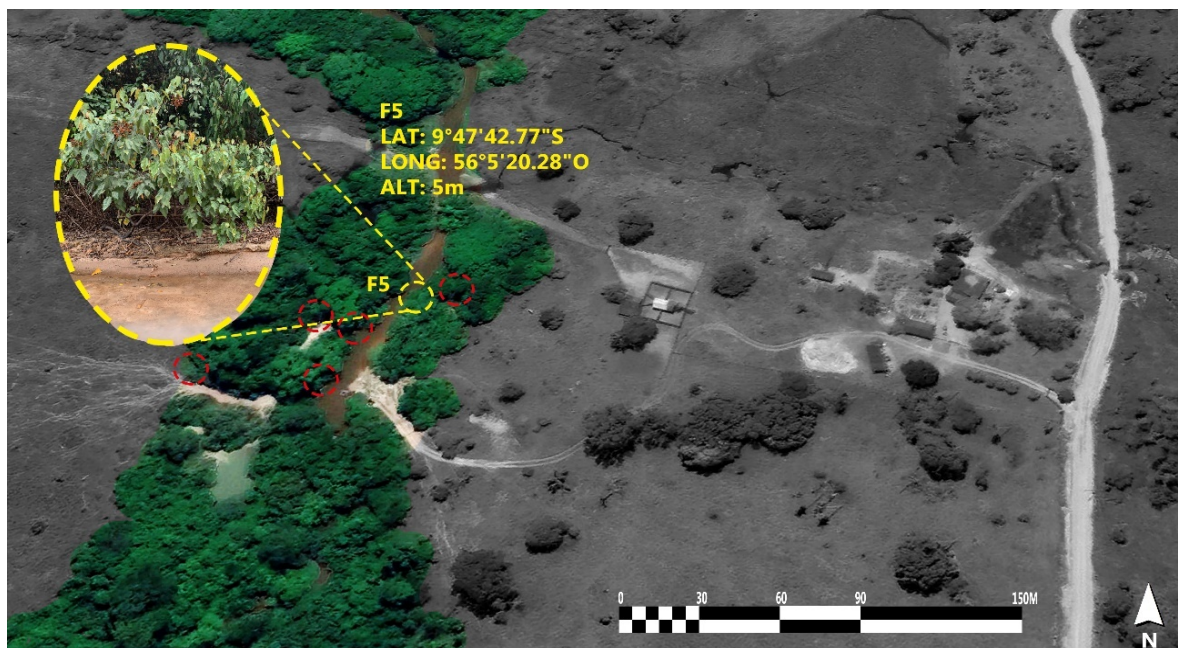


Figura 10. Área de localização de *Bixa arborea* Huber fenótipo 5. Alta Floresta – MT (2020).
Fonte: Thatielen Furini.

3.7 *Bixa arborea* fenótipo 6. Figuras: 8E-F.

Árvore, 3 m alt. Estípulas não observadas. Pecíolo 5,0–6,5 cm compr., lepidoto, lâmina 15,8–16,3 × 10,5–11,3 cm, base levemente cordada a truncada, ápice agudo a cuspidado, faces adaxial glabra e abaxial lepidota. Brácteas não observadas; sépalas 8–9 × 6–8 mm, amplo elípticas a circulares, lepidotas, pontos translúcidos alaranjados no ápice; pétalas 24–28 × 12–15 mm, obovadas, glabras, pontos translúcidos e rajas alaranjadas presentes; 295–339 estames, filetes 15–18 mm compr., anteras 1,3–1,7 mm compr.; ovário 3–3,3 × 3 mm, romboide, espinhos presentes, estilete 17–18,5 mm compr., estigma 0,8–0,1 mm compr. Frutos 2,4–3,3 × 2,4–2,9 cm, transversalmente elípticos, base aguda, ápice mucronatiforme curto, 1,0–1,5 mm compr., espinhos maiores 1,3–2,5 mm compr., linhas transversais evidentes; 6–12 sementes, 4,5–5 × 3,5–3,8 mm, obtriangulares, sarcotesta rugosa, caramelo. Material testemunho: *J. M. Fernandes 1559* (HERBAM), *T. Furini et al., 07* (HERBAM).

Comentário: o fenótipo 6 está localizado a cerca de 30 metros de distância da margem do rio e cerca de 8 metros de altitude em relação ao nível do rio. Está localizado na borda do fragmento florestal, em um solo arenoso e parcialmente úmido (figura 11).

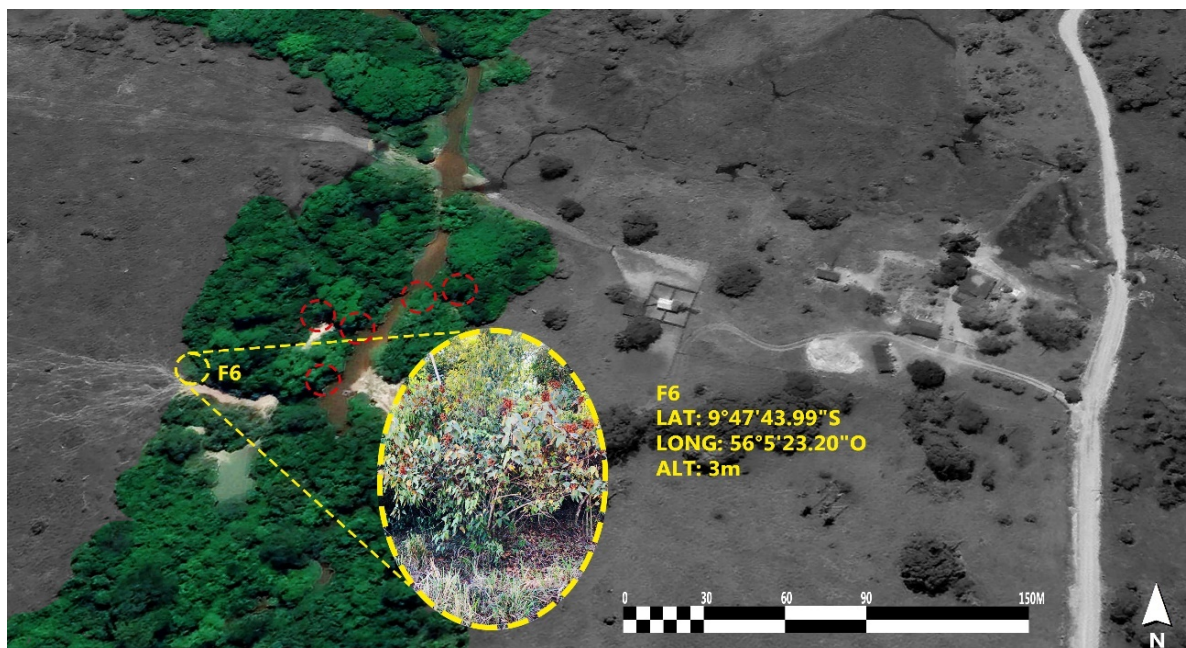


Figura 11. Área de localização de *Bixa arborea* Huber fenótipo 6. Alta Floresta – MT (2020).
Fonte: Thatielen Furini.

3.8 *Bixa orellana* L., Sp. Pl. 1: 512. 1753. Figuras: 12A-E.

Arbustos a árvores, 4 m al.; ramos jovens cilíndricos, ferrugíneos, lepidotos; estípulas 2,5–3 mm compr., estreitamente triangulares, caducas. Folhas simples, alternas, pecíolo 2–7 cm compr., lâmina 6,5–13 × 3,5–8,5 cm, cordiforme, base truncada, ápice caldado, raramente cuspidado, faces adaxial e abaxial esparsamente lepidotas, tricomas glandulares não observados. Inflorescência paniculada, terminal; 2 brácteas, 0,9–1 × 0,3–0,5 cm, cimbfiformes, caducas, com um nectário lenticular próximo à base de cada uma; flores pediceladas, pedicelo 6–8 mm compr. Com 5 nectários terminais, conspícuos; 5 sépalas, 1–1,1 × 1,1–1,3 cm, oblatas, cimbfiformes, livres, esparsamente lepidotas externamente, esverdeadas; 5 pétalas, 2,5–2,9 × 1,3–1,9 cm, obovadas, irregulares, livres, glabras, lilases; androceu ca. 390 estames, livres, lilases, filetes 1,3–1,4 cm compr., anteras 1–1,2 mm compr., rimosas; ovário 5–6 × 3–4 mm, ovado, unilocular, bicarpelar, estrigoso, estilete 1,4–1,5 cm compr., estigma infundibuliforme compresso, bífido. Fruto tipo cápsula loculicida, 3,5–4 × 3–3,3 cm, ovado, não comprimido, base obtusa, ápice mucronatiforme, epicarpo verde ou vermelho, equinado, espinhos flexíveis, 4–9,6 mm compr.; 40 sementes de 4,9–5 × 4–4,3 mm, obdeltada, sarcotesta avermelhada, arilo branco na base. Material testemunho: *T. Furini & C. E. Felito 01, 02* (HERBAM), 21.IX.2019, fl., *T. Furini & C. E. Felito 03* (HERBAM).

