

ELYABE MONTEIRO DE MATOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E
EXPRESSÃO DE GENES *SERK* DURANTE A EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM *Bixa orellana* L. (BIXACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M433c
2013
Matos, Elyabe Monteiro de, 1981-
Caracterização morfoanatômica, histoquímica e expressão
de genes SERK durante a embriogênese somática *Bixa orellana*
L. (Bixaceae) / Elyabe Monteiro de Matos. – Viçosa, MG, 2013.
viii, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Urucum. 2. Embriogênese somática. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa
de Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22 ed. 583.625

ELYABE MONTEIRO DE MATOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E
EXPRESSÃO DE GENES *SERK* DURANTE A EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM *Bixa orellana* L. (BIXACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de junho de 2013.

Francisco André Ossamu Tanaka

Marcelo Rogalski

Andréa Dias Koehler
(Coorientadora)

Luzimar Campos da Silva
(Coorientadora)

Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Aos meus queridos pais,

Carlos Alberto Nascimento Matos e Raimunda Monteiro de Matos

Aos meus amigos

Ao grande companheiro e compreensivo amigo,

Wagner Campos Otoni,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus de tudo Criador e Regedor.

Aos meus pais pela confiança, pelo apoio em todos os momentos e pelo amor doado em todo o tempo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realização do Mestrado e Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV) e à Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) pelo apoio e suporte na condução deste trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ/USP), pelas análises em microscopia eletrônica realizadas.

Ao Prof. Wagner Campos Otoni, pela amizade, pela orientação, ensinamentos, pela confiança em mim depositada, paciência e por todo o apoio durante todos os momentos.

Ao Prof. Francisco Tanaka, Dra. Andréa Koehler, Dra. Ana Claudia Cruz e Profa. Luzimar, pelo grande auxílio na condução dos trabalhos.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal pelos ensinamentos e pelo agradável convívio.

Aos membros da banca examinadora pelo apoio, sugestões e críticas dadas ao trabalho.

Aos meus amigos do LCTII e laboratórios “agregados” pelos momentos inesquecíveis e pelo companheirismo, compartilhando as todas as alegrias e as poucas tristezas.

Aos amigos da CCB Viçosa pela excelente convivência, solidariedade, pelo caloroso acolhimento e felizes momentos compartilhados. Amigos para toda a vida.

A todos que, de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui e ajudaram na realização deste trabalho, e que por algum motivo não foi aqui citado, mas nem por isso são menos importantes.

OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Elyabe Monteiro de Matos, filho de Carlos Alberto Nascimento Matos e Raimunda Monteiro de Matos, nasceu em 11 de Setembro de 1981, na cidade de Itabuna, Bahia.

No ano de 2001, ingressou na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) para cursar Agronomia. De 2003 a 2006 foi bolsista de iniciação científica do CNPq e da Fapesb (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia), desenvolvendo pesquisa nas áreas de Fisiologia Vegetal (Estresse Abiótico) e Biologia Molecular (Proteômica).

Graduou-se em setembro de 2006 e ingressou no Mestrado em Botânica na Universidade Federal de Viçosa em março de 2007, concluindo-o em fevereiro de 2009 com a dissertação intitulada “Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos de hipocótilos e de raízes de urucum (*Bixa orellana* L.)”.

Em 2009, iniciou o curso de Doutorado no mesmo programa e desenvolveu a tese na área de cultura de tecidos, enfatizando a interação dessa área com aspectos moleculares e estudos de expressão gênica em urucum. A conclusão do curso ocorreu com a defesa da tese em junho de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO I.....	14
MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bixa orellana</i> L.....	14
RESUMO	14
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	18
Material vegetal para indução de embriogênese somática	18
Caracterização estrutural e histoquímica dos embriões zigóticos e somáticos de <i>B. orellana</i>	19
Microscopia de luz e caracterização histoquímica.....	19
Microscopia eletrônica de varredura	19
RESULTADOS.....	20
Análise morfológica de embriões somáticos.....	20
Caracterização anatômica dos embriões somáticos	22
Análises histoquímicas.....	25
DISCUSSÃO	28
Reguladores de crescimento e embriogênese somática	28
Alterações anatômicas na embriogênese somática	29
Análises histoquímicas e mobilização de reservas.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO II	41
CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES <i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)</i> EM <i>Bixa orellana</i> L.	41
RESUMO	41
MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF <i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)</i> GENES IN <i>Bixa orellana</i> L.	43
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	47
Material vegetal para indução de embriogênese somática.....	47
Clonagem e caracterização de genes <i>SERK</i> em <i>B. orellana</i>	48
Extração de RNA total	48

Síntese de cDNA fita simples (Superscript II – Invitrogen™)	48
Amplificação e clonagem da sequência codificadora de <i>SERK</i>	48
Sequenciamento dos clones e análise das sequências	50
Análise filogenética.....	50
Localização dos transcritos dos genes <i>SERK</i> durante a embriogênese de <i>B. orellana</i> por hibridização in situ.....	51
Coleta e preparo dos tecidos	51
Síntese das sondas <i>sense</i> e <i>antisense</i> marcadas com digoxigenina.....	52
Reação de hibridização	52
Reação de pós-hibridização e detecção imunológica.....	53
RESULTADOS.....	53
Obtenção dos embriões somáticos	53
Clonagem da provável sequência codificadora de <i>SERK</i> em <i>B. orellana</i>	54
Análises dos homólogos de <i>SERK</i> através das sequências de nucleotídeos	55
Análise da sequência de aminoácidos da proteína <i>SERK</i> de <i>B. orellana</i>	57
Análise Filogenética.....	59
Caracterização do padrão de expressão de <i>SERK</i> por hibridização in situ	61
DISCUSSÃO	63
Auxina, estresse e embriogênese somática em <i>B. orellana</i>	63
Expressão de genes <i>SERK</i> durante a embriogênese somática.....	65
Comparação entre BoSERK-like e <i>SERK</i> de outras espécies	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CONCLUSÕES GERAIS	78

RESUMO

MATOS, Elyabe Monteiro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2013. **Caracterização morfoanatômica, histoquímica e expressão de genes *SERK* durante a embriogênese somática em *Bixa orellana* L. (Bixaceae)** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadoras: Andréa Dias Koehler e Luzimar Campos da Silva.

O objetivo do presente estudo foi analisar o processo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos de *Bixa orellana* L. (Bixaceae) sob aspectos morfoanatômicos e histoquímicos, além de análises moleculares da expressão de genes *SERK*. Embriões zigóticos imaturos foram colocados em meio MS suplementado com 2,26 μ M de 2,4-D, 4,52 μ M de cinetina e 0,1 % de carvão ativado. O início da embriogênese somática foi observado após 10 dias no meio de indução, com divisões celulares alterando o eixo embrionário e os cotilédones. Após 20 dias, foram notados embriões somáticos em estágio globulares iniciais, originados da protoderme dos embriões zigóticos, limitados por cordões de compostos fenólicos na camada abaixo da protoderme. Aos 52 dias do início da indução embriogênica, embriões somáticos em estádios iniciais, tardios e secundários foram observados. Análises histoquímicas demonstraram a mobilização de reservas durante o processo. Foram observados carboidratos totais no embrião zigótico durante o início do processo embriogênico, porém, compostos lipídicos não foram notados nessa fase. Corpos proteicos estavam presentes no embrião zigótico após 15 dias de indução. Análises moleculares durante a embriogênese somática levaram à clonagem e identificação de três possíveis membros da família *SERK* (*BoSERK1*, *BoSERK2* e *BoSERK3*). Análises filogenéticas das proteínas indicaram que o agrupamento dos diferentes membros *SERK* ocorre de acordo com a função desempenhada na planta. Experimentos de hibridização *in situ* comprovaram a expressão de *SERK* em células do tecido vascular e da epiderme nos embriões zigóticos imaturos. Sinal de intensidade variável foi observado nos embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento, desde globulares a cotiledonares. Os resultados do presente trabalho esclarecem os processos morfoanatômicos da embriogênese somática em *B. orellana* e contribuem com o primeiro registro da expressão de genes *SERK* para a espécie, subsidiando futuros estudos de expressão com mutantes.

ABSTRACT

MATOS, Elyabe Monteiro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2013. **Morphoanatomical and histochemical characterization, and expression of the *SERK* genes during somatic embryogenesis in *Bixa orellana* L. (Bixaceae).** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Andréa Dias Koehler and Luzimar Campos da Silva.

This study aimed to analyze the process of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Bixa orellana* L. (Bixaceae) by means of morphoanatomical and histochemical aspects of regeneration, as well as molecular analysis of *SERK* gene expression. The embryos were placed onto MS-based induction medium supplemented with 2.26 μ M 2,4-D, 4.52 μ M kinetin and 0.1 % activated charcoal. The initiation of somatic embryogenesis was observed as early as 10 days in the induction medium, with cell divisions altering the embryonic axis and the cotyledons. After 20 days, somatic embryos at early globular stage were visualized, originating from the protodermis of zygotic embryos, bound by a sheath-like of phenolic compounds in the subepidermal layer. After 52 days of onset of embryo induction, somatic embryos at early and late stages, as well as secondary somatic embryos were observed. Histochemical analyses demonstrated the mobilization of reserves during the process. Total carbohydrates were observed in zygotic embryo during early embryogenic process, but lipid compounds were not perceived at that stage. Protein bodies were present in the zygotic embryo after 15 days of induction. Molecular analysis during somatic embryogenesis led to the cloning and identification of three possible *SERK* family members (*BoSERK1*, *BoSERK2*, and *BoSERK3*). Phylogenetic analysis of the proteins indicated that the different members of the *SERK* group occur according to the function performed in the plant. In situ hybridization experiments confirmed the expression of *SERK* in cells of vascular tissues and in the epidermis of immature annatto zygotic embryos. Signals of variable intensity were observed in somatic embryos at different stages of development, from globular to cotyledonary. The results of this work clarify morphoanatomic aspects of somatic embryogenesis in *B. orellana* and contribute as the first record on the cloning and expression of *SERK* genes for the species, supporting future expression studies with mutants.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Bixaceae apresenta o gênero *Bixa* L. como único descrito, com duas espécies originárias da América tropical, dentre elas *Bixa orellana* L. Encontram-se na literatura os nomes botânicos para esta espécie *Bixa acuminata* Boj., *Bixa americana* Poir., *Bixa odorata* Ruiz & Pav., *Bixa platycarpa* Ruiz e Pav., *Bixa tinctoria* Salisb., *Bixa urucurana* Willd. A espécie pertence ao core Eudicotiledonea, Malvids, ordem Malvales (APG III, 2009).

É uma planta arbustiva, perenifólia, com copa ampla e ramificada e altura média de 6 m. As folhas são simples, alternas, pecioladas, glabras, com limbo ligeiramente ovado e margem inteira e minúsculos pontos coloridos por todo o limbo, referentes à bixina presente no órgão.

As inflorescências são compostas de flores brancas, levemente rosadas ou róseas, reunidas em panículas terminais nas extremidades dos ramos. Os frutos são cápsulas ovóides (cachopas), globosas deiscentes e de coloração marrom-avermelhada que encerram cerca de 50 sementes pequenas envolvidas por uma polpa macia e avermelhada. As cápsulas apresentam coloração castanho-avermelhada até o amarelo-pálido, passando pelo verde e são envolvidas por numerosos espinhos flexíveis, os quais realçam a beleza dos frutos (Franco et al., 1990).

As sementes de *Bixa orellana* L. são cobertas pelo arilo, o qual contém substâncias vermelho-alaranjadas ricas em carotenoides como a bixina e norbixina, sendo a bixina a de maior relevância, representando mais de 80 % dos carotenoides totais. Esses compostos, presentes nas sementes possuem aplicação como alimento funcional e destacam-se, entre outras razões, pelas suas propriedades antioxidantes (Kiokia & Gordon, 2003; Giorgi et al., 2013), pelo potencial hipoglicêmico e terapêutico (Russel et al., 2005; 2008) e por modular o balanço de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo diabetes (Rossoni-Júnior et al., 2012). Além dessas atividades, Takahashi et al. (2009) observaram que a bixina regula o metabolismo de lipídeos, aumentando a sensibilidade de insulina em células do tecido adiposo. Ferreira et al. (2013) notaram que extratos aquosos das sementes de urucum foram eficazes no tratamento contra hiperlipidemia, uma disfunção que causa acúmulo de colesterol no sangue. Outra função atribuída ao corante presente nas sementes de urucum é a sua

utilização como repelente, uma proteção para a pele contra o mosquito da dengue (Giorgi et al., 2013). Em adição, as sementes de urucum apresentam ainda compostos precursores da vitamina E, os tocotrienóis que trazem diversos benefícios, tais como: redução do colesterol, atividade anticâncer (mama, fígado e pele), benefícios aos sistemas cardiovascular e nervoso, atividade antioxidante, anti-inflamatória e diabetes (GeroNova Research, Inc., 2013).