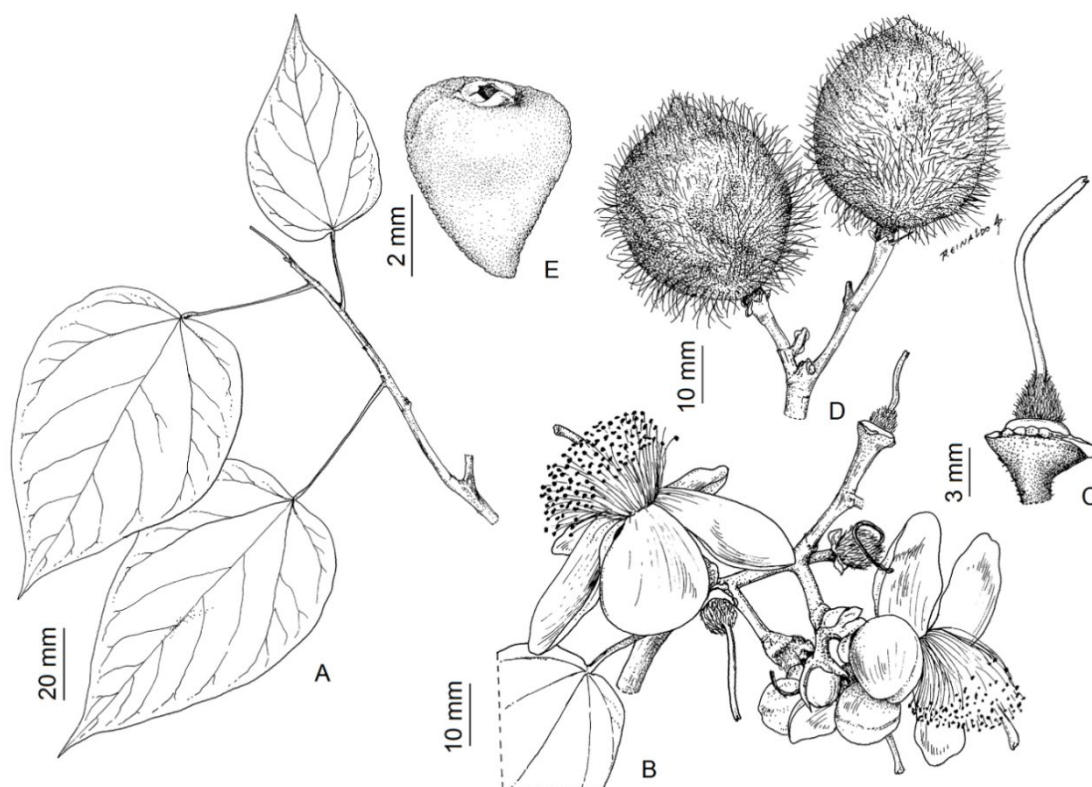


Figura 12. *Bixa orellana* – A. ramo com folhas, B. Inflorescência, C. Gineceu, D. frutos, E. semente. Ilustrador: Reinaldo Antonio Pinto.

Comentário: *Bixa orellana* é caracterizada pela presença de glândulas conspícuas e esverdeadas no ápice do pedicelo, frutos equinados, deiscentes e glabros, e pelas sementes com sarcotesta vermelho-alaranjada (EICHLER, 1871; CHRISTENHUSZ, 2012), além de apresentar frutos ovados.

Possui distribuição Neotropical, com distribuição desde o México até a Argentina (CHRISTENHUSZ, 2012). No Brasil, ocorre em todos os estados e no Distrito Federal, na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, nos mais diversos tipos de vegetação (BFG, 2018; ANTAR, 2020). Borges et al. (2014) não apresentam *B. orellana* na obra “Flora Arbórea de Mato Grosso: tipologias vegetais e suas espécies”, provavelmente por ser uma espécie com domesticação antiga na América do Sul.

Em Alta Floresta foi coletada em um quintal urbano, cultivada para produção de sementes usadas no preparo de pigmento para consumo familiar, a cerca de 263 metros de altitude em relação ao nível do mar (Figura 13).

Após a análise da coleção do HERBAM, verificou-se que nenhum espécime de *B. orellana* depositado na coleção foi oriundo de áreas nativas da região de Alta Floresta. Segundo Moreira et al., (2015), provavelmente o urucum selvagem (*Bixa*

urucurana Willd.) seja o ancestral do urucum cultivado (*Bixa orellana*), que possui frutos indeiscentes, indicando alterações na deiscência durante a sua domesticação, também são menores e com menos pigmento (não usados como fonte de pigmento), enquanto que o urucum cultivado possui frutos deiscentes, muitas sementes e pigmento em abundância. Atualmente, *B. urucurana* é considerada como sinônimo de *B. orellana* (ANTAR, 2020).

De acordo com Dequigiovanni et al. (2018), em estudo da diversidade genética de *B. orellana*, incluindo amostras selvagens e cultivadas, verificaram que é mais elevada para as populações selvagens quando comparadas às populações cultivadas, além disso indicam um sistema de cruzamento misto para a espécie entre populações selvagens e cultivadas. O estudo mostrou que o distanciamento geográfico das populações de *B. orellana* proporciona uma maior variabilidade genética a espécie. Isso contribui para uma diversificação fenotípica intrapopulacional, o que se deve sobretudo, a forma de reprodução da espécie, que apresenta alta taxa de endogamia (DEQUIGIOVANNI et al., 2018).

B. orellana embora seja muito utilizada comercialmente, é facilmente encontrada de forma nativa, sobretudo em fragmentos antropizados (DEQUIGIOVANNI et al., 2017). Essa espécie é muito utilizada por grande parte da população de toda a América Latina e vem sendo selecionada e cultivada há muito tempo, gerando novos cultivares (CLEMENT et al., 2010; MOREIRA et al., 2015): Em um estudo Barbosa-Filho et al., (1998) relataram 4 variedades de *B. orellana* que eram cultivadas na Paraíba: Casca verde”, “Casca vermelha”, Bico de calango” e “Grão preto”. A Embrapa buscando o melhoramento genético e o aumento da qualidade de bixina presente nas sementes de *B. orellana*, desenvolveu dois cultivares Embrapa 36 e Embrapa 37 (POLTRONIERI et al., 2001). No Brasil são geralmente utilizados em plantações os cultivares Piave Vermelha, Wagner, Peruana Pará, Bico de Pato, Peruana Paulista e Piave Verde Limão (POLTRONIERE et al., 2001; FRANCO et al., 2008; FILHO et al., 2018). As características reprodutivas, o isolamento geográfico e as influências ambientais, bem como a manipulação antrópica da espécie por anos tem garantido a diversidade e plasticidade fenotípica encontrada na espécie (DEQUIGIOVANNI et al., 2017; DEQUIGIOVANNI et al., 2018; FARIA et al., 2019).



Figura 13. Área de localização de *Bixa orellana* fenótipo 7. Alta Floresta – MT (2020). Fonte: Thatielen Furini.

4. CONCLUSÕES

As duas espécies analisadas apresentaram muitas semelhanças morfológicas entre si, principalmente quanto a caracteres vegetativos e florais, contudo, diferiram em relação aos frutos. *Bixa arborea* apresenta frutos comprimidos, base aguda, esparsamente papilhosos ou com espinhos não flexíveis (rígidos), enquanto que *Bixa orellana* apresenta frutos não comprimidos, base obtusa e equinados com espinhos flexíveis.

Os fenótipos de *B. arborea* analisados em uma única população apresentaram diferenças quanto ao tipo de hábito, tipo da base foliar, número de estames, tamanho e formato dos frutos, comprimento dos ápices dos frutos, presença de papilas ou de espinhos nos frutos e comprimento dos espinhos nos frutos. Para as sementes não foram encontradas diferenças morfológicas entre os fenótipos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Corpus, pp. 41-45, 2004.
- AMARAL, E. V. E. J. **Caracterização morfológica e identificação taxonômica de espécies de *Campomanesia* Ruiz & Pavon (Myrtaceae)**. Dissertação de Mestrado (Agronomia: produção vegetal). Universidade Federal de Goiás, Jataí-GO, p. 73, 2012.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**. vol. 181, pp. 1-20, 2016.
- ANTAR, G. M. Bixaceae in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB62>. Acesso em: 29 de dezembro de 2020.
- ARIEIRA, J.; CUNHA, C. N. Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), no Pantanal Norte, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, vol. 20, n. 3, pp. 569-580, 2006.
- BAER, D. F. **Systematics of the genus *Bixa* and geography of the cultivated annatto tree**. PhD Thesis. University of California, Los Angeles, p. 240, 1976.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; BARBOSA-FILHO, J.; SILVA-FILHO, R. N.; LIRA, B. F.; MACÊDO, R. OL.; SILVA, M. S.; CHAVES, M. C. O.; SOUZA, M. F. V.; CUNHA, E. V. L.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. **Revista brasileira de farmacognosia**. vol. 7-8, n. 1, pp. 41-47, 1998.
- BARROSO G.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASSO, C. L. F.; **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Imprensa Universitária, Viçosa, p. 443, 1999.
- BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP. Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**. vol. 69, n. 4, pp. 1513-1527, 2018.
- BORGES, H. B. N.; SILVEIRA, E.; VENDRAMIM, L. N. 2014. **Flora arbórea de Mato Grosso: tipologias vegetais e suas espécies**. Cuiabá: Entrelinhas, p. 255.
- CASTRO, C. B.; MARTINS, C. S.; FALESI, I. C.; NAZARE, R. F. R.; KATO, O. H.; BENCHIMOL, R. L.; VENTURIERI, M. M. **A Cultura do Urucum**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, ed. 2ª, p. 61, 2009.
- CHRISTENHUSZ, M.J.M. Bixaceae. In: DAVIDSE, G.; SOUSA, M. & CHATER, A.O. **Flora Mesoamericana**. Cidade do Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 1-4, 2012.
- CLEMENT, C. R.; CRISTO-ARAÚJO, M.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; ALVES-PEREIRA, A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and domestication of native Amazonian crops. **Diversity**, vol. 2, pp. 72-106, 2010.

CORRÊA, M. P; PENNA, L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, vol. 6, pp. 358-359, 1984.

CUSHMAN, S. A.; MCRAE, B. H.; MCGARIGAL, K. Basics of Landscape Ecology: An Introduction to Landscapes and Population Processes for Landscape Geneticists. In: BALKENHOL, N. et al., **191 Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications**. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 35-57, 2016.

DEMCZUK JR, B.; RIBANI, R. H. Atualidades sobre a química e a utilização do urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**. vol. 6, n. 1, pp. 37-50, 2015.

DEQUIGIOVANNI G. RAMOS, S. L. F.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R.; RODRIGUES, D. P.; FABRI, E. G.; ZUCCHI, M. I.; VEASEY, E. A. New microsatellite loci for annatto (*Bixa orellana*), a source of natural dyes from Brazilian Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. vol. 18, pp. 116-122. 2018.

DEQUIGIOVANNI, G.; RAMOS, S. L. F.; ALVES-PEREIRA, A.; FABRI, E. G.; CARVALHO, P. R. N.; SILVA, M. G.; ABDO, M. T. V. N.; MARTINS, A. L. M.; CLEMENT, C. R.; VEASEY, E. A. Genetic diversity and structure in a major Brazilian annatto (*Bixa orellana*) germplasm bank revealed by microsatellites and phytochemical compounds. **Genetic Resources and Crop Evolution**. vol. 64, pp. 1775–1788, 2017.

DIAS, N. O.; REBOUCAS, T. N. H; SAO JOSE, A. R; AMARAL, C. L. F. Morpho-agronomic characterization and estimates of genetic parameters in annatto plant. **Horticultura Brasileira**. vol. 35, n.2 2017.

EICHLER, A. G. Bixaceae. In: MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. G. (eds.). **Flora brasiliensis**. Lipsiae, Frid. Fleischer, vol. 13, n. 1, pp. 421-516, 1871.

FARIA, D. V.; CORREIA, L. N. F.; SOUZA, M. V. C.; Ríos-Ríos, a. m.; VITAL, C. E.; BATISTA, D. S.; COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C. Irradiance and light quality affect two annatto (*Bixa orellana* L.) cultivars with contrasting bixin production. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. vol. 197, 2019.

FENNER, M. **Seed ecology**. London, Chapman & Hall. 151p. 1993.

FERRAZ, RM; RAGASSI, CF; HEINRICH, AG; LIMA, MF; PEIXOTO, JR; REIFSCHNEIDER, FJB. 2016. Caracterização morfoagronômica preliminar de acessos de pimentas cumari. **Horticultura Brasileira**. vol. 34, n. 4, pp. 498-506, 2016.

FIDALGO, O; BONONI, V, L.R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização do material botânico**. Instituto de Botânica, São Paulo, 1989.

FILHO, G. S. F. (org.) **Cultivo de Urucum Sistema de Produção**. Emater-RO, 2018.

FRANCO, C. F. O. FABRI, E. G.; BARREIRO NETO, M.; MANFIOLLI, M. H.; HARDER, M. N. C.; RUCKER, N. C. A. **Urucum: sistemas de produção para o Brasil**. EMEPA, João Pessoa, 2008.

FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; JOSÉ, A. R. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINÉLLI, I. S. C. **Urucueiro: Agronegócio de corantes naturais**. João Pessoa/PB: Embrapa. p. 120, 2002.

GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**. vol.42, n.8, p.1510-1517, 2012.

HUBER, J. Novitates Florae Amazonicae. **Boletim do Museu Paraense de Historia Natural e Ethnographia**. vol. 6, n. 2, pp. 60-90, 1910.

IBGE. **Cidades e Estados**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mt/alta-floresta.html>. Acesso em: 30 de janeiro de 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- CIDADES. **Senso agropecuário**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/24/76693>. Acesso em: 23 de agosto de 2019.

JESUS, F. N.; MACHADO, C. F.; SOUZA, V. O.; MATOS, M. S. S.; SILVA, J. S.; LEDO, C. A. S.; FALEIRO, F. G. Caracterização morfoagronômica de acessos da coleção de maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. n. 61, pp. 1-26, 2014.

KAGEYAMA P. Y.; GANDARA F. B. **Indicadores de sustentabilidade de florestas naturais**. Série Técnica IPEF. vol. 12, n. 31, pp. 79-84, 1998.

LINNAEUS, C. Species Plantarum. Vol. 1. **Impensis Laurentii Salvii**, Holmiae. pp. 1-560, 1753.

LLERAS, E. *Bixa arborea* in *Bixa* (Bixaceae) in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB005744>. Acesso em: 31 de dezembro de 2020.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2ª ed., p. 544, 2008.

MACHADO, P. D. S. **Caracterização do Uxi (Endopleura uchi) em três estádios de desenvolvimento**. Dissertação de mestrado. Lavras: UFLA, p. 97, 2015.

MANTOVANI, N. C.; GRANDO, M. F.; XAVIER, A.; OTONI, V. C. Avaliação de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.) por meio da caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. **Ciência Florestal**. vol. 23, n. 2, pp. 355-362, 2013.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 45, n. 4, pp. 1050-1054, 1997.

MOREIRA, P. A., LINS, J., DEQUIGIOVANNI G., VEASEY E. & CLEMENT C. R. The Domestication of Annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. **Economic Botany**. vol. 69, n. 2, pp. 127–135, 2015.

MOREIRA, V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros in natura e encapsulado**. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga-BA, p. 87, 2013.

NEWBOLD, T. HUDSON, L.; HILL, S.; CONTU, S.; LYSENKO, I.; SENIOR, R.; BÖRGER, L.; BENNETT, D.; CHOIMES, A.; COLLEN, B.; DAY, J.; DE PALMA, A.; DIAZ, S.; ECHEVERRIA-LONDONO, S.; EDGAR, M.; FELDMAN, A.; GARON, M.;

HARRISON, M.; ALHUSSEINI, T.; PURVIS, A. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. **Nature**. vol. 520, 2015.

OLIVEIRA, A. C. A. X.; SILVA, I. B.; MANHÃES-ROCHA, D. A.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Induction of liver monooxygenases by anatto and bixin in females rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. p.113-118, 2003.

PILLAI, S.; SONI, S.; DHULAP, S.; HIRWANI, R. R. Pharmacological and cosmeceutical applications of *Bixa orellana* L.: a review of the scientific and patent literature. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. vol. 9, n. 4, pp. 281-289, 2018.

PMAF. Prefeitura municipal de Alta Floresta (MT) - **Geografia**. Disponível em: https://www.gp.srv.br/transparencia/altafloresta/servlet/inf_div_detalhe?12. Acesso em: 30 de janeiro de 2021.

POLTRONIERI, M. C.; MARTINS, C. S.; RODRIGUES, J. E.; COSTA, M. R.; NAZARÉ, R. F. R. **Novas Cultivares de Urucum: Embrapa 36 e Embrapa 37**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, p. 21, 2001.

POPPENDIECK, H. H. Cochlospermaceae. **Flora Neotropica Monograph**. vol. 27, pp.1-33, 1981.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina-PR: Editora Planta, 2001.

RADDATZ-MOTA, D.; PÉREZ-FLORES, L. J.; CARRARI, F.; MENDOZAESPINOZA, J. A.; LEÓN-SÁNCHEZ, F. D.; PINZÓN-LÓPEZ, L. L.; GODOY-HERNÁNDEZ, G.; RIVERA-CABRERA, F. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of Food, Science and Technology**. vol. 54, n. 6, pp.1729–1741, 2017.

RADFORD, A. E.; DICKISON, W. C.; MASSEY, J. R.; BELL, C. R. **Vascular plant systematics**. Harper & Row, New York, p. 89, 1974.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. 2. ed. Manaus, Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, pp. 201-205, 2001.

RIVERA-MADRID, R.; AGUILAR-ESPINOSA, M.; CÁRDENAS-CONEJO, Y.; GARZA-CALIGARIS, L. E. Carotenoid derivatives in Achiote (*Bixa orellana*) seeds: synthesis and health promoting properties. **Frontiers in Plant Science**. vol. 7, p. 1406, 2016.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. RIVERA-MADRID, R. The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (Achiote). **Planta**, vol. 248, pp. 267–277, 2018.