No Brasil, a espécie é nativa das florestas Amazônica e Atlântica, sendo estas florestas o seu centro de distribuição. É conhecida popularmente como urucu, urucum, urucuzeiro, açafroa e açafroeira-da-terra (Marchiori, 2000; Silva & Franco, 2000). Em regiões do mundo pode ter diversos nomes: Atolé, Achioté, Bija, no Peru e em Cuba; Axiote, no México; Achioté, Achote, Anatto, Bija, em Santo Domingo e Porto Rico; Bixa, na Guiana; Orleans Laum, na Alemanha; Roucou, Rocouyer, na França; Analto, em Honduras; Guajachote, em El Salvador; Onotto e Onotillo, na Venezuela; Achioté e Urucu, na Bolívia; Annatto e Annatto-Tree, na Inglaterra; Urucu, na Argentina, entre outros (Franco et al., 2002).

De acordo com Silva (2008), o Brasil é o país que tem uma das maiores produções de urucum no mundo, porém muito deficiente na qualidade do produto. Para avaliar a qualidade da semente do urucum são considerados alguns aspectos como a quantidade de impurezas, teor de umidade do grão, além do teor de bixina.

Grande parte do plantio é feito nas regiões Norte e Nordeste, onde o teor de bixina nas sementes é mais alto devido à alta irradiação solar e umidade local. Porém, atualmente, merece destaque também, a produção no Sudeste, principalmente São Paulo e Minas Gerais devido às questões de mercado: aumento de demanda da indústria, necessidade de fornecimento contínuo e, sobretudo, logística (Silva, 2008).

A aplicação das ferramentas de engenharia genética, com destaque para a transformação de células e posterior regeneração in vitro de plantas, se aliada a técnicas do melhoramento convencional, têm grande potencial de contribuir para o sucesso dos programas de melhoramento, visto que a obtenção de transgênicos surge como alternativa para produzir tipos cultivados superiores, além de reduzir o tempo para a obtenção de variedades melhoradas (Ferreira et al., 1998) e também sucesso nos sistemas de aclimatização após a regeneração in vitro (Parimalan et al., 2011a).

O urucuzeiro é uma planta bastante conhecida por sintetizar o pigmento bixina (Mercadante & Pfander, 1998). Contudo, esse carotenoide é encontrado não só em *B. orellana*, mas também em *Crocus* e *Vitis* (Ramamoorthy et al., 2010), e também na

planta conhecida como “planta insulina”, *Costus pictus* (Annadurai et al., 2012). Segundo Franco et al. (2002), os carotenoides presentes nas sementes de urucum constituem um importante corante utilizado na produção do colorau, um produto empregado desde a antiguidade em rituais indígenas, na pintura e proteção da pele e na culinária de diferentes regiões brasileiras.

Do urucum é fabricada a maior parte dos corantes naturais utilizados na produção de alimentos, correspondendo a 70 % dos corantes naturais empregados em alimentos, como salsichas, massas, queijos, sorvetes, iogurtes, recheios de biscoitos, bebidas lácteas, sucos de frutas, colorífico e muitas outras (Franco et al., 2002). Além dessas aplicações principais, a espécie vegetal tem conquistado uma posição de destaque na indústria farmacêutica (Takahashi et al., 2006).

Segundo Collins & Hughes (1991), os pigmentos extraídos das sementes de *B. orellana* estão entre os produtos corantes naturais permitidos para o consumo humano, e ocupam a primeira colocação dentre os corantes aditivos naturais mais utilizados pela indústria, seguidos pelo carmim de cochonilha e cúrcuma (Lauro, 1991; Mercadante & Pfander, 1998).

Parimalan et al. (2007) descreveram novas possibilidades da utilização de algumas partes dos frutos do urucum que usualmente são descartadas durante a produção do corante, e que podem gerar uma nova fonte de renda. O pericarpo do fruto do urucum foi utilizado como uma nova fonte de combustível, e pode ser aplicado como uma estratégia energética suplementar nos países em desenvolvimento, não exigindo área de cultivo complementar, além daquela já existente para a produção do corante.

Devido à reprodução ser predominantemente por polinização cruzada e a propagação realizada principalmente por sementes, os cultivos de urucum apresentam alta variabilidade genética, especialmente relacionada com o número de sementes por cápsula e com a cor e o teor de pigmentos contidos nos tegumentos das sementes (Franco et al., 2002; Carvalho et al., 2005; Valdez-Ojeda et al., 2008). Esse grau de variabilidade genética nas progênies acarreta em grande desigualdade das plantas (São José & Rebouças, 1990; Rivera-Madrid et al., 2006) e influencia no teor de bixina, tolerância a pragas e doenças (Rebouças & São José, 1996).

Para contornar essa situação, diversos trabalhos de regeneração *in vitro* têm sido propostos: estudos com gemas axilares e segmentos nodais (D’Souza & Sharon, 2001; Paiva Neto et al., 2003a; Joseph et al., 2011), sementes (Sha Valli Khan et al., 2002), segmentos de hipocótilos de plantas germinadas *in vitro* (Paiva Neto et al., 2003a;

Carvalho et al., 2005), segmentos de raízes de plantas germinadas in vitro (Mahendranath et al., 2012), segmentos caulinares adultos e explantes nodais adultos (Parimalan et al., 2011a; Siril & Joseph, 2013), além de estudos com embriões somáticos (Paiva Neto et al., 2003b; Parimalan et al., 2011b).

A embriogênese somática é um caso característico de morfogênese, onde a partir de tecidos do explante (modelo direto) ou do calo (modelo indireto), formam-se estruturas semelhantes aos embriões zigóticos (Guerra & Handro, 1988; Guerra et al., 1998; Rose et al., 2010), sendo uma característica única de plantas (Zimmerman, 1993; Jiménez & Clément, 2006). É uma técnica alternativa para a propagação clonal de plantas, além de ser uma excelente ferramenta para estudos básicos e análise dos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante a embriogênese vegetal (Santos et al., 2005; Cangahuala-Inocente et al., 2004; Rocha & Dornelas, 2013).

Estudos anatômicos que caracterizem a competência embriogênica dos tecidos e a histodiferenciação em embriões somáticos podem fornecer informações necessárias à compreensão do processo de embriogênese nas plantas (Canhoto et al., 1996; Puigderrajols et al., 2000; Corredoira et al., 2006; Moura et al., 2008). Somado a esse conhecimento, análises histoquímicas ajudam a entender a mobilização de reservas e demandas energéticas dos embriões somáticos em formação (Cangahuala-Inocente et al., 2004; 2009; Moura et al., 2010; Rocha et al., 2012).

Para complementar, genes marcadores do início da indução da embriogênese somática podem fornecer informações importantes sobre o perfil molecular das plantas investigadas durante essa fase do desenvolvimento, sendo os genes da família *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) bastante promissores nesses estudos.

O gene *SERK* codifica um receptor de proteína quinase do tipo LRR (*Leucine Rich Repeat*). As proteínas com domínio LRR estão envolvidas na transdução de sinais e acredita-se que medeiam as interações proteína-proteína (Shiu & Bleecker, 2001).

Esse gene foi descrito, inicialmente, em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cenoura (*Daucus carota*) como um componente da via de transdução de sinais e dirige as embriogêneses somática e zigótica (Schmidt et al., 1997). A expressão transiente foi observada nas fases iniciais do embrião, marcando células com características embriogênicas, até o estágio globular de desenvolvimento do embrião.

Após o estudo em cenoura foi observada a expressão de genes *SERK* em embriões somáticos de *Dactylis glomerata* no início da embriogênese até o estágio globular (Somleva et al., 2000) e também em *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001).

Desde então, estudos de expressão de genes da família *SERK* vêm sendo desenvolvidos com diversas espécies como *Zea mays* (Baudino et al., 2001), *Medicago truncatula* (Nolan, et al., 2003, 2009, 2011), *Citrus unshiu* (Shimada et al., 2005), *Theobroma cacao* (Santos et al., 2005), *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al., 2008), *Panax ginseng* (Kiselev & Tchernoded, 2009), *Araucaria angustifolia* (Steiner et al., 2012), *Prunus incisa* (Thunb.) (Ben Mahmoud et al., 2013), dentre outras diversas. Esses estudos demonstram uma grande possibilidade de uso desse gene como marcador de embriogênese somática.

Considerando todos os aspectos apresentados anteriormente, desde os caracteres morfoanatômicos até a regulação gênica/molecular, nota-se a necessidade de um maior aprofundamento no conhecimento a respeito do processo de embriogênese somática em *B. orellana*. Assim, pretende-se compreender como os fatores que atuam diretamente e indiretamente nesse evento morfogênico permitem a formação de um novo organismo. Para tanto, objetiva-se nesse trabalho, caracterizar os eventos anatômicos, morfológicos e histoquímicos ligados à indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos de *B. orellana*, além de clonar e caracterizar os genes *SERK* expressos durante o período de indução e analisar sua possível função na marcação de células com competência embriogênica via hibridização *in situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNADURAI, R.S.; JAYAKUMAR, V.; MUGASIMANGALAM, R.C.; KATTA, M.A.V.S.K.; ANAND, S.; GOPINATHAN, S.; SARMA, S.P.; FERNANDES, S.J.; MULLAPUDI, N.; MURUGESAN, S.; RAO, S.N. Next generation sequencing and de novo transcriptome analysis of *Costus pictus* D. Don, a non-model plant with potent anti-diabetic properties. **BMC Genomics**, 13:663, 2012.

APG III. An update of the Angiosperm group Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 161:105-121, 2009.

BAUDINO, S.; HANSEN, S.; BRETTSCHEID, R.; HECHT, V.F.G.; DRESSELHAUS, T.; LORZ, H.; DUMAS, C.; ROGOWSKY, P.M. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. **Planta**, 213:1-10, 2001.

BEN MAHMOUD, K.; DELPORT, F.; MUHOVSKI, Y.; ELLOUMI, N.; JEMMALI, A.; DRUART, P. Expression of *PiABP19*, *Picdc2* and *PiSERK3* during induction of somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). **Molecular Biology Reports**, 40:1569-1577, 2013.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, 224:33-40, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; MALDONADO, S.B.; GUERRA, M.P. Patterns of protein and carbohydrates accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44:217-224, 2009.

CANHOTO, J.M.; MESQUITA, J.F.; CRUZ, G.S. Ultrastructural changes in cotyledons of *Pineapple guava* (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, 78:513-521, 1996.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, 29:887-895, 2005.

CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A.M. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, 42:525-533, 2006.

COLLINS, P.; HUGHES, S. Natural colours – a question of stability. In: COLLINS, G.B.; SHEPHERD, R.H., (Eds.). **Prospectives in natural food symposium**. London: Overseal Food Ltd, p. 1-10, 1991.

D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37:168-172, 2001.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa -SPI, p. 21-43, 1998.

FERREIRA, J.M.; SOUSA, D.F.; DANTAS, M.B.; FONSECA, S.G.C.; MENEZES, D.B.; MARTINS, A.M.C.; QUEIROZ, M.G.R. Effects of *Bixa orellana* L. seeds on hyperlipidemia. **Phytoterapy Research**, 27:144-147, 2013.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.B.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. Etnobotânica e taxonomia do urucuzeiro. In: **A cultura do urucum no Brasil**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista - BA, Brasil. 1ª ed. 109 p., 1990.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p. 2002.

FRANCO, C.F.O. **Mercado de urucum (*Bixa orellana* L.) no Brasil**. EMEPA – Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A. Governo do Estado da Paraíba. 2003. Disponível em <http://www.emepa.org.br/urucum_mercado.php>. Acesso em 26 jun. 2012.

GERONOVA RESEARCH, INC. **Annatto tocotrienol: The vitamin E family contains four tocotrienols and four tocopherols**. Disponível em: <<http://www.geronova.com/content/annatto-tocotrienol>>. Acesso em 05 mai. 2013.

GIORGI, A.; MARINIS, P.; GRANELLI, G.; CHIESA, L.M.; PANSERI, S. Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon Region. **Journal of Chemistry**. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/409826>, 2013.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, 7:550-552, 1988.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa -SPI, Vol. 2:533-568, 1998.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127:803-816, 2001.

JIMÉNEZ, V.M.; CLÉMENT, T. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Monographs** (2), Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Published online, 2006.

JOSEPH, N.; SIRIL, E.A.; NAIR, G.M. An efficient in vitro propagation methodology for Annatto (*Bixa orellana* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 17:263-270, 2011.

KIOKIA, S.; GORDON, M. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 83:523-529, 2003.

KISELEV, K.V.; TCHERNODED, G.K. Somatic embryogenesis in the *Panax ginseng* cell culture induced by the *rolC* Oncogene is associated with increased expression of *WUS* and *SERK* genes. **Russian Journal of Genetics**, 45:445-452, 2009.

LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, 36:949-953, 1991.

- MAHENDRANATH, G.; VENUGOPALAN, A.; PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Annatto pigment production in root cultures of Achiote (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106:517-522, 2012.
- MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas: das bixáceas às rosáceas**. Santa Maria: Editora UFSM, 240 p., 2000.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry**, 2:79-91, 1998.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 95:175-184, 2008.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, 67:399-407, 2010.
- NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, 133:218-230, 2003.
- NOLAN, K.E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R.J. Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, 60:1759-1771, 2009.
- NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Characterisation of the legume *SERK-NIK* gene superfamily including splice variants: Implications for development and defence. **BioMed Central Plant Biology**, 11:44, 2011.
- PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:159-167, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 39:629-634, 2003b.

PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G.A. Annatto fruit pericarp: Newer source as a potential fuel. **Energy & Fuels**, 21:1181-1182, 2007.

PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G.A. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105:285-290, 2011a.

PARIMALAN, R.; VENUGOPALAN, A.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Bixa orellana* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105:317-328, 2011b.

PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZUNIGA-AGUILAR, J.J.; ORPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of this expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, 28:11-19, 2008.

PUIGDERRAJOLS, P.; CELESTINO, C.; SUILS, M.; TORIBIO, M.; MOLINAS, M. Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. **International Journal of Plant Sciences**, 161:353-362, 2000.

RAMAMMOORTHY, S.; DOSSA, F.P.; KUNDU, K.L.; SATYANARAYANA, V.S.V.; KUMAR, V. Molecular characterization of bixin - An important industrial product. **Industrial Crops and Products**, 32:48-53, 2010.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA, DFZ/UESB/SBCN, p. 42, 1996.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-G.M., R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies towards genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, 106:165-172, 2006.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.; da SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, 249:747-758, 2012.

ROCHA, D.I.; DORNELAS, M.C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews**, 8:1-17, 2013.

ROSE, R.J.; MANTIRI, F.R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S.-K.; WANG, X.-D.; NOLAN, K.E.; SHEAHAN, M.B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: PUA, E.-C.; DAVEY, M.R. (eds.) **Plant developmental biology-biotechnological perspectives**, vol 2. Springer, Heidelberg, pp 3-26, 2010.

ROSSONI-JÚNIOR, J.V.; ARAÚJO, G.R.; PÁDUA, B.C.; CHAVES, M.M.; PEDROSA, M.L.; SILVA, M.E.; COSTA, D.C. Annato extract and β -carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 50:177-183, 2012.

RUSSELL, K.R.; MORRISON, E.Y.; RAGOOBIRSINGH, D. The effect of annatto on insulin binding properties in the dog. **Phytotherapy Research**, 19:433-436, 2005.

RUSSELL K.R.; OMORUYI F.O.; PASCOE K.O.; MORRISON E.Y. Hypoglycaemic activity of *Bixa orellana* extract in the dog. **Methods and Finds in Experimental and Clinical Pharmacology**, 30:301-305, 2008.

SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIAS, B.B.A.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, 168:723-729, 2005.

SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H. **A cultura do urucum no Brasil**. Vitória da Conquista – BA, UESB, p. 109, 1990.

SCHMIDT, E.D.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.; DE VRIES, S.C.A. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, 124: 2049-2062, 1997.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 38:186-190, 2002.

SHIMADA, T.; HIRABAYASHI, T.; ENDO, T.; FUJII, H.; KITA, M.; OMURA, M. Isolation and characterization of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* gene homologue (*CitSERK1*) from *Citrus unshiu* Marc. **Scientia Horticulturae**, 103:233-238, 2005.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Science's Signal Transduction Knowledge Environment**, 22, 2001.

SILVA, F.C.P.; FRANCO, C.F.O. Etnobotânica e taxonomia do urucuzeiro. In: **Urucuzeiro uma alternativa de agronegócio**. João Pessoa: EMEPA - PB, 1ª ed. 64 p., 2000.

SILVA, P.I. O mercado de urucum. In: STRINGHETA, P.C.; SILVA, P.I. (eds.) **Pigmentos de Urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações**. Viçosa, 166p. 2008.

SIRIL, N.E. JOSEPH, N. Micropropagation of annatto (*Bixa orellana* L.) from mature tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants with RAPD markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 19:147-155, 2013.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.; DE VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Reports**, 19:718-726, 2000.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; GUERRA, M.P.; CUTRI, L.; DORNELAS, M.C.; FLOH, E.I.S. A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1* (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109:41-50, 2012.

VALDEZ-OJEDA, R.; HERNÁNDEZ-STEFANONI, J.L.; AGUILAR-ESPINOSA, M.; RIVERA-MADRID, R. Assessing morphological and genetic variation in annatto

(*Bixa orellana* L.) by sequence-related amplified polymorphism and cluster analysis. **HortScience**, 43:2013-2017, 2008.

TAKAHASHI, L.S.A.; ROCHA, J.N.; SOUZA, J.R.P. de. Revisão sobre produção e tecnologia de sementes de espécies medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu. 8:198-209, 2006.

TAKAHASHI, N.; GOTO, T.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K.; KATOH, S.; KUSUDO, T.; SAKAMOTO, T.; OHYANE, C.; LEE, J. Y.; KIM, Y.; UEMURA, T.; HIRAI, S.; KAWADA, T. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR γ activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 390:1372-1376, 2009.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, 5:1141-1423, 1993.

CAPÍTULO I

MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bixa orellana* L.

RESUMO

Bixa orellana L. (urucum) é uma espécie que desperta grande interesse comercial devido à bixina, carotenoide presente no tegumento das suas sementes, utilizado como corante natural. Métodos de embriogênese somática buscam o progresso dos sistemas de propagação da espécie in vitro. Análises anatômicas são essenciais para caracterizar as alterações celulares que ocorrem no processo e ajudam a compreender os fatores que levam células somáticas a retomarem características meristemáticas e se tornarem competentes para a formação de embriões somáticos. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar anatomicamente e analisar sob aspectos histoquímicos a embriogênese somática em *B. orellana*. Embriões zigóticos imaturos foram inoculados em meio MS suplementado com 2,26 μM de 2,4-D, 4,52 μM de cinetina e 0,1 % de carvão ativado. As observações foram feitas antes da inoculação no meio de indução (tempo zero), aos 10, 15, 20, 25, 30, 32 e 52 dias de indução. Foram observadas protuberâncias no eixo embrionário e nos cotilédones do embrião zigótico após 10 dias de indução. Embriões somáticos em estágio inicial de desenvolvimento foram notados aos 20 dias no meio de indução. Aos 30 e 32 dias, estavam presentes embriões em diversos estádios, como globular, cordiforme e torpedo. Aos 52 dias de indução, foi observada embriogênese somática secundária. A mobilização de reservas durante a embriogênese somática foi estudada. Polissacarídeos estavam presentes no embrião zigótico no tempo zero e sua diminuição foi notada no decorrer do processo. Compostos lipídicos foram observados apenas aos 20 dias de indução e corpos proteicos foram evidenciados após 15 dias de indução e continuaram sendo observados até 52 dias de cultivo. Os resultados do presente estudo contribuem ao melhor entendimento das alterações morfoanatômicas e histoquímicas ocorridas durante o processo de embriogênese somática em *B. orellana*, as quais ainda não haviam sido descritas para a espécie até o momento.

Palavras-chave: urucum, embriogênese somática, mobilização de reservas, morfoanatomia.

MORPHOANATOMY AND HISTOCHEMISTRY OF SOMATIC EMBRYOS OF *Bixa orellana* L.

ABSTRACT

Bixa orellana L. (annatto) is a species that motivates a great commercial interest because the bixin, a carotenoid that is present in the tegument of its seeds, is considered a remarkable natural dye. Somatic embryogenesis methods aim to improve in vitro propagation systems of the species. Anatomical analyses are essential to characterize the cellular alterations that occur in the process and help us to better understand the factors that lead somatic cells to resume meristematic characteristics and acquire competence to form somatic embryos. Accordingly, this study aimed to characterize and analyze anatomically under histochemical aspects somatic embryogenesis in *B. orellana*. Immature zygotic embryos were inoculated in MS medium supplemented with 2.26 mM of 2,4-D, 4.52 mM kinetin and 0.1 % activated charcoal. The observations were made before the inoculation induction medium (time zero) at 10, 15, 20, 25, 30, 32 and 52 d of induction. Protuberances in the embryonic axis and cotyledons in the zygotic embryos were observed as early as 10 d after induction. Somatic embryos in early stage of development were noted at 20 d in induction medium. At 30 and 32 d embryos were present embryos at various development stages, such as globular, heart and torpedo. At 52 d of induction secondary somatic embryogenesis was observed. The mobilization of reserves during somatic embryogenesis was assayed. Polysaccharides were present in the zygotic embryo at time zero and its decrease was noticed during the process. Lipid reserves were present just at 20 d and protein bodies were observed after 15 d of induction and continued being observed up to 52 d of cultivation. The results here contribute to the understanding of how somatic embryogenesis in *B. orellana* triggers morphoanatomic and histochemical alterations, which had not been previously described for the species.

Keywords: annatto, somatic embryogenesis, morphoanatomy, reserves mobilization

INTRODUÇÃO

A espécie *Bixa orellana* L., conhecida nacionalmente como urucum, é uma das fontes mais utilizadas para obtenção de corantes naturais, sendo que os pigmentos extraídos das suas sementes estão entre os produtos corantes naturais empregados para o consumo humano, e ocupam a primeira colocação dentre os corantes aditivos naturais mais utilizados pela indústria, seguidos pelo carmim de cochonilha e cúrcuma (Lauro, 1991; Mercadante & Pfander, 1998).

Devido à reprodução de *B. orellana* ser predominantemente por polinização cruzada, o grau de variabilidade genética nas progênies acarreta em grande desigualdade das plantas (São José & Rebouças, 1990; Rivera-Madrid et al., 2006) e influencia no teor de bixina, tolerância a pragas e doenças (Rebouças & São José, 1996). Em vista desse cenário, a utilização da biotecnologia associada aos conhecimentos adquiridos com as práticas de cultivos atuais permitirá que os programas de melhoramento sejam direcionados no sentido de identificar e eleger os cruzamentos mais promissores que resultem em tipos cultivados de melhor desempenho em produtividade (Franco et al., 2002; 2003; Valdez-Ojeda et al., 2008).

A embriogênese somática é um caso característico da morfogênese in vitro, o qual a partir de tecidos do explante (modelo direto) ou do calo (modelo indireto), formam-se estruturas semelhantes aos embriões zigóticos, via sinalização externa (Guerra & Handro, 1988; Zimmerman, 1993; Jiménez, 2001; Jiménez & Clément, 2006; Rose et al., 2010). Trata-se de uma técnica alternativa com potencial aplicação na propagação clonal de plantas, além de ser excelente ferramenta para estudos básicos e análise dos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante a embriogênese vegetal (Santos et al., 2005; Cangahuala-Inocente et al., 2009; Steiner et al., 2012; Rocha & Dornelas, 2013). Portanto, é necessário o entendimento mais amplo possível dos mecanismos básicos da embriogênese somática, os quais permitem que células somáticas determinadas geneticamente alterem o seu destino e retornem a uma condição indiferenciada, competentes para formação de embriões (Fehér et al., 2003; Fehér, 2005; Verdeil et al., 2007; Pandey et al., 2012).