SILVA, S. B.; SOUSA, V.; SANTOS, C.; MARIANO, D.; OKUMURA, R. Levantamento florístico do componente arbustivo-arbóreo da vegetação ciliar de fragmento no rio Parauapebas. **Revista Agroecossistemas**. vol. 9, n. 1, pp. 99-115, 2017.

SOARES, V. L.; RODRIGUES, S.M.; OLIVEIRA, T. M.; QUEIROZ, T. O.; LIMA, L. S.; HORA JUNIOR, B. T.; GRAMACHO, K.P.; MICHELI, F.; CASCARDO, J. C. M.; OTONI, W. C.; GESTEIRA, A.; COSTA, M. G. C. Unraveling new genes associated

with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. **Molecular Biology Reporter**, vol. 38, n. 2, pp. 1329-1340, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. 4 ed. Instituto Plantarum, p. 768, 2019.

STEVENS, P. F. (2001 onwards). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]." will do. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

SUASSUNA, T. M; FREITAS, F. O.; MATOS, R. G. Caracterização de variedades de amendoim provenientes do Parque nacional do Xingu. In. Diálogos de saberes - relatos da Embrapa. **Embrapa**, 2016.

VAN DER VALK, A. G. Succession in wetlands: a Gleasonian approach. **Ecology**, vol. 62, n. 3, pp. 689-696, 1981.

ZAPPI, D. C. SASAKI, D.; MILLIKEN, W.; PIVA, J.; HENICKA, G. S.; BIGGS, N.; FRISBY, S. Plantas vasculares da região do Parque Estadual Cristalino, norte de Mato Grosso, Brasil. Manaus, **Acta Amazônica**, vol. 41, n. 1, pp. 29-38, 2011.

5. CAPÍTULO 2

QUANTIFICAÇÃO DO DNA NUCLEAR E CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DOS FRUTOS DE *Bixa arborea* e *Bixa orellana*

FURINI, Thatielen; M. Sc; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Calos Alberto Reyes Maldonado; março de 2021. Quantificação do DNA nuclear e caracterização biométrica dos frutos de *Bixa arborea* e *Bixa orellana*. Professora Orientadora: Dr^a Isane Vera Karsburg. Coorientador: Prof Dr. José Martins Fernandes

RESUMO

Bixa arborea e *Bixa orellana* são ricas em carotenoides, compostos antioxidantes e vitaminas, e por isso muito utilizadas pela população como fonte de alimento e remédios. Estas duas espécies são muito semelhantes morfologicamente, tornando-se, necessária, a caracterização genética por meio da análise da quantidade de DNA nuclear. Assim, esse trabalho teve como objetivo fazer a quantificação do DNA nuclear de *Bixa arborea* e *Bixa orellana*. Para isso foi realizada a biometria dos frutos das duas, além de análise do conteúdo de DNA por meio de citometria de fluxo. A quantidade de DNA nuclear não apresentou diferença significativa entre as duas espécies e entre os indivíduos de *B. arborea*. Dessa forma, podemos concluir que as duas espécies não possuem diferença significativa no tamanho do genoma, sendo o formato do fruto e a quantidade de sementes o mais indicado para separar as duas espécies.

Palavras-chave: citometria de fluxo; material genético; cromossomos.

ABSTRACT

Bixa arborea and *Bixa orellana* are rich in carotenoids, antioxidant compounds and vitamins, and are therefore widely used by the population as a source of food and medicines. These two species are very similar morphologically, making genetic characterization necessary by analyzing the amount of nuclear DNA. Thus, this work aimed to quantify the nuclear DNA of *Bixa arborea* and *Bixa orellana*. For this, the biometrics of the fruits of the two were carried out, in addition to analysis of the DNA content by means of flow cytometry. The amount of nuclear DNA showed no significant difference between the two species and between individuals of *B. arborea*. Thus, we can conclude that the two species have no significant difference in the size of the genome, with the shape of the fruit and the quantity of seeds being the most suitable to separate the two species.

Keywords: flow cytometry; genetic material; chromosomes.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil existem cerca de 33.099 espécies de angiospermas, muitas delas utilizadas como alimentos, plantas medicinais ou fitoterápicos (CALIXTO, 2005; CRAGG e NEWMAN 2013; MENEGUELLI et al. 2017; BFG 2018). Dentre elas estão as espécies do gênero *Bixa* L. (Bixaceae), conhecidas como urucum, algumas utilizadas pela população para fins alimentícios e medicinais (GARCIA et al. 2012; PILLAI et al. 2018), como *Bixa arborea* Huber e *Bixa orellana* L. Embora as duas espécies sejam nativas do Brasil, não são endêmicas do nosso território, ocorrendo em toda a América do Sul (RADDATZ-MOTA et al. 2017). São morfologicamente próximas e exploradas pela população, que utiliza os frutos para a extração do pigmento e as folhas como fitoterápico (CASTRO et al. 2009; RADDATZ-MOTA et al. 2017).

As espécies se diferenciam além dos aspectos morfoagronômicos, por padrões genotípicos distintos (ALMEIDA et al., 2006; LOMBELLO e PINTO-MAGLIO, 2014). A maior parte dos estudos citogenéticos para o gênero *Bixa* tem demonstrado que *B. arborea* diferencia-se de *B. orellana*, pois apresenta $2n = 14$ cromossomos (LOMBELLO e PINTO-MAGLIO, 2014). Neste um par de cromossomo com o dobro do tamanho dos demais, o que caracteriza um cariótipo bimodal para a espécie (MORAWETZE 1986; LOMBELLO e PINTO-MAGLIO, 2014). *B. orellana* apresenta $2n = 16$ cromossomos (KRISHNAN e AYYANGAR, 1987) e também apresenta um cariótipo bimodal. No entanto, estudos citogenéticos ainda são necessários para aumentar o conhecimento do cariótipo das espécies devido à ampla distribuição geográfica que elas apresentam (JHA e NATH, 2016).

A biometria dos frutos é um processo que é muito utilizado em estudos de melhoramento genético (PINÃ-RODRIGUES 2002). Isso acontece porque essa metodologia permite verificar a relação da variabilidade com os fatores ambientais em que a planta está submetida (GONÇALVES et al. 2013). Aliado a isso, o estudo da biometria dos frutos permite traçar estratégias para germinação e produção de mudas para espécies com potencial madeireiro ou de restauração florestal (PINÃ-RODRIGUES, 2002), estudo da propagação das espécies (BASKIN e BASKIN, 1998; ALVES et al. 2007) garantindo o uso racional da flora (GUSMÃO et al. 2006; BARROSO et al. 2016). Em suma, o estudo da biometria dos frutos fornece meios para diferenciar espécies que fazem parte de um mesmo gênero que apresentam

semelhanças anatômicas e morfológicas bem variadas (CRUZ et al. 2001), até mesmo entre espécimes.

Por sua vez, a citometria de fluxo é um método vantajoso que permite quantificar o tamanho do genoma em plantas (COSTA, 2018). Esse método tem se mostrado como uma boa alternativa por diversos motivos: pode-se preparar e analisar diversas amostras em um mesmo dia, não necessita de células em divisão e é não destrutiva (BENET E LEITCH, 1995; FERNANDES, 2015). Deste modo, a quantidade de DNA de uma espécie pode ser mensurada através desse processo, que é muitas vezes usado para contar, examinar e classificar partículas microscópicas além de analisar as características físicas e químicas dos líquidos celulares (FALEIRO, 2012). Isso permite encontrar além do cariótipo das espécies, possíveis anomalias e aberrações celulares no material analisado (BENET E LEITCH, 1995; DOLEZEL, 1997).

Além disso, Dolezel (1997) assinala que a utilização da citometria de fluxo pode ser um importante aliado no melhoramento de plantas, nos seguintes processos: estabelecimento do nível de ploidia, identificação de haploides e duplo-haploides em culturas de anteras e ovários, verificação de novos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, detecção de aneuploides, uso no estudo da apomixia, da identificação do sexo em plantas dioicas, na identificação de híbridos, na identificação de polissomatia, no acompanhamento do desenvolvimento da semente e na identificação do produto de fusão de protoplastos.

Nesse contexto, a proposta deste capítulo é realizar um estudo sobre duas espécies botânicas muito utilizadas na alimentação e também como fitoterápico, *B. arborea* e *B. orellana*, para auxiliar a caracterização das mesmas, permitindo diferenciar uma da outra e criar bases para desenvolver estudos de melhoramento genético dessas espécies. Desse modo buscamos quantificar o DNA nuclear e a biometria dos frutos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, da Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado - Campus Universitário de Alta Floresta.

Para realização deste estudo foi utilizado como amostra, folhas e frutos de *B. arborea* e *B. orellana* coletadas em Alta Floresta-MT.

2.2 Obtenção do material vegetal

As duas espécies de *Bixa* pertencentes à família Bixaceae foram coletadas em Alta Floresta- MT. O município está localizado na região sul da Amazônia (56° 05' 10" W e 09° 52' 32" S), apresenta um clima tropical quente úmido, com temperaturas médias elevadas (23 a 26°C) durante o ano, com máximas diárias de 34 a 37°C. Os índices de pluviosidade anual acusam valores de 1.700 a 1.800 mm e ocorrem duas estações climáticas bem definidas, inverno seco e verão chuvoso (PEREIRA, 1995; ZAPPI et al., 2011). A vegetação é formada predominantemente por Floresta ombrófila aberta e densa, Floresta estacional e Cerrado (ZAPPI et al., 2011; PMAF, 2021). As principais atividades econômicas são prestação de serviços, agropecuária e agricultura (IBGE, 2021; PMAF, 2021). As coordenadas do local de coleta das duas espécies foram marcadas com GPS.

As variedades de *B. arborea* foram coletadas na propriedade de Terezinha Ruella de Oliveira (T.R.O), localizada na Estrada Vicinal 1 Oeste, 1 Zona Rural há aproximadamente 13 km do município de Alta Floresta - MT. Quanto à espécie *B. orellana* L. coletou-se dentro do perímetro urbano de Alta Floresta, localizada na rua Perimetral NW, nº 1.300, Bairro Boa Esperança (Figura 1).

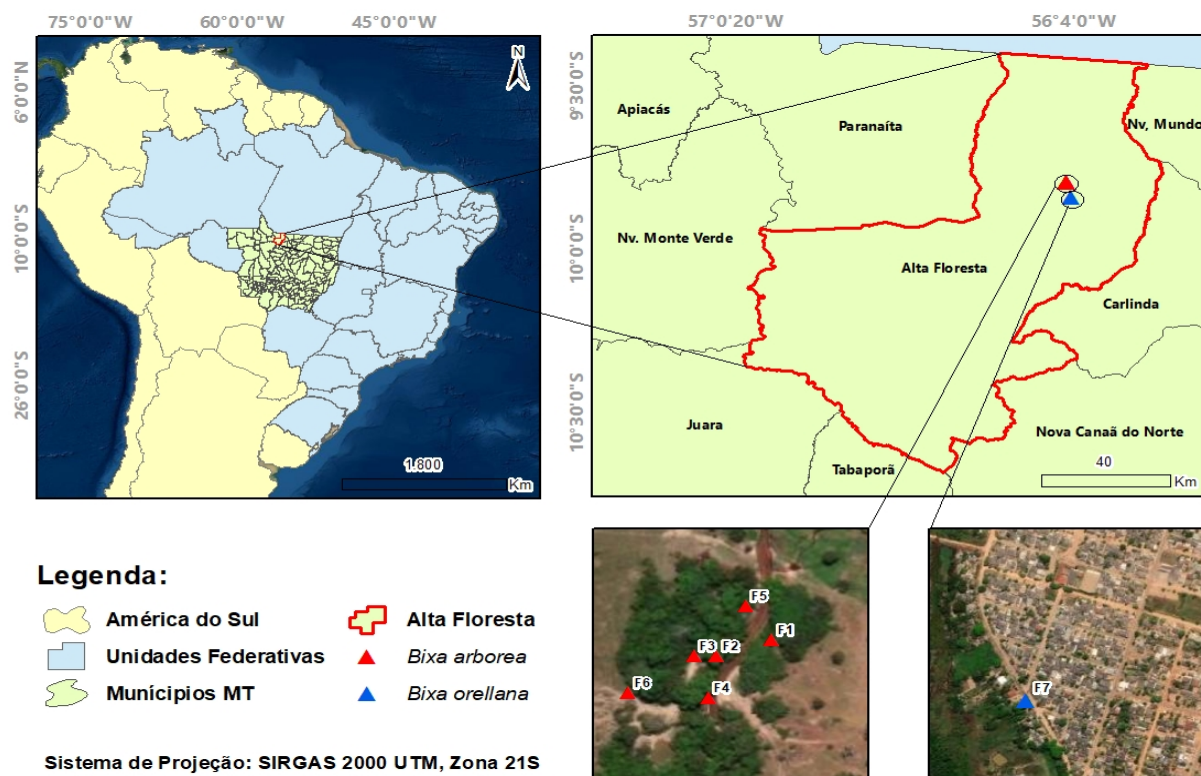


Figura 1. Localização das espécies de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* estudadas no município de Alta Floresta – MT (2020). Fonte: Marcos Vinícius Pazdiora Poletto

O material foi incorporado ao Herbário da Amazônia Meridional-(HERBAM) da Universidade do Estado de Mato Grosso, localizado no município de Alta Floresta - MT.

2.3 Estudo biométrico dos frutos e sementes

Foram analisados 30 frutos de *Bixa arborea* e 30 frutos de *Bixa orellana*. Os frutos foram secos em condições naturais antes de se iniciar os procedimentos metodológicos.

No Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta selecionamos oito características que foram observadas sob auxílio de uma balança de precisão e um paquímetro digital, são elas: comprimento total (cm), largura total (cm), espessura do fruto (cm), espessura do pericarpo (mm), peso do fruto (mg), peso da semente (mg), peso do pericarpo (mg) e número de sementes por fruto (Figura 2, 3 e 4).



Figura 2. Aspectos morfológicos dos frutos de *Bixa arborea* (F1 a F6) e *Bixa orellana*.

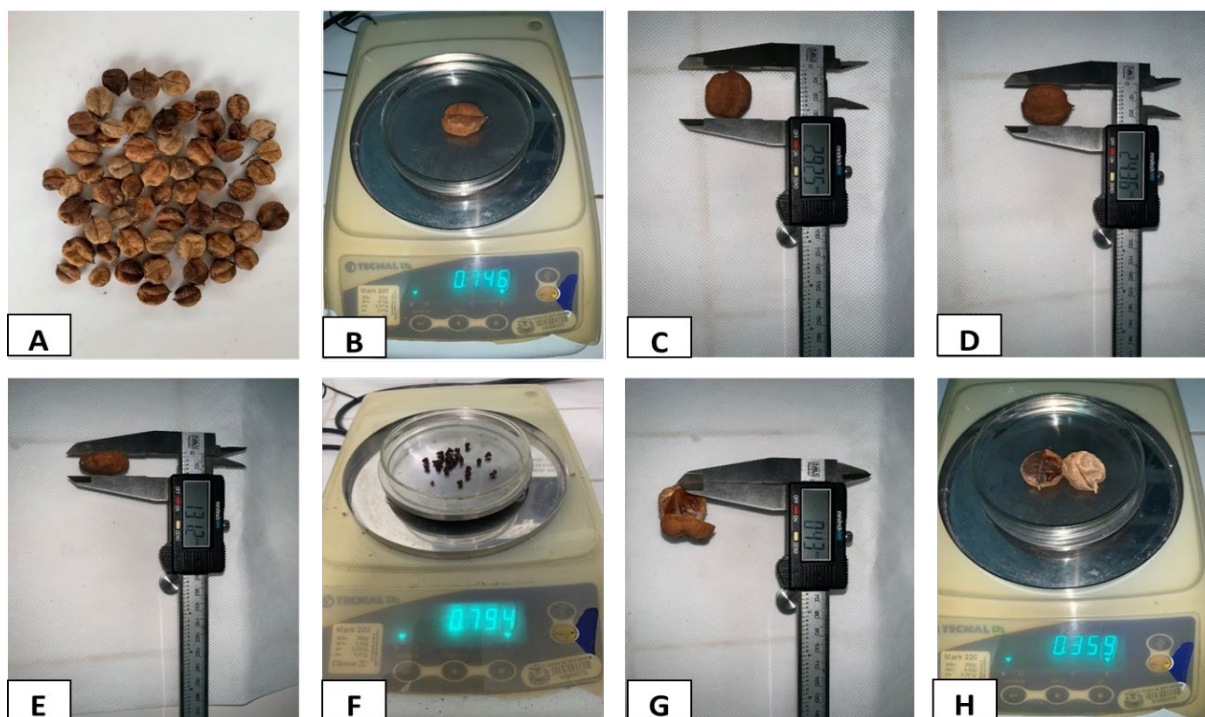


Figura 3. Procedimentos metodológicos utilizados durante a realização das análises biométricas de *B. arborea*. A: Seleção de 30 frutos; B: peso do fruto (mg); C: comprimento total do fruto (cm); D: largura total do fruto (cm); E: espessura do fruto (mm); F: peso (mg) e contagem do número de sementes por fruto; G: espessura do pericarpo (mm); H: peso do pericarpo (mg).