Estudos anatômicos que caracterizem a competência embriogênica e a histodiferenciação em embriões somáticos podem fornecer subsídios para a compreensão mais detalhada do processo de embriogênese nas plantas (Canhoto et al.,

1996; Puigderrajols et al., 2000; Corredoira et al., 2006; Moura et al., 2008; Rocha et al., 2012). Alterações morfoanatômicas nos embriões nucelares de laranja ‘Valência’ foram analisadas e as observações forneceram informações que podem ser utilizadas para aprimorar o processo de embriogênese somática para a espécie, do ponto de vista morfológico, uma vez que foi estudado o comportamento dos tecidos durante a indução de embriogênese somática (Mendes-da-Glória et al., 2001). Somado a esse conhecimento, análises histoquímicas ajudam a entender a mobilização de reservas e demandas energéticas dos embriões somáticos em formação (Cangahuala-Inocente et al., 2004; 2009; Moura et al., 2010; Rocha et al., 2012).

Em *B. orellana*, muitos estudos foram realizados visando à otimização da morfogênese in vitro: estudos com gemas axilares e segmentos nodais (D’Souza & Sharon, 2001; Paiva Neto et al., 2003a; Joseph et al., 2011), segmentos de hipocótilos de plantas germinadas in vitro (Paiva Neto et al., 2003a; Carvalho et al., 2005), segmentos de raízes de plantas germinadas in vitro (Mahendranath et al., 2012), segmentos caulinares adultos e explantes nodais adultos (Parimalan et al., 2011a; Siril & Joseph, 2013) e também obtenção de embriões somáticos (Paiva Neto et al., 2003b; Parimalan et al., 2011b). Entretanto, não há relatos acerca do estudo das alterações morfoanatômicas, ultraestruturais e histoquímicas que ocorrem durante a indução de embriogênese somática na espécie.

O presente trabalho visa descrever as alterações anatômicas que ocorrem nos embriões zigóticos imaturos em meio de indução de embriogênese somática e fornecer detalhes da sua morfologia, além de analisar a mobilização de reservas durante a indução de embriogênese somática em *B. orellana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal para indução de embriogênese somática

Como fonte de material vegetal foi utilizada uma planta híbrida de *Bixa orellana* L. (Bixaceae) (genótipo ‘M2’) proveniente do cruzamento artificial entre ‘Fruto Verde Piloso’ X ‘Fruto Vermelho Liso’. Esta planta faz parte de uma coleção de matrizes denominadas de ‘M1’ a ‘M10’ do mesmo cruzamento (Pinheiro & Almeida, 1992), sendo cultivada há cerca de 20 anos no Horto da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG.

Frutos imaturos com aproximadamente 70 dias após a antese foram coletados e levados ao laboratório de Cultura de Tecidos (Bioagro, UFV). Para desinfestação, as sementes foram retiradas das cachopas sobre a bancada, colocadas em tubos plásticos de 50 mL e foram incubadas com etanol 70 % durante 10 minutos em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. Logo em seguida, o etanol foi retirado dos tubos e adicionado hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) 50 % durante 15 minutos, sendo os tubos agitados, manualmente, a cada 5 minutos. As sementes foram enxaguadas com água estéril por cinco vezes e colocadas em papel absorvente. Com o auxílio de uma pinça e um bisturi, os embriões imaturos foram retirados das sementes e cultivados em meio contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), complexo de vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 3 % (p/v) sacarose, 0,01 % (p/v) mio-inositol, 4,52 μ M cinetina, 2,26 μ M ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,1 % (p/v) carvão ativado e gelificado com 0,28 % (p/v) Phytigel[®] (Sigma-Aldrich, USA). O meio teve o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e depois foi esterilizado em autoclave. Aliquotas de 10 - 15 mL foram dispensadas em placas de Petri (60 x 15 mm, J. Prolab, Brasil), as quais foram vedadas com filme PVC (Goodyear, Brasil) após a inoculação de dez embriões zigóticos por placa. As culturas foram mantidas em sala de cultivo a 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h com irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de duas lâmpadas tubulares fluorescentes (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram, Brasil). O meio de cultivo foi preparado de acordo com o proposto por Paiva Neto et al. (2003b).

Caracterização estrutural e histoquímica dos embriões zigóticos e somáticos de *B. orellana*

Microscopia de luz e caracterização histoquímica

Todo o processo de avaliação de respostas morfogênicas foi acompanhado de análises histológicas e ultraestruturais para demonstrar as alterações durante o processo de embriogênese. Para tanto, embriões zigóticos de *B. orellana*, 'M2' nos tempos 0, 10, 15, 20, 25, 30, 32 e 52 após indução foram coletados e utilizados para o preparo das lâminas. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965, modificado) por 24 horas, tratadas com glicina 0,15 M por 12 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin[®], Leica). Secções transversais e longitudinais com 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de toluidina (pH 3,2) para caracterização estrutural (O'Brien & McCully, 1981).

Cortes histológicos foram também submetidos aos testes histoquímicos xylidine Pounceau para detecção de proteínas totais (Vidal, 1977), ácido periódico – reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos totais (Feder & O'Brien, 1968) e sudan black (Pearse, 1980), para detecção de lipídeos.

As lâminas foram montadas em água e as imagens, capturadas em microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insight Colour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic 4.8. Secções coradas com vermelho neutro foram examinadas no mesmo equipamento, utilizando o sistema de epifluorescência com filtro UV (WU: 340-380 nm), espelho dicróico (400 nm) e filtro de barreira (420 nm).

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras fixadas foram desidratadas em série crescente de acetona, secas ao ponto crítico utilizando o equipamento modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, (Alemanha) e cobertas com ouro (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). As análises foram feitas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (LEO 435-VP, Cambridge, Inglaterra) no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ/USP) localizado em Piracicaba, SP e no Núcleo de

Microscopia e Microanálise (NMM) na Universidade Federal de Viçosa. As imagens foram processadas digitalmente.

RESULTADOS

Análise morfológica de embriões zigóticos e somáticos

Não foram observadas alterações morfológicas nos explantes durante a primeira semana no meio de indução (Figura 1A, 2A). No entanto, observou-se aos dez dias de cultivo, o início do processo de embriogênese somática. Aos quinze dias de cultivo foram observadas divisões celulares em diferentes planos, as quais promoveram alterações nos tecidos do embrião zigótico (Figuras 1B; 2B). As alterações ocorreram tanto no eixo embrionário (Figura 1B), quanto nos cotilédones (Figuras 1B; 2B), nas mesmas regiões as quais foram responsáveis pela formação dos embriões somáticos.

Aos vinte dias, os cotilédones se expandiram tornando-se delgados, com início de calogênese na superfície epidérmica do eixo embrionário, acompanhada de clorose nos cotilédones e desenvolvimento de protuberâncias as quais culminaram nos primeiros embriões somáticos (Figura 1C). Com vinte e cinco dias no meio de indução, os embriões zigóticos estavam completamente alterados, sendo possível observar intensa proliferação de embriões somáticos em estágio globular inicial (Figura 1D).

Aos trinta dias de cultivo notou-se a presença de embriões somáticos em estádios mais avançados, além dos globulares iniciais (Figura 1E), e o seu desenvolvimento prosseguiu quando observado aos trinta e dois dias (Figuras 1F; 2C e D). Nos cotilédones e no eixo dos embriões zigóticos ocorreu proliferação celular que gerou os embriões somáticos dos estádios globular a cordiforme tardio (Figuras 2C e D).

Aos cinquenta e dois dias de indução, foi possível detectar embriões somáticos em todo o cotilédone e eixo embrionário, em estádios de desenvolvimento iniciais (Figuras 1G, 2E) e mais adiantados (Figura 2F), denotando a falta de sincronia da embriogênese somática em *B. orellana* (Figuras 1G, 2F).

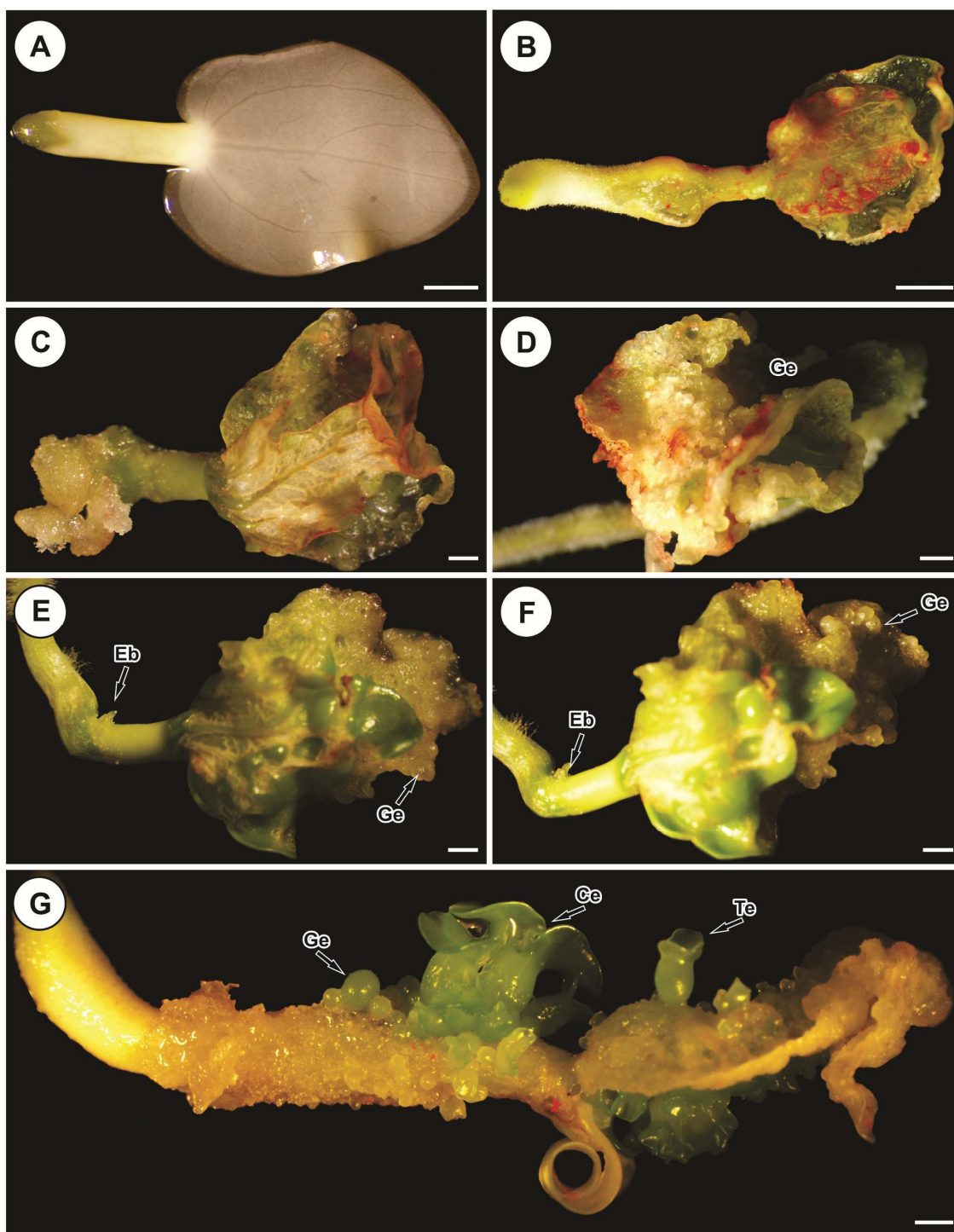


Figura 1. Aspectos morfológicos dos embriões somáticos em *Bixa orellana*. (A) embrião zigótico antes da indução (controle). (B) Alterações no eixo e cotilédones aos 15 dias. (C) Aos 20 dias proliferação celular no eixo embrionário. (D) Embriões somáticos em estágio globular aos 25 dias. (E) Embriões somáticos no eixo e nos cotilédones aos 30 dias. (F) Embrião globular aos 32 dias. (G) Embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento aos 52 dias em meio de indução de embriogênese somática. **Ce:** Embrião cotiledonar; **Eb:** Embrião; **Ge:** Embrião globular; **Te:** Embrião torpedo. Barras = 50 μ m

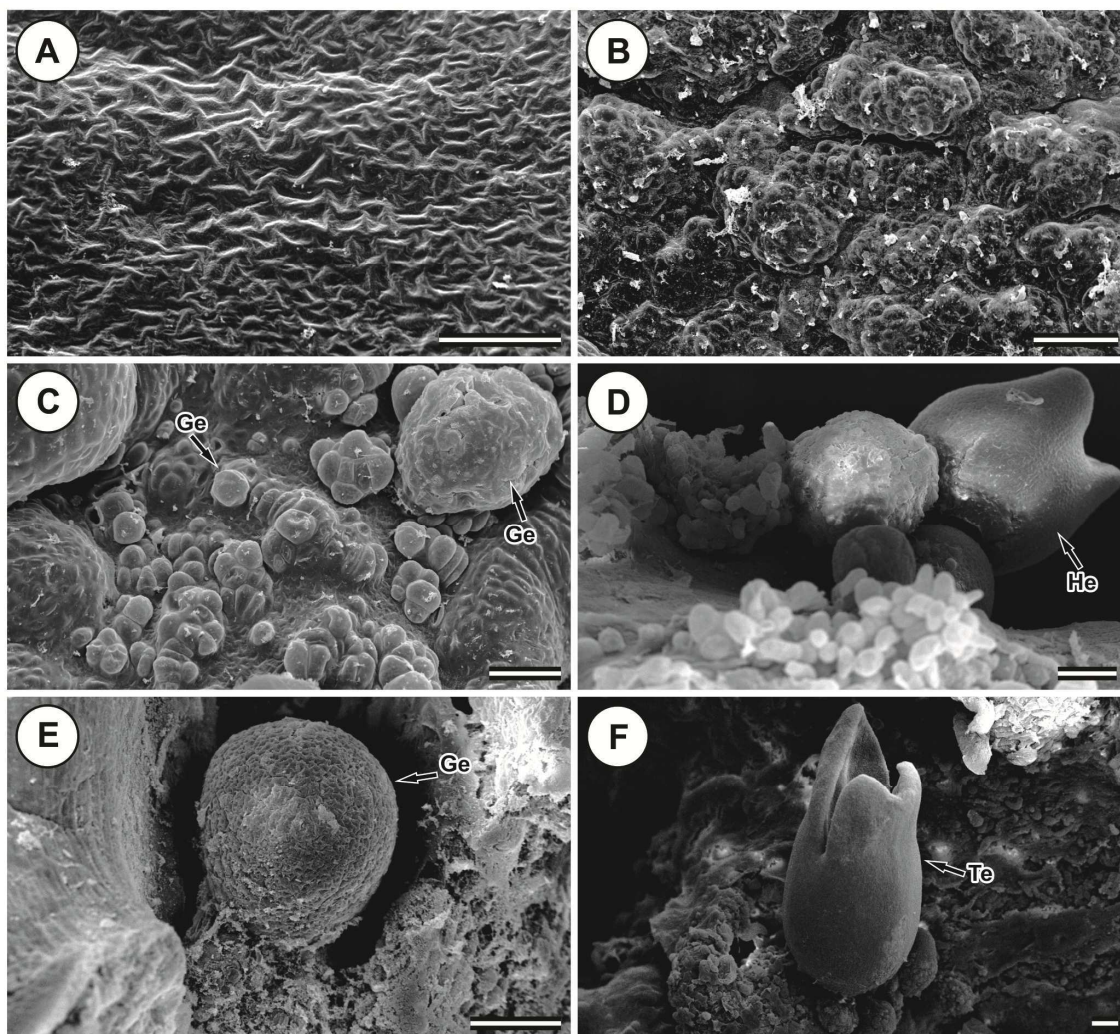


Figura 2. Embriões somáticos em cotilédones de *Bixa orellana* L. (microscopia eletrônica de varredura). (A) Superfície epidérmica da face adaxial do cotilédone no tempo 0 (controle). (B) Formação de protuberâncias na epiderme aos 15 dias de cultivo. (C) Embriões somáticos globulares aos 32 dias de indução. (D) Proliferação celular e embrião somático cordiforme após 32 dias de cultivo. (E) e (F) Embriões somáticos em estágio globular e torpedo aos 52 dias de indução. **Ge:** Embrião globular; **He:** Embrião cordiforme; **Te:** Embrião torpedo. Barras = A: 30 μ m; B e C: 50 μ m; D, E e F: 100 μ m.

Caracterização anatômica dos embriões somáticos

Embriões zigóticos imaturos (explantes) apresentam protoderme unisseriada com células isodiamétricas e meristema fundamental bem organizado (Figura 3A). Os cotilédones apresentam organização celular com arranjo uniforme e presença de cordões de procâmbio distribuídos aleatoriamente em meio ao meristema fundamental (Figura 3A).

Após dez dias de indução foi notada alteração no padrão de organização das células embriões zigóticos. Nos cotilédones, ocorreram células isodiamétricas em

constantes divisões periclinais e anticlinais no meristema fundamental, evidenciadas pela presença de compostos fenólicos, que delimitou a futura região de proliferação embriogênica (Figura 3B).

Aos quinze dias, divisões celulares em orientações aleatórias promoveram uma desorganização do meristema fundamental do cotilédone do embrião zigótico (Figura 3C). Após vinte dias de cultivo, a camada subepidérmica, demarcada com compostos fenólicos, ficou mais evidente e os primeiros pró-embriões bem desenvolvidos apresentaram protoderme definida se desenvolveram tanto na face adaxial quanto na face abaxial do cotilédone (Figura 3D).

A diferenciação continuou ocorrendo no embrião zigótico com aumento de compostos fenólicos nas células próximas à protoderme. Com vinte e cinco dias em meio de cultivo, foram observados o início da formação dos embriões somáticos e desenvolvimento do procâmbio (Figura 3E). Embriões somáticos cordiformes estavam presentes no material aos trinta dias de cultivo e apresentaram estrutura com protoderme definida (Figura 3F). No embrião zigótico, um cordão de compostos fenólicos foi evidenciado em todo o meristema fundamental e circundou a região de desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 3F).

Após trinta e dois dias de indução, os embriões somáticos em início de formação comprovaram a assincronia do evento na espécie. Células em divisões periclinais denotaram o constante desenvolvimento do embrião com a presença de suspensor (Figura 3G). Embriões globulares completamente desenvolvidos diferenciaram-se no cotilédone e o procâmbio do embrião zigótico permitiu o transporte de nutrientes, necessário para o desenvolvimento dos tecidos e embriões somáticos (Figura 3H).

Com cinquenta e dois dias de cultivo, o processo embriogênico alcançou pleno desenvolvimento sendo observados embriões globulares individualizados com protoderme com células cuboides em divisões anticlinais e embriões cordiformes (Figura 3I). Embriões somáticos primários foram observados em desenvolvimento sobre o embrião zigótico, o qual apresentou meristema fundamental completamente desorganizado e com presença de compostos fenólicos e embriões somáticos diversos (Figura 3J).

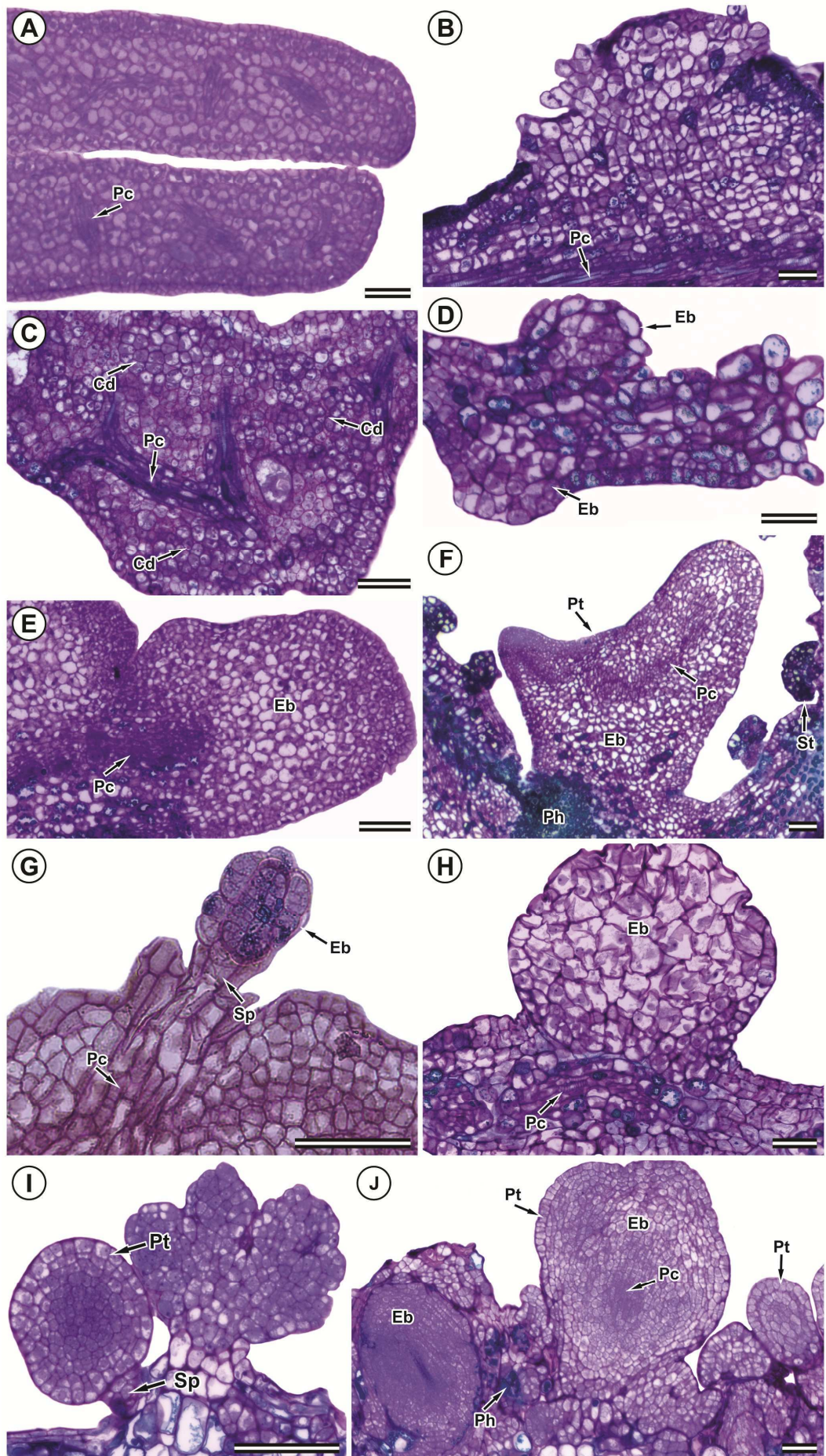


Figura 3. Descrição dos eventos anatômicos envolvidos na embriogênese somática em *Bixa orellana* L. **(A)** Cotilédones do embrião zigótico tempo 0 (controle) com procâmbio aleatoriamente distribuído. **(B)** Explante após 10 dias de indução com protuberâncias na protoderme. **(C)** Intensas divisões celulares com alterações no meristema fundamental após 15 dias de cultivo. **(D)** Embriões somáticos globulares aos 20 dias. **(E)** Desenvolvimento dos embriões somáticos com início do desenvolvimento de procâmbio, após 25 dias de cultivo. **(F)** Embrião somático desenvolvido aos 30 dias de indução, delimitado por compostos fenólicos e presença de tricomas secretores nos cotilédones do embrião zigótico. **(G e H)** Embriões somáticos globulares após 32 dias. **(I e J)** Aos 52 dias de indução presença de diversos embriões somáticos e células com compostos fenólicos. **Cd:** Divisão celular; **Eb:** Embrião somático; **Pc:** Procâmbio; **Ph:** Compostos fenólicos; **Pt:** Protoderme; **Sp:** Suspensor; **St:** Tricoma secretor. Barras = 50 µm.

Análises histoquímicas

Testes histoquímicos confirmaram a presença de compostos de reserva nas células da protoderme dos cotilédones. Embriões zigóticos em início de indução apresentaram pequeno acúmulo de polissacarídeos na epiderme (Figura 4A). Porém, não foram observados lipídeos na superfície epidérmica, presentes na cutícula (Figura 4B), e não foi detectada a presença de proteínas (Figura 4C).