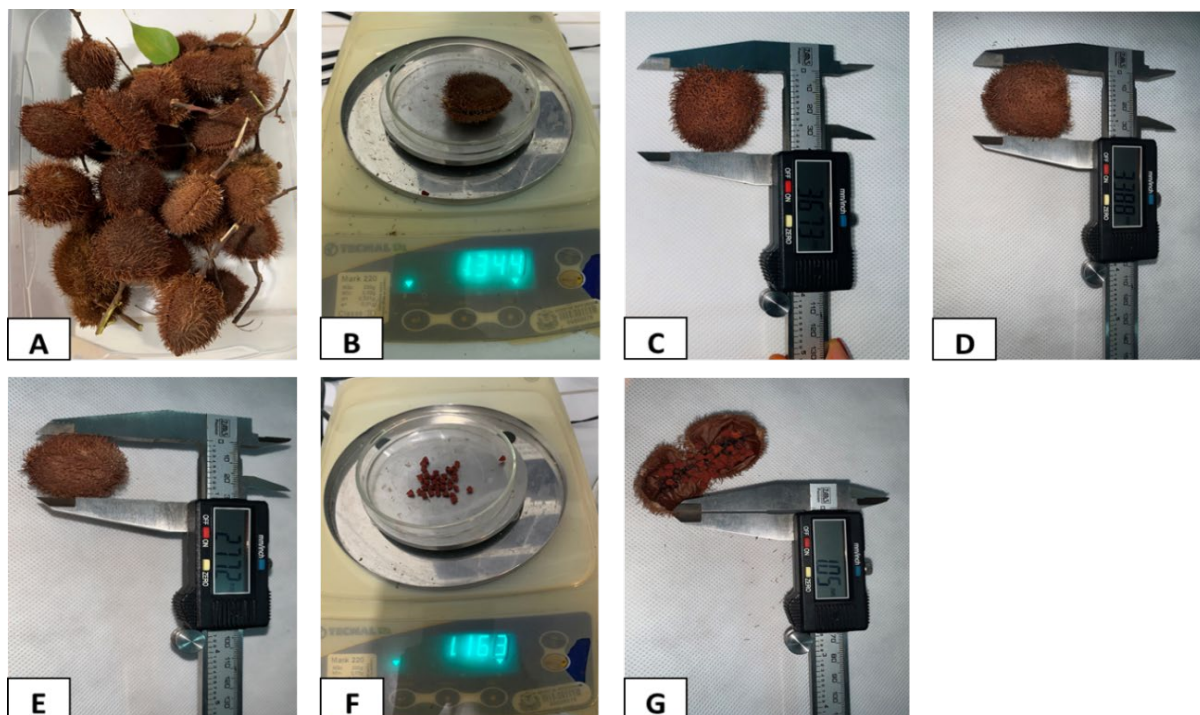


Figura 4. Procedimentos metodológicos utilizados durante a realização das análises biométricas de *B. orellana*. A: Seleção de 30 frutos; B: peso do fruto (mg); C: comprimento total do fruto (cm); D: largura total do fruto (cm); E: espessura do fruto (mm); F: peso (mg) e contagem do número de sementes por fruto; G: espessura do pericarpo (mm).

O agrupamento dos fenótipos foi realizado por meio do método de agrupamento UPGMA (ARRIEL et al., 2006), utilizando uma matriz de similaridade para os caracteres analisados, que se mostrou o mais adequado em relação aos métodos Ward e Vizinho mais próximo (LS). A importância relativa dos caracteres em relação à divergência genética entre as subamostras foi estudada segundo SINGH (1981). As análises dos dados foram realizadas com o auxílio do programa estatístico R.

2.4 Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo seguiu o protocolo proposto por Otto (1990) e Galbraith et al., (1983), (Figura 5).



Figura 5. Diagrama metodológico para análise do conteúdo de DNA nuclear dos tecidos foliares de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* por citometria de fluxo. Alta Floresta – MT (2020). Fonte: Thatielen Furini

2.4.1 – Coleta do Material vegetativo

Amostras de folhas frescas dos acessos de *Bixa arborea* e *B. orellana*. foram coletados, e posteriormente armazenadas em sacos plásticos luer lock, umedecidas com água destilada e acondicionadas em isopor com gelo seco e transportadas ao Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da Universidade Federal de Viçosa – UFV para análise de citometria de fluxo.

2.4.2 – Extrações dos fragmentos foliares

Foram realizadas extrações de fragmentos de discos foliares de 2 cm² de folhas jovens das espécies de *Bixa arborea* e *Bixa orellana*, tanto das amostras como do padrão interno. O padrão interno utilizado foi *Solanum lycopersicum* L.

As amostras e o padrão de referência *S. lycopersicum* com o conteúdo de DNA conhecido de 2C = 2,00 picogramas, (PRAÇA-FONTES et al., 2011) foram juntamente retalhados “chopped” (GALBRAITH et al., 1983) com auxílio de uma lâmina de bisturi

em uma placa de Petri, incluindo 0,5 mL de tampão de isolamento de núcleos OTTO I à 4°C (OTTO, 1990) por 30 segundos. Este tampão de isolamento, é suplementado com 2,0 mM ditioneitol-DTT (Sigma®) e 50µg mL⁻¹ RNase (Sigma®) (PRAÇA-FONTES et al., 2011).

2.4.3 – Extração do conteúdo de DNA nuclear

De acordo com esse protocolo (PRAÇA-FONTES et al., 2011), amostras de folhas de *B. arborea* e *B. orellana* foram colocadas em água destilada a 4 °C, em seguida retiradas, secas e cortadas. Em seguida as amostras foram cortadas em pedaços menores em uma placa de Petri contendo 0,5 mL de OTTO-I tampão de lise. Após incubação por 3 minutos, a suspensão foi filtrada em filtro de nylon com 30 µm, colocada em tubo de ensaio e enviada para a centrifugação por 5 minutos a 1100 rpm. Após a retirada do sobrenadante, o sedimento foi corado e colocado por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente para reagir com o corante. Em seguida foi filtrado e analisado no citômetro de fluxo para a quantificação do DNA.

2.4.4 – Processamento e Quantificação do DNA

O tamanho do genoma do gênero *Bixa* foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$2C_B = \left(\frac{C1}{C2} \right) \times 2C_S$$

Onde:

2C_B: valor do conteúdo de DNA 2C (pg) de cada espécie de *Bixa*.

C1: média do canal do pico G0 / G1 das espécies de *Bixa*.

C2: média do canal do pico G0 / G1 de *S. lycopersicum*.

2C_S: valor do conteúdo de DNA 2C de *S. lycopersicum* (2,00 pg).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, observa-se que a quantidade de DNA nuclear entre *B. arborea* (os valores médios variaram de 0,575 pg a 0,624 pg) e *B. orellana* (0,589 pg ±0,005) não diferiram de forma significativa, embora as duas espécies apresentaram diferenças

morfológicas. Os resultados mostraram que há formação de duas populações distintas, que estão relacionados às duas espécies diferentes analisadas (figura 6).

Da mesma forma os 6 fenótipos de *B. arborea* analisados não apresentaram diferença significativa entre eles, sendo o fenótipo 1 o que apresentou maior quantidade de DNA nuclear ($0,624 \text{ pg} \pm 0,009$), o fenótipo 5 foi o que apresentou menor quantidade de DNA nuclear, ($0,575 \text{ pg} \pm 0,005$) (Tabela 1). Não podemos afirmar que existe variabilidade e existência de híbridos entre os fenótipos analisados, embora eles apresentem diferenças fenotípicas marcantes.

Tabela 1. Conteúdo de DNA (em pg) apresentado por cada um dos genótipos analisados através da Citometria de Fluxo

Genótipos	Canal	Conteúdo de DNA (pg) (média)	Desvio Padrão	CV (%)
<i>Bixa arborea</i> 1	79,75	0.624a	0.009	1.62
<i>Bixa arborea</i> 1	85,81			
<i>Bixa arborea</i> 2	83,48	0.609ab	0.005	1.62
<i>Bixa arborea</i> 2	83,39			
<i>Bixa arborea</i> 3	83,54	0.617a	0.009	1.62
<i>Bixa arborea</i> 3	81,09			
<i>Bixa arborea</i> 4	79,75	0.586ab	0.004	1.62
<i>Bixa arborea</i> 4	79,99			
<i>Bixa arborea</i> 5	80,49	0.575b	0.005	1.62
<i>Bixa arborea</i> 5	78,26			
<i>Bixa arborea</i> 6	78,00	0.619a	0.007	1.62
<i>Bixa arborea</i> 6	77,95			
<i>Bixa orellana</i> 7	83,30	0.589ab	0.005	1.62
<i>Bixa orellana</i> 7	88,22			

A quantidade de DNA nuclear depende da história evolutiva e adaptativa do organismo e de como ele se adequou ao ambiente, refletindo no fenótipo (BENNET, 1972; SCHIFINO-WITTMANN, 2001). Embora, seja normal encontrar diferença na quantidade de DNA entre os indivíduos de uma mesma espécie, pois, isso decorre do surgimento de estruturas no material genético, como novas bases nitrogenadas, decorrentes de pequenos ajustes que o organismo vai sofrendo pelo contato com o meio (DAMATTA et al., 2010; FREITAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013), nossos resultados não apresentaram diferença significativa, o que pode estar relacionado com outros fatores que não foram explorados nesse trabalho, como a perda da

variabilidade genética devido ao aumento da endogamia e deriva genética, decorrente do pequeno tamanho da população estudada (CUSHMAN et al., 2016)

Infelizmente estudos voltados para caracterização genética de espécies do gênero *Bixa* são muito escassos. No entanto hoje sabe-se que *Bixa orellana* é uma espécie que possui um número de cromossomos que pode variar de $2n = 14$ (MUKHERJEE, 1975; ALMEIDA et al., 2006; HANSON et al., 2001; OHRI et al., 2004), até $2n = 16$ (SIMMONDS, 1954; KRISHNAN e AYYANGAR, 1987; RIVERA-MADRID et al., 2006).