Aos quinze dias de cultivo, polissacarídeos acumularam-se predominantemente nas paredes celulares acentuando a coloração nessas regiões, e também estavam armazenados dentro das células (Figura 4D). Compostos lipídicos estavam presentes apenas sobre a epiderme do embrião zigótico (Figura 4E) e corpos proteicos foram evidenciados pela reação positiva com xylidine Pounceau (Figura 4F).

Após vinte dias no meio de indução, observou-se início da mobilização das reservas de polissacarídeos (Figuras 4G) e resultado positivo para reservas lipídicas marcado pela coloração enegrecida proporcionada pelo sudan black B (Figura 4H). Resultado positivo para proteínas foi detectado nos embriões somáticos próximos às células do procâmbio (Figura 4I).

O decréscimo gradual da quantidade de polissacarídeos foi marcado pelo reagente de Schiff (Figura 4J), presente apenas na região abaixo dos embriões somáticos. A diminuição gradual também foi notada para lipídeos (Figura 4K), os quais ficaram restritos em algumas células do meristema fundamental. Corpos proteicos estavam presentes em maior quantidade no meristema fundamental, logo abaixo da protoderme (Figura 4L). Esses resultados foram observados aos trinta dias.

Aos trinta e dois dias foram observados carboidratos totais presentes nas células abaixo dos embriões somáticos (Figura 4M). Porém, não foram observados lipídeos nessa fase (Figura 4N). Entretanto, houve resultado positivo para proteínas nos cotilédones e embriões somáticos já desenvolvidos (Figura 4O).

Análises dos explantes após cinquenta e dois dias no meio de indução diagnosticaram polissacarídeos, marcados pela coloração róseo-escuro das paredes das células (Figura 4P). Não foi observada a presença de corpos lipídicos no embrião somático (Figura 4Q). Corpos proteicos estavam presentes nos cotilédones e nos embriões somáticos (Figura 4R).

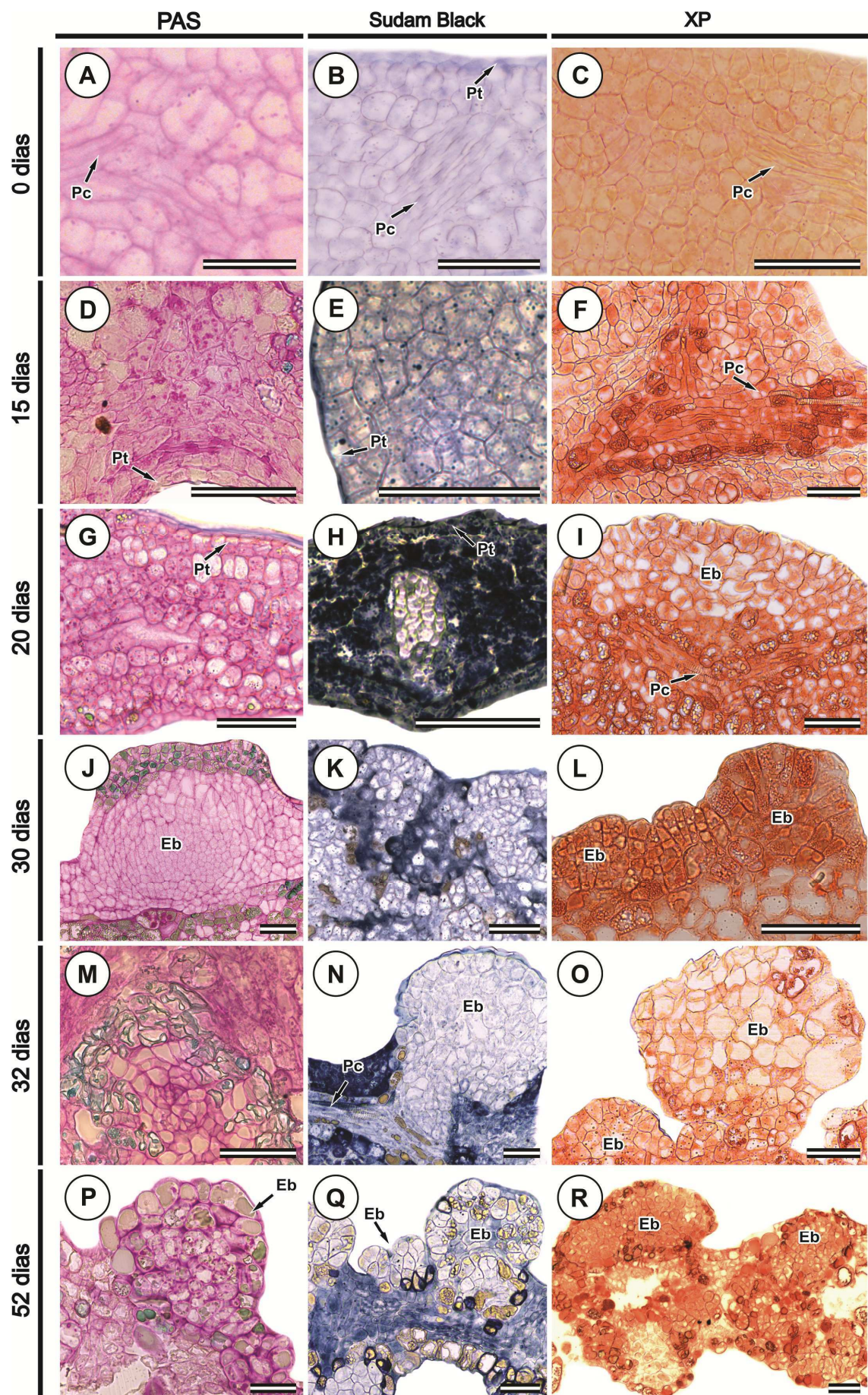


Figura 4. Estudo histoquímico da embriogênese somática em *Bixa orellana* L. (A, B, C): Secções transversais analisadas no tempo zero. (D, E, F): Análises feitas após 15 dias de cultivo. (G, H, I): Testes realizados aos 20 dias de indução. (J, K, L): Secções analisadas aos 30 dias de indução. (M, N, O): Análises feitas aos 32 dias de indução. (P, Q, R): Análises feitas após 52 dias indução de embriogênese somática testadas com reagente de Schiff (PAS), sudan black e xylydine Pounceau. (A, D, G, J, M, P) Reação para carboidratos totais; (B, E, H, K, N, Q) Reação para evidenciar corpos lipídicos; (C, F, I, L, O, R) Reação para evidenciar corpos proteicos. **Eb**: Embrião somático; **Pc**: Procâmbio; **Pt**: Protoderme. Barras = 50 µm.

DISCUSSÃO

Reguladores de crescimento e embriogênese somática

A embriogênese somática em plantas é um processo que se mostra interessante do ponto de vista da biotecnologia pelo fato de gerar embriões a partir de células somáticas em cultura, sendo uma ferramenta importante nos programas de melhoramento genético (Quiroz-Figueroa et al., 2006; Deo et al., 2010; Shafiri et al., 2012).

Os embriões somáticos desenvolvidos no presente trabalho apresentam estrutura semelhante à de embriões zigóticos, firmando assim um sistema viável de regeneração in vitro de plantas (Zimmerman, 1993; Jiménez, 2001; Quiroz-Figueroa et al., 2006). Em *Bixa orellana* foram observados embriões somáticos, via embriogênese direta, em estágio globular, torpedo, cotiledonar e estes se desenvolveram em plântulas.

Nesse trabalho, foi observado que o desenvolvimento de embriões somáticos ocorreu a partir de algumas células protodérmicas do eixo embrionário e dos cotilédones dos embriões zigóticos imaturos de *B. orellana*, corroborando com os resultados mencionados na literatura para outras espécies. Apenas algumas células ou grupos de células desenvolvem competência embriogênica, apesar de teoricamente, todas as células somáticas terem a capacidade, sob condições específicas, de desdiferenciar, retomar uma condição meristemática e gerar embriões somáticos em decorrência da totipotência (Fehér, 2005; Verdeil et al., 2007; Pandey et al., 2012).

Para o desenvolvimento de embriões somáticos em *B. orellana* foi necessária a combinação de dois reguladores de crescimento e adição de carvão ativado (Paiva Neto et al., 2003b), onde foram observados embriões somáticos diretos a partir de embriões zigóticos imaturos em meio de indução contendo 2,4-D e cinetina quando acrescido de carvão ativado. Assim sendo, adicionando os resultados alcançados no presente estudo,

pode-se afirmar que para *B. orellana*, os reguladores de crescimento aplicados no meio de cultivo podem contribuir para o surgimento dos embriões somáticos e para o seu desenvolvimento em plântulas. Possivelmente, a atuação do 2,4-D e da cinetina como moléculas sinalizadoras desencadearam uma cascata de sinal que foi reconhecida por receptores nas células que responderam se desdiferenciando e assumindo características meristemáticas.

A combinação de fatores fisiológicos foi responsável por diversas alterações dos tecidos meristemáticos e formação de embriões somáticos em *B. orellana*. Diversos fatores desencadeiam a embriogênese somática em plantas e podem estar relacionados com o genótipo, condição fisiológica, regime de cultivo, tecido/órgão (Dodeman et al., 1997; Fehér et al., 2003; Paiva Neto et al., 2003b; Zavattieri et al., 2010; Pandey et al., 2012). De acordo com a condição de cultivo, alterações (adição/retirada de nutrientes) na formulação do meio, adição de açúcares ou reguladores de crescimento, excesso/falta de luz se destacam por proporcionar um ambiente adequado para formação de embriões somáticos (Zavattieri et al., 2010; Pandey et al., 2012).

Os reguladores de crescimento de plantas desempenham função importante no desenvolvimento in vitro por modular a morfogênese e, dependendo do tipo e da dose pode desencadear a embriogênese somática em plantas (Pan et al., 2010; Shafiri et al., 2012). Fehér (2008) afirmou que a presença dos reguladores de crescimento no meio de cultivo é um fator essencial para obtenção de embriões somáticos, uma vez que atuam no controle do remodelamento da cromatina e expressão gênica. É provável que esses fatores sejam essenciais para *B. orellana*, uma vez que os embriões somáticos nessa espécie são obtidos quando reguladores de crescimento são adicionados ao meio de cultivo.

Alterações anatômicas na embriogênese somática

Durante o período de indução de embriogênese somática, o tempo de exposição dos tecidos às condições de cultivo causa mudanças nos tecidos, algumas células adquirem atividade meristemática e diversas mitoses (Fehér et al., 2003; Fehér, 2008; Paim Pinto et al., 2011). Essas mudanças promovem deformações, as quais são causadas pelas divisões celulares em diferentes planos e encerram com a formação dos embriões somáticos. Em *B. orellana* foram observadas diversas mudanças na estrutura do explante logo nos primeiros dez dias de indução, e estas mudanças refletem bem essa

fase de indução. Rocha et al. (2012) notaram a formação de protuberâncias na face adaxial do cotilédone em *Passiflora cincinnata* em meio de indução de embriogênese somática. Contudo, essas protuberâncias originadas durante a diferenciação dos tecidos do explante não originaram calos embriogênicos e nem embriões somáticos. Esses resultados divergem dos encontrados em *B. orellana* pelo fato de que as protuberâncias observadas nesta espécie originaram os embriões somáticos tanto na face adaxial quanto na face abaxial do cotilédone.

Embriões somáticos diretos em *B. orellana* são formados a partir das camadas de células do meristema fundamental e protoderme do cotilédone e do eixo embrionário do embrião zigótico. A protoderme e células mais externas do meristema fundamental foram responsáveis pela origem dos embriões. Cangahuala-Inocente et al. (2004) notaram que uma densa camada células meristemáticas formada na face adaxial do embrião zigótico originou embriões em *Feijoa sellowiana*. Em *P. edulis* (Paim Pinto et al., 2011) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007) foi observada intensa proliferação celular nas camadas subepidérmicas dos explantes (embriões zigóticos) logo no início do cultivo.