Outros estudos mostram que *B. orellana* possui 0,78 pg de DNA nuclear (OHRI et al., 2004), o que difere consideravelmente dos nossos resultados. *B. arborea*, por sua vez, apresenta um número de cromossomos $2n = 14$ (MORAWETZ, 1986) e pouquíssimos estudos, o que pode estar relacionado ao fato de não ser explorada economicamente e nem de forma tradicional pela população, que utiliza *B. orellana* como fonte de sementes e folhas (LOMBELO e PINTO-MAGLIO, 2014; DEQUIGIOVANNI et al., 2018). *B. orellana* é muito utilizada porque apresenta grandes quantidades de compostos químicos que só são encontrados em alto teor nesta espécie, como apocarotenoides, bixina e norbixina, compostos fenólicos entre outros que são visados e usados principalmente como corante, na indústria e pela população (PACHECO et al., 2018).

O coeficiente de variação (CV) para todas as análises foi 1,62% o que mostra que as análises tiveram boa qualidade e, portanto, alta confiabilidade dos dados. O CV mostra nitidez e resolução do pico entre as fases G0/G1 e aponta a eficiência do corante utilizado (GONÇALVES et al., 2007). Alguns autores apontam que um CV menor que 5% é o ideal (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

É necessário salientar que os estudos que quantificam o DNA nuclear de espécies de *Bixa* são escassos (OHRI et al., 2004). A maior parte dos estudos de caracterização genética envolvendo espécies desse gênero está restrito à *B. orellana*, como demonstrado nos estudos supracitados neste trabalho (ver MUKHERJEE, 1975; ALMEIDA et al., 2006; HANSON et al., 2001; RIVERA-MADRID et al., 2006; MORAWETZ, 1986).

Estudos genéticos envolvendo *B. arborea* são inexistentes e, portanto, este trabalho se encontra na vanguarda. Assim, estudos mais detalhados são necessários para aumentar o conhecimento genético dessas espécies, como estudos citogenéticos e reprodutivos. Os estudos citogenéticos permitirão avaliar se existe

diferença genética significativa entre as duas espécies analisadas, pois a análise atual não demonstrou diferenças expressivas (PINTO-MAGLIO E PIEROZZI, 2015). Os estudos reprodutivos, de forma geral, por sua vez, permitirão saber se há troca de material genético entre essas duas espécies em ambientes onde elas coexistem (KAGEYAMA et al., 2003; HEREFORD, 2010) e dessa aumentará o entendimento sobre as relações de parentesco e da biologia evolutiva de *B. arborea* e *B. orellana*.

O dendrograma, construído por meio do método do UPGMA, com base em uma matriz de distância euclidiana utilizando a morfometria dos frutos, mostrou a formação de dois grupos principais pelo método de Toucher: um formado pelo fenótipo 7 e um outro formado pelos fenótipos 2 e 6, 3, 5 e 1 e 4. Neste caso, o fenótipo 7 se refere a *B. orellana*, enquanto o segundo grupo é formado pelos fenótipos de *B. arborea* (figura 6). As variáveis que mais explicaram esse agrupamento foram em ordem decrescente: número de sementes, comprimento total, largura e espessura do fruto (tabela 2). Esses resultados mostraram que entre espécies a variação genotípica pode acompanhar a variação fenotípica, embora em nossos resultados não foi possível verificar isso. Esse fato pode estar relacionado com o baixo número de amostra que foi possível coletar. No entanto, esse mesmo padrão não acontece com a variação intraespecífica, pois não parece existir relação entre variação genotípica e a variação fenotípica. No entanto, novas análises estatísticas são necessárias, com um número maior de amostras.

A análise de agrupamento, tem sido cada vez mais utilizada e busca por meio de critérios de classificação, agrupar genótipos variados com base em maior ou menor semelhança de caracteres (CRUZ et al., 2012). O método do UPGMA é o método mais utilizado e mais popular entre as análises de agrupamento, sendo utilizado na biologia, em análises genéticas, filogenéticas, evolutivas e ecológicas (DHAESELEER, 2005). Neste contexto um dendrograma pode mostrar as relações evolutivas entre os indivíduos analisados com base nas características físicas (HUA et al. 2017). O método do UPGMA foi o mais indicado, pois, foi o que apresentou maior correlação cofenética (0,98) para os dados biométricos analisados.

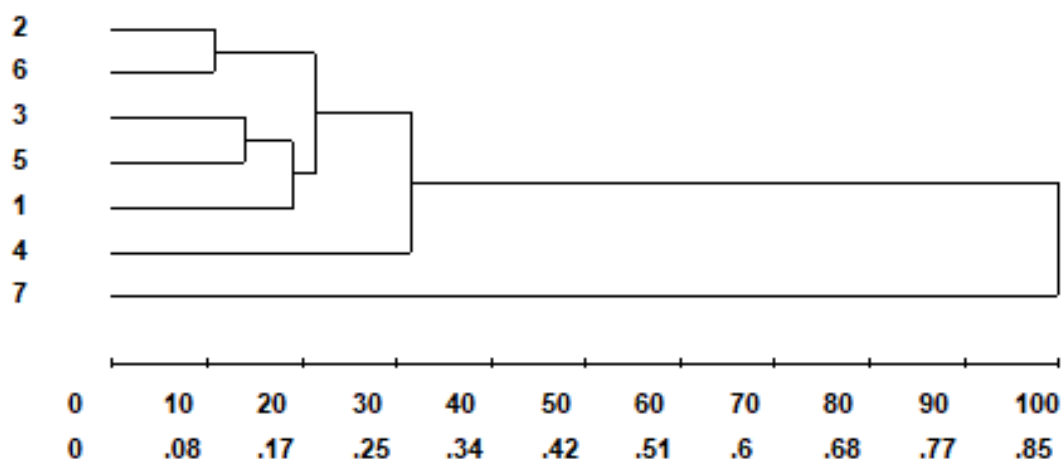


Figura 6. Dendrograma obtido pelo método UPGMA para seis fenótipos de *Bixa arborea* e um fenótipo de *Bixa orellana* em Alta Floresta – MT

Tabela 2. Contribuição relativa de oito variáveis para a divergência genética conforme Singh (1981) dos frutos de *Bixa arborea* e *Bixa orellana* em Alta Floresta - MT

Variável	Contribuição (%)
Número de Sementes	67,46
Comprimento total do fruto	16,133
Largura do fruto	6,183
Espessura do Fruto	9,851
Peso do Fruto	0,229
Peso da Semente	0,060
Peso do Pericarpo	0,053
Espessura do Pericarpo	0,025

Algumas pesquisas mostram que o estudo da diversidade genética das espécies vegetais pode ser realizado a partir de análises das características morfológicas dos espécimes (SHYMOYA et al., 2002), pois dessa forma, pode-se contribuir para o melhoramento genético, a partir da seleção de genótipos cada vez mais produtivos ou resistentes. Isso acontece porque o genótipo das espécies está estritamente dependente das características ambientais (MENEZES et al., 2011), como maior disponibilidade de nutrientes, água e luminosidade.

4. CONCLUSÕES

Nossa análise não mostrou diferença significativa no que se refere à quantidade de DNA nuclear entre espécies, nem intraespécies. Esses resultados podem estar relacionados com as características dos grupos de indivíduos utilizados como fonte de material: ambos eram formados por populações pequenas e no caso de *B. orellana*, foi utilizado um único indivíduo como amostra.

Em contrapartida a biometria dos frutos e a análise de agrupamento foi eficiente em formar dois grupos distintos, portanto, o fruto demonstrou ser uma boa estrutura para a diferenciação interespecífica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Classical and molecular cytogenetic tools to resolve the *Bixa* karyotypes. **Cytologia**, vol. 71, pp. 391–8, 2006.
- ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; ALVES, A. U.; CARDOSO, E. A.; GALINDO, E. A.; BRAGA JUNIOR, J. M. Germinação e biometria de frutos e sementes de *Bauhinia divaricata* L. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 7, n. 3, p. 193-198, 2007.
- ARRIEL, N. H. C.; DI MAURO, A. O.; DI MAURO, S. M. Z.; BAKKE, O. A.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; COSTA, M. M.; CAPELOTO, A.; CORRADO, A. R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 41, n. 5, pp. 801-809, 2006.
- BARROSO, R. F. et al. Biometria de frutos e sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 5, p. 155-160, 2016.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. London: Academic Press, 1998.
- BENNET, M.D., LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, vol.76, p. 113-176, 1995.
- BFG - The Brazil Flora Group Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, vol. 69, n. 4, pp. 1513-1527, 2018.
- CALIXTO, J. B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal Ethnopharmacol.** vol. 100, pp. 131–134, 2005.
- CASTRO, C. B.; MARTINS, C. S.; FALES, I. C.; NAZARE, R. F. R.; KATO, O. H.; BENCHIMOL, R. L.; VENTURIERI, M. M. **A cultura do urucum**. 2ª. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 61, 2009.
- COSTA, L. A. S. **Primeira lista de plantas tropicais propostas como padrões de referência para estimativa de tamanho do genoma por citometria de fluxo**. Dissertação. Recife, PE, p. 84, 2018.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1830, pp. 3670-3695, 2013.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas**. 4 ed. vol.1. Viçosa: UFV, 2012.
- CRUZ, E. D.; MARTINS, F. O.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 24, n. 2, p. 161-165, 2001.
- CUSHMAN, S. A.; MCRAE, B. H.; MCGARIGAL, K. Basics of Landscape Ecology: An Introduction to Landscapes and Population Processes for Landscape Geneticists. In: BALKENHOL, N. et al., **191 Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications**. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 35-57, 2016.

DAMATTA, F. M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, C. C.; BUCKERIDGE, M. S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. **Food Research International**. vol. 43, n. 7, p. 1814-1823, 2010.

DEQUIGIOVANNI G. et al., New microsatellite loci for annatto (*Bixa orellana*), a source of natural dyes from Brazilian Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, vol. 18, pp. 116-122. 2018

D'HAESELEER, P. How does gene expression clustering work? *Nature Biotechnology*. vol. 23, n. 12, pp.1499-501, 2005.

DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: WUV-Universitätsverlag, pp.80-90, 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. A. N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**. vol. 95, n. 1, pp. 99-110, 2005.

FALEIRO, F. G. **Génética e biotecnologia aplicada ao melhoramento genético vegetal**. Relatório de pós-doutorado. Embrapa cerrados, Planaltina, p. 74, 2012.

FB - **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 27 fev. 2021

FERNANDES, A. F. R. S. **Citogenética e citometria de fluxo de espécies de *Dorstenia* (Moraceae) endêmicas da Floresta Atlântica**. Dissertação. Alegre, ES, p. 57, 2015.

FREITAS, K. et al., Adaptação de *Tibouchina granulosa* submetida à aplicação de Alumínio. *Floresta Ambient*. **Seropédica**. vol. 24, 2017.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**. vol. 220, n. 4601, pp. 1049-1051, 1983.

GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**. vol.42, n. 8, pp.1510-1517, 2012.

GONÇALVES, C.; CASTRO, C.E.F.; FILHO, J.A.A.; DIAS-TAGLIACOZZO, G.M. Evaluation of *Costus* species and their use as indoor potted-plants. **Acta Horticulturae**. vol. 683, pp. 319-325, 2007.

GONÇALVES, L. G. V. et al. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**. vol. 36, n. 1, p. 31-40, 2013

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA JÚNIOR, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonma verbascifolia* Rich. Ex. A. Juss.). **Cerne**. vol. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

HANSON, L.; MCMAHON, K. A.; JOHNSON, M. A. T.; BENNETT, M. D. First Nuclear DNA C-values for 25 Angiosperm Families. **Annals of Botany**. vol. 87, n. 2, pp. 251-258, 2001.

HEREFORD, J. Does selfing or outcrossing promote local adaptation? **American Journal of Botany**. vol. 97, pp. 298–302, 2010.

HUA, G. J.; HUNG, C. L.; LIN, C. Y.; WU, F. C.; CHAN, Y. W.; TANG, C. Y. MGUPGMA: A Fast UPGMA Algorithm With Multiple Graphics Processing Units Using NCCL. **Evolutionary Bioinformatics**. vol. 13, 2017.

IBGE. **Cidades e Estados**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mt/alta-floresta.html>. Acesso em: 30 de janeiro de 2021.

JHA, T. B.; NATH, S. EMA based chromosome analysis in *Bixa orellana* L. and *Limonia acidissima* L. **Nucleus**. vol. 59, p. 93. 2019.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENKOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**. n. 64, p. 93-107, 2003.

KRISHNAN, N.; AYYANGAR, K. R. Taxonomical relationships of *Bixa* L. **Proceedings of the Indian Science Congress**. vol. 74, pp. 105, 1987.

LOEWENSTEIN, Y.; PORTUGALY, E.; FROMER, M.; LINIAL, M. Efficient algorithms for accurate hierarchical clustering of huge datasets: tackling the entire protein space. **Bioinformatics**. vol. 24, n. 13, pp. i41-i49, 2008.

LOMBELLO, R. A.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. Cytogenetics and Reproductive Biology of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). **Cytologia**. vol. 79, pp. 379– 86, 2014.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**. vol. 98, pp. 679-689, 2006.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Citometria de fluxo I: Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do Genoma Vegetal**. Boletim de Biotecnologia: Métodos em biotecnologia. 2004.

MACEDO, M. C. DE.; SCALON, S. DE P. Q.; SARI, A. P.; SCALON FILHO, H.; ROSA, Y. B. C. J.; ROBAINA, A. D. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* St. Hil (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. vol. 31, n. 2, p. 202-211, 2009

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**. vol.78, pp. 41-51, 1993.

MARQUES, R. E. et al., Distinção de espécies e estádios de maturação de sementes de *Comanthera* spp. por análise de imagem e citometria de fluxo. **Revista de Ciências Agrárias de Portugal**. vol. 42, n. 1 2019.

MENEGUELLI, A. Z.; RIBEIRO, S. B.; LIMA JÚNIOR, G. A.; SPIROTTTO, E. O.; SOUZA, J. H. G. A Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na saúde pública brasileira. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva**. vol. 1, n. 1, pp. 2-12, 2017.

MENEZES, A. P. S.; SILVA, J.; ROSSATO, R. R.; SANTOS, M. S.; DECKER, N.; SILVA, F. R.; CRUZ, C.; DIHL, R. R.; LEHMANN, M.; FERRAZ, A. B. Genotoxic and

biochemical changes in *Baccharis trimera* induced by coal contamination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. vol. 114, p. 9-16, 2015.

MORAWETZ, W. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. **Plant Systematic and Evolutions**. vol. 152, pp. 49–100, 1986.

MUKHERJEE, P. Cytotaxonomical studies on *Bixa* and *Flacourtia*. **Bulletin of the Botanical Society of Bengal**. vol. 29, pp. 25–27, 1975.

OHRI, D.; BHARGAVA, A.; CATTERJEE, A. Nuclear DNA amounts in 112 species of tropical hardwoods —new estimates. **Plant Biology**. vol. 6, pp.555–561, 2004.

OLIVEIRA, S. G.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in Scarabaeinae coleopterans. **Molecular Cytogenetics**. vol. 6, 2013.

OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. **Methods in cell biology**. vol. 33, pp. 105-110, 1990.

PACHECO, G. et al., Genetic, evolutionary and phylogenetic aspects of the plastome of annatto (*Bixa orellana* L.), the Amazonian commercial species of natural dyes. **Planta**. vol. 249, n. 2, pp. 563-582, 2019.

PEREIRA, F. R. S. **Metais pesados nas sub-bacias hidrográficas de Poconé e Alta Floresta**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq. 1995.

PILLAI, S.; SONI, S.; DHULAP, S.; HIRWANI, R. R. Pharmacological and cosmeceutical applications of *Bixa orellana* L.: a review of the scientific and patent literature. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. vol. 9, n. 4, pp. 281-289, 2018.

PINÃ-RODRIGUES, F.C.M. Guia prático para a colheita e manejo de sementes florestais tropicais. Rio de Janeiro, IDACO. 2002.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; PIEROZZI, N. I. Caracterização citogenética. In: VEIGA, R. F. A.; QUEIRÓZ, M. A. (ed). **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. Viçosa: UFV. pp.204-213, 2015.

PMAF. Prefeitura municipal de Alta Floresta (MT) - **Geografia**. Disponível em: https://www.gp.srv.br/transparencia_altafloresta/servlet/inf_div_detalhe?12. Acesso em: 30 de janeiro de 2021.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. **Plant Cell Reproduction**. vol. 30, pp. 2303–2312, 2011.

RADDATZ-MOTA, D.; PÉREZ-FLORES, L. J.; CARRARI, F.; MENDOZAESPINOZA, J. A.; LEÓN-SÁNCHEZ, F. D.; PINZÓN-LÓPEZ, L. L.; GODOY-HERNÁNDEZ, G.; RIVERA-CABRERA, F. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of Food, Science and Technology**. vol. 54, n. 6, pp.1729–1741, 2017.

RIVERA-MADRID, R. et al., Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**. vol. 109, n. 2, pp. 165-172, 2006.

SANTOS, G. R. **Citogenetica classica e molecular de especies do genero *Manihot Miller* (Euphorbiaceae Juss.)**. Dissertação- Mestrado em botânica. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE. p. 52, 2014.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**. vol. 31, n. 5, pp. 897-902, 2001.

SHYMOYA, A.; PEREIRA, A. V.; FERREIRA, R. P.; CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Repetibilidade de características forrageiras do capim-elefante. **Scientia Agricola**. vol. 59, n. 2, pp. 227-234, 2002.

SIMMONDS, N. W. Chromosome behaviour in some tropical plants. **Heredity**. vol. 8, pp. 139–145, 1954.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding**. vol. 41, pp. 237-245, 1981.

SUDA, J.; LEITCH, J. I. A busca por padrões de referência adequados na pesquisa do tamanho do genoma. **Cytometry Part A**. vol.77, pp. 717–720. 2010.

ZAPPI, D. C. SASAKI, D.; MILLIKEN, W.; PIVA, J.; HENICKA, G. S.; BIGGS, N.; FRISBY, S. Plantas vasculares da região do Parque Estadual Cristalino, norte de Mato Grosso, Brasil. Manaus, **Acta Amazônica**, vol. 41, n. 1, pp. 29-38, 2011.