De acordo com desenvolvimento do embrião somático, este pode ter origem unicelular, quando é formado a partir de uma única célula ou multicelular quando um grupo de células dá origem ao embrião. Em *B. orellana* foi notada a presença de estrutura semelhante ao suspensor de embriões zigóticos, típico de embriogênese unicelular (Quiroz-Figueroa et al., 2006), e também embriogênese de origem multicelular assim como em outras espécies de plantas (Canhoto et al., 1996; Cangahuala-Inocente et al., 2004; Perez-Núñez et al., 2006; Moura et al., 2008; Rocha et al., 2012).

Análises histoquímicas e mobilização de reservas

Durante o desenvolvimento dos embriões somáticos em *B. orellana* foi notada a presença de compostos fenólicos nos embriões zigóticos, principalmente nas datas mais adiantadas de cultivo. Os fenólicos são compostos que podem ser associados com atividade antioxidante devido à capacidade de remoção ou mesmo eliminação de radicais livres e diminuir os efeitos de radicais livres (Alemanno et al., 2003; Peixoto et al., 2007; Almeida et al., 2012). Esses compostos foram evidenciados nos embriões zigóticos de *B. orellana* pela coloração com azul de toluidina e foi observada a intensificação dos fenólicos nos explantes à medida que o tempo de indução aumentou.

A presença desses compostos nos embriões zigóticos de *B. orellana* pode estar associada com a proteção dos tecidos aos radicais livres uma vez que os compostos fenólicos estavam presentes nas células que delimitavam os embriões somáticos.

A presença de compostos de reserva nas sementes das plantas é bastante comum, uma vez que mobilização destas reservas é necessária para a germinação e o desenvolvimento do embrião em planta adulta. A indução de embriões somáticos e o desenvolvimento destes estão associados ao consumo de corpos proteicos presentes nos tecidos dos explantes, os quais são produzidos em resposta a estímulo externo (Fehér, 2005; Cangahuala-Inocente et al., 2009).

A quantidade inicial de proteínas no embrião zigótico pode estar diretamente relacionada com a indução embriogênica (Cangahuala-Inocente et al., 2009; Tan-Wilson & Wilson, 2012). Compostos proteicos foram observados nos embriões zigóticos de *B. orellana* e também nos embriões somáticos em desenvolvimento durante a indução, provavelmente em resposta aos reguladores que estavam presentes no meio de cultivo, os quais serviram de molécula sinalizadora para conversão das células somáticas em embriões (Fehér, 2005; Rocha & Dornelas, 2013). Esses compostos também foram observados durante a embriogênese somática de outras espécies como *Acca sellowiana* (Cangahuala-Inocente et al., 2004; 2009), *Eucalyptus globulus* (Pinto et al., 2010), *Olea europeae* (Zienkiewicz et al., 2011), *Glycine max* (Kim et al., 2011), *Passiflora cincinnata* (Rocha et al., 2012).

No presente trabalho, foi observado que grãos de amido (Figura 4P) estavam presentes no embrião zigótico logo no início da indução e também após 52 dias de cultivo, sugerindo que ocorre síntese de amido e mobilização durante toda a embriogênese somática em *B. orellana*.

A mobilização de polissacarídeos, juntamente com outros compostos de reserva, pode ser responsável pelo desenvolvimento dos embriões somáticos nessa espécie uma vez que esse processo demanda alto custo energético (Martin et al., 2000). Polissacarídeos ocorrem no embrião zigótico em diversas espécies e são utilizados como reserva durante o processo embriogênico (Verdeil et al., 2001; Cangahuala-Inocente et al., 2009; Moura et al., 2008; 2010; Pinto et al., 2010). Contudo, Rocha et al. (2012) relataram que em *P. cincinnata* grãos de amido não constituíram compostos de reserva, indicando a ocorrência de síntese *de novo* e também que esse compostos podem estar associados com a síntese de lipídeos.

Os corpos lipídicos podem ser utilizados para a formação de membranas de organelas e células e a mobilização desses compostos está associada com a interação de diferentes organelas (Graham, 2008; Rocha et al., 2012). Em *B. orellana* os compostos lipídicos foram observados apenas no embrião zigótico presentes como constituintes de membranas e aos vinte dias de cultivo. A mobilização desses compostos nessa espécie pode não estar relacionada diretamente com a embriogênese somática e sim com o desenvolvimento normal do embrião zigótico, uma vez que foram notados produção e consumo de polissacarídeos e proteínas no desenvolvimento de embriões somáticos, enquanto os lipídeos praticamente não estavam presentes. Portanto, ocorre uma divergência dos resultados encontrados no presente trabalho em relação aos outros citados na literatura, pois a mobilização de reservas lipídicas é usual para eudicotiledôneas (Miernyk & Trelease, 1981; Bewley & Black, 1994; Martin et al., 2002; Graham, 2008; Rocha et al., 2012).

Neste trabalho foram observados vários aspectos estruturais, anatômicos e histoquímicos do desenvolvimento de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Bixa orellana* e esses resultados podem contribuir para o entendimento mais completo da morfogênese in vitro, bem como a embriogênese somática nessa espécie. Foi observado que embriões somáticos se desenvolvem a partir de protuberâncias que surgem da protoderme e são delimitados por cordões de compostos fenólicos no meristema fundamental. Os compostos de reserva de carboidratos e proteínas, principalmente, são mobilizados e auxiliam no desenvolvimento dos embriões somáticos. Os compostos lipídicos foram observados apenas no início da indução e após vinte dias no meio de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEMANNO, L.; RAMOS, T.; GARGANDEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolics compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, 92:613-623, 2003.
- ALMEIDA, J.R.G.S.; SÁ, P.G.S.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 33:561-566, 2012.
- BEWLEY J.D.; BLACK M. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum, London, 1994.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, 224:33-40, 2004.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; MALDONADO, S.B.; GUERRA, M.P. Patterns of protein and carbohydrates accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44:217-224, 2009.
- CANHOTO, J.M.; MESQUITA, J.F.; CRUZ, G.S. Ultrastructural changes in cotyledons of *Pineapple guava* (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, 78:513-521, 1996.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, 29:887-895, 2005.
- CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A.M. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, 42:525-533, 2006.
- DEO, P.C.; TYAGI, A.P.; TAYLOR, M.; HARDING, R.; BECKER, D. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, 28:27-40, 2010.

- DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, 48:1493-1509, 1997.
- D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37:168-172, 2001.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, 55:123-142, 1968.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 74: 201-228, 2003.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJID, A.; SAMAJ, J. (Eds). **Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs**. Springer: Berlin/Heidelberg, 2:85-101, 2005.
- FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**, 52:53-56, 2008.
- FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p. 2002.
- FRANCO, C.F.O. Mercado de urucum (*Bixa orellana* L.) no Brasil. EMEPA – Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A. Governo do Estado da Paraíba. 2003. Disponível em <http://www.emepa.org.br/urucum_mercado.php>. Acesso em 26 jun. 2012.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50:151-158, 1968.
- GRAHAM, I.A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, 59:115-142, 2008.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, 7:550-552, 1988.

- JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, vol. 13:196-223, 2001.
- JIMÉNEZ, V.M.; CLÉMENT, T. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Monographs** (2), Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Published online, 2006.
- JOSEPH, N.; SIRIL, E.A.; NAIR, G.M. An efficient *in vitro* propagation methodology for Annatto (*Bixa orellana* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 17:263-270, 2011.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27:137-138, 1965.
- KIM, H.T.; CHOI, U.K.; RYU, H.S.; LEE, S.J.; KWON, O.S. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1814:1178-87, 2011.
- LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, 36:949-953. 1991.
- MAHENDRANATH, G.; VENUGOPALAN, A.; PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Annatto pigment production in root cultures of Achiote (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106:517-522, 2012.
- MARTIN, A.B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGU, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, 154:143-151, 2000.
- MARTIN, T.; OSWALD, O.; GRAHAM, I.A. *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. **Plant Physiology**, 128:472-81, 2002.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Morfologia de embriões nucleares de laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Acta Botanica Brasilica**, 15:17-25, 2001.

MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry**, 2:79-91, 1998.

MIERNYK, J.A.; TRELEASE, R.N. Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. IV. β -oxidation. **Plant Physiology**, 67:341-46, 1981.

MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 95:175-184, 2008.

MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, 67:399-407, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, 15:473-479, 1962.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981.

PAIM PINTO, D.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107:521-530, 2011.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:159-167, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 39:629-634, 2003b.

- PAN, Z.; ZHU, S.; GUAN, R.; DENG, X. Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 103:145-153, 2010.
- PANDEY, D.K.; SINGH, A.K.; CHAUDHARY, B. Boron-mediated plant somatic embryogenesis: a provocative model. **Journal of Botany**. DOI: 10.1155/2012/375829, 2012.
- PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G.A. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105:285-290, 2011a.
- PARIMALAN, R.; VENUGOPALAN, A.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Bixa orellana* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105:317-328, 2011b.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied: preparative and optical technology**. 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 439p, 1980.
- PEIXOTO, P.H.; PIMENTA, D.S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, 66:17-25, 2007.
- PEREZ-NÚÑES, M.T.; CHAN, J.L.; SÁENZ, L.; GONZÁLEZ, T.; VERDEIL, J.L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42:37-43, 2006.
- PINHEIRO, A.L.; ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, 1:31-35, 1992.
- PINTO, G.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, 24:763-769, 2010.

PUIGDERRAJOLS, P.; CELESTINO, C.; SUILS, M.; TORIBIO, M.; MOLINAS, M. Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. **International Journal of Plant Sciences**, 161:353-362, 2000.

QUIROZ-FIGUEROA, F.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.; LOYOLA-VARGAS, V. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86:285-301, 2006.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA, DFZ/UESB/SBCN, p. 42. 1996.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-G.M., R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies to ward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, 106:165-172, 2006.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.; da SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, 249:747-758, 2012.

ROCHA, D.I.; DORNELAS, M.C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews**, 8:1-17, 2013.

ROSE, R.J.; MANTIRI, F.R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S.-K.; WANG, X.-D.; NOLAN, K.E.; SHEAHAN, M.B. **Developmental biology of somatic embryogenesis**. In: PUA, E.-C.; DAVEY, M.R. (eds) Plant developmental biology-biotechnological perspectives, vol 2. Springer, Heidelberg, pp 3-26, 2010.

SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; YOTOKOC, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIASA, B.B.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, 168:723-729, 2005.

SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H. **A cultura do urucum no Brasil**. Vitória da Conquista – BA, UESB, p. 109. 1990.

SHAFIRI, G. EBRAHIMZADEH, H.; GHAREYAZIE, B.; GHARECHAH, J.; VATANKHAH, E. Identification of differentially accumulated proteins associated with

embryogenic and nonembryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). **Proteome Science**, 10:3, 2012.

SILVA, C.V.; PINTO, D.L.P.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel system regeneration for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 99:47-54, 2009.

SIRIL, N.E. JOSEPH, N. Micropropagation of annatto (*Bixa orellana* L.) from mature tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants with RAPD markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 19:147-155, 2013.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; GUERRA, M.P.; CUTRI, L.; DORNELAS, M.C.; FLOH, E.I.S. A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1* (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109:41-50, 2012.

STEINMACHER, D.A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 43:124-132, 2007.

TAN-WILSON, A.L.; WILSON, K.A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, 145:140-153, 2012.

VALDEZ-OJEDA, R.; HERNÁNDEZ-STEFANONI, J.L.; AGUILAR-ESPINOSA, M.; RIVERA-MADRID, R. Assessing morphological and genetic variation in annatto (*Bixa orellana* L.) by sequence-related amplified polymorphism and cluster analysis. **HortScience**, 43:2013-2017, 2008.

VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; ESCOUTE, J.; MICHAUX-FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, 88:9-18, 2001.

VERDEIL, J.L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, 12:245-252, 2007.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell and Molecular Biology**, 22:45-64, 1977.

ZAVATTIERI, M.A.; FREDERICO, A.M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Plant Biotechnology**, 13:1. DOI: 10.2225, 2010.

ZIENKIEWICZ, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.C.; ZIENKIEWICZ, K.; DE DIOS ALCHÉ, J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. **Protoplasma**, 248:751-765, 2011.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, 5:1141-1423, 1993.

CAPÍTULO II

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* EM *Bixa orellana* L.

RESUMO

Os genes *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) estão envolvidos em vários processos de desenvolvimento, incluindo reprogramação celular e como marcadores de pluripotência em células. As proteínas codificadas por esses genes pertencem à classe dos receptores de membrana do tipo RLK (*Receptor-Like Kinase*). Ortólogos de genes *SERK* foram descritos em várias espécies de plantas, com as sequências de aminoácidos e o padrão de expressão altamente conservados e apresentados como pequenas famílias multigênicas. Nesse trabalho, procedeu-se à clonagem e caracterização de genes *SERK* envolvidos na embriogênese somática de *Bixa orellana* L. Para tanto, foi extraído RNA total de embriões zigóticos imaturos após 30 dias em meio de indução de embriogênese somática. Foi sintetizado o cDNA fita simples e amplificado por PCR utilizando-se 6 combinações de primers degenerados. Os fragmentos de tamanhos esperados foram purificados de gel, ligados em vetor e inseridos em células ultra-competentes. Foram obtidos 14 clones positivos de 4 combinações diferentes de primers, sendo que desses, 3 clones ('Bo9', 'Bo10' e 'Bo12') demonstraram diferenças nas suas sequências de nucleotídeos e foram escolhidos para representar os demais. As sequências de aminoácidos deduzidas dos clones 'Bo9', 'Bo10' e 'Bo12' de *B. orellana* apresentaram alta similaridade com proteínas *SERK* de outras espécies de plantas. O relacionamento filogenético das sequências isoladas de *B. orellana* com as de outras espécies sugere que as funções das proteínas podem ser conservadas na espécie e também nos diferentes grupos de plantas (monocotiledôneas, eudicotiledôneas e gimnospermas). Estudos de expressão por hibridização *in situ* demonstraram presença dos transcritos de *SERK* não somente nos tecidos do embrião zigótico, mas também nos embriões somáticos em estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Todavia, com fraco sinal nessa última fase de desenvolvimento

embrionário, indicando expressão reduzida de *SERK*. Consistentemente, a sonda senso não apresentou a marcação característica de hibridização. Esse trabalho apresenta o primeiro relato sobre a caracterização de genes *SERK* em *B. orellana* (*BoSERK*) expressos sob a condição de indução de embriogênese somática. Contribui com informações importantes para o melhor entendimento e caracterização da embriogênese somática do ponto de vista molecular, subsidiando estudos adicionais na aplicação da embriogênese somática na propagação massiva e na transformação genética da espécie.

Palavras-chave: Embriogênese somática, filogenia, hibridização in situ, *SERK*, urucum.

**MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF
SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK) GENES IN
Bixa orellana L.**

ABSTRACT

The *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) genes are involved in various developmental processes, including cell reprogramming and pluripotency markers in cells. The proteins encoded by these genes belong to the class of membrane receptor type RLK (**R**eceptor-**L**ike **K**inase). *SERK* gene orthologs have been described in various plant species with amino acid sequences and patterns of expression highly conserved, and presenting themselves as small multigene families. In this work the cloning and characterization of *SERK* genes involved in somatic embryogenesis of *Bixa orellana* L. were carried out. Total RNA was extracted from immature zygotic embryos after 30 days on somatic embryogenesis medium. Single strand cDNA was synthesized and amplified by PCR, using 6 degenerated primers combinations. Fragments of the expected sizes were purified from the gel, and were linked into vector, and then were inserted into ultra competent cells. Fourteen positive clones were obtained from 4 different combinations, and 3 these clones ('Bo9', 'Bo10' and 'Bo12') demonstrated some differences in their nucleotide sequences and they were selected to represent the others clones. The deduced amino acid sequences of the clones 'Bo9', 'Bo10' and 'Bo12' from *B. orellana* showed high similarity to sequences of other plant *SERK* proteins. The phylogenetic relationship among *SERK* sequences isolated from *B. orellana* with other species suggests that conserved functions can be maintained in the specie and different groups of plants (monocots, eudicotyledonous, and gymnosperms). Expression studies by in situ hybridization revealed the presence of the *SERK* transcripts not only in zygotic embryo tissues, but also in somatic embryos at different stages: globular, heart, torpedo and cotyledonary. However, with weak signal in this last phase of embryo development, indicating reduced expression of *SERK*. Consistently, the sense probe showed no hybridization feature. This work shows the first report on the cloning and characterization of *SERK* genes in *B. orellana* (*BoSERK*) expressed under the condition of induction of somatic embryogenesis and, contributes with important information for a better understanding and characterization of somatic embryogenesis at

molecular point of view, supporting additional studies on the application of somatic embryogenesis in mass propagation and genetic transformation of the species.

Keywords: Annatto, in situ hybridization, phylogeny, SERK, somatic embryogenesis.

INTRODUÇÃO

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma planta arbustiva da qual é extraído o carotenoide bixina, um dos mais importantes corantes utilizados pelas indústrias de alimento, farmacêuticas, têxteis e de cosméticos (Cruz et al., 2008). O carotenoide é utilizado desde a antiguidade em rituais indígenas, na pintura e proteção da pele e na culinária de diferentes regiões brasileiras, nas Américas Central e do Sul (Franco et al., 2002).

Esta espécie reproduz-se por polinização cruzada e sua propagação é realizada principalmente por sementes, o que acarreta em alta variabilidade genética, especialmente relacionada com o número de sementes por cápsula e com a cor e o teor de pigmentos contidos nos tegumentos das sementes (Franco et al., 2002; 2003; Valdez-Ojeda et al., 2008). Para contornar essa situação, diversos trabalhos in vitro têm sido propostos: estudos com gemas axilares e segmentos nodais (D'Souza & Sharon, 2001; Paiva Neto et al., 2003a; Joseph et al., 2011), com sementes (Sha Valli Khan et al., 2002), com segmentos de hipocótilos de plantas germinadas in vitro (Paiva Neto et al., 2003a; Carvalho et al., 2005), com segmentos de raízes de plantas germinadas in vitro (Mahendranath et al., 2012), com segmentos caulinares adultos e explantes nodais adultos (Parimalan et al., 2011a; Siril & Joseph, 2013), além da obtenção de embriões somáticos (Paiva Neto et al., 2003b; Parimalan et al., 2011b).

A embriogênese somática é um método de propagação de plantas onde células somáticas sofrem alteração na rota de diferenciação e tornam-se competentes para formar embriões (Zimmerman, 1993; Rocha & Dornelas, 2013). Essa ferramenta desperta interesse nos estudos de desenvolvimento das plantas e serve como modelo para estudos de embriogênese por apresentar mecanismos moleculares semelhantes à embriogênese zigótica (Dodeman et al., 1997).

Genes marcadores do início da indução da embriogênese somática podem fornecer informações importantes sobre o perfil molecular das plantas investigadas durante essa fase do desenvolvimento. Dentre esses genes, destaca-se o *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* (*SERK*) que foi descrito inicialmente na formação de embriões somáticos em cenoura (*Daucus carota*) (Schmidt et al., 1997). Desde então, esse gene tem sido estudado em diferentes espécies de plantas: *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001), *Zea mays* (Baudino et al., 2001), *Medicago truncatula* (Nolan et al., 2003), *Helianthus annuus*

(Thomas et al., 2004), *Oryza sativa* (Hu et al., 2005), *Citrus unshiu* (Shimada et al., 2005), *Theobroma cacao* (Santos et al., 2005); *Solanum tuberosum* (Sharma et al., 2008), *Cocos nucifera* (Pérez-Nuñez et al., 2008), *Panax ginseng* (Kiselev & Tchernoded, 2009), *Citrus sinensis* (Ge et al., 2010), *Musa acuminata* (Huang et al., 2010), *Rosa canina* (Kedong et al., 2011), *Cyclamen persicum* (Savona et al., 2012), *Glycine max* (Yang et al., 2011), *Ananas comosus* (Ma et al., 2012), *Araucaria angustifolia* (Steiner et al., 2012), *Prunus incisa* (Thunb.) (Ben Mahmoud et al., 2013), entre outras, o que confirma a sua utilização como marcador de embriogênese.

O gene *SERK* codifica proteínas receptoras tipo quinases (*Receptor-Like Kinase* - RLKs), as quais fazem parte da subclasse LRR (*Leucine Rich Repeat*) (RLK-LRR). As proteínas com domínio LRR estão envolvidas na transdução de sinais e acredita-se que medeiam as interações proteína-proteína (Shiu & Bleeckey, 2001).

Os receptores quinases são proteínas que apresentam uma organização padrão dos três domínios que as compõem: um domínio extracelular variável, um domínio transmembranar e um domínio quinase intracelular (Shiu & Bleecker, 2001). No domínio extracelular estão presentes um peptídeo sinal, um zíper de leucina, cinco regiões ricas em leucina (apenas *SERK* tem 5 regiões, sendo esse número variável nos diferentes receptores) e um domínio rico em prolina, exclusivo de proteínas *SERK*. Logo em seguida estão presentes na sequência da proteína um domínio transmembrana, um domínio quinase intracelular constituído de onze subdomínios, seguido da extremidade carboxi-terminal (Schmidt et al., 1997; Hecht et al., 2001).

Foram identificados diferentes membros de proteínas *SERK* nas plantas, de acordo com a espécie: em cenoura, *DcSERK* (Schmidt et al., 1997), em *Arabidopsis*, *AtSERK1/2/3/4/5* (Hecht et al., 2001), em alfafa, *MtSERK1/2/3/4/5/6* (Nolan et al., 2003; 2011), em soja, potencialmente 17 *GmSERK* (Nolan et al., 2011) e em *Prunus incisa* (Thunb.) (Ben Mahmoud et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar os genes da subfamília *SERK*, além de analisar o seu perfil de expressão e localizar por hibridização in situ os tecidos onde ocorre a expressão do gene durante a embriogênese somática em *B. orellana*. Pretende-se também com esse trabalho fazer um relacionamento filogenético entre as proteínas *SERK* de *B. orellana* com as de outras espécies já caracterizadas.

No presente estudo, três sequências parciais apresentando alta identidade com membros da família *SERK* de outras espécies foram isoladas a partir de cDNA de culturas embriogênicas de *B. orellana* aos 30 dias de cultivo. O padrão de expressão

desses genes durante o processo de indução da embriogênica somática foi investigado por hibridização in situ em diferentes estágios da cultura. O relacionamento filogenético com membros de outras espécies sugere que *BoSERKs* podem estar envolvidos em diferentes funções ao longo do desenvolvimento da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal para indução de embriogênese somática

Como fonte de material vegetal foi utilizada uma planta híbrida de *Bixa orellana* L. (Bixaceae) (genótipo ‘M2’) proveniente do cruzamento artificial entre ‘Fruto Verde Piloso’ X ‘Fruto Vermelho Liso’. Esta planta faz parte de uma coleção de matrizes denominadas de ‘M1’ a ‘M10’ do mesmo cruzamento (Pinheiro & Almeida, 1992), sendo cultivada há cerca de 20 anos no Horto da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG e para qual foi estabelecido o protocolo de embriogênese somática (Paiva Neto et al., 2003b).

Frutos imaturos com aproximadamente 70 dias após a antese foram coletados e levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos (Bioagro, UFV). Para a desinfestação, as sementes foram retiradas das cachopas sobre a bancada, colocadas em tubos plásticos de 50 mL e foram incubadas com etanol 70 % durante 10 minutos em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. Logo em seguida, o etanol foi retirado dos tubos e adicionado hipoclorito de sódio comercial (Super Globo[®], Brasil) 50 % durante 15 minutos, sendo que os tubos eram agitados manualmente a cada 5 minutos. As sementes foram enxaguadas com água estéril por cinco vezes sucessivas e colocadas sobre papel absorvente. Com o auxílio de uma pinça e um bisturi, os embriões imaturos foram retirados das sementes e cultivados em meio contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 3 % sacarose, 0,01 % (p/v) mio-inositol, 4,52 µM cinetina, 2,26 µM ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,1 % (p/v) carvão ativado, gelificado com 0,28 % (p/v) Phytigel[®] (Sigma-Aldrich, USA). O meio teve o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e depois foi esterilizado em autoclave (121 °C). Alíquotas de 10 - 15 mL foram colocadas em placas de Petri de poliestireno cristal (60 x 15 mm, J. Prolab, Curitiba, Brasil), as quais foram vedadas com filme PVC (Goodyear, Paulínia, Brasil), após a inoculação dos embriões zigóticos.

As culturas foram mantidas em sala de cultivo a 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h com irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de duas lâmpadas tubulares fluorescentes (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram, São Paulo, Brasil). O meio de cultivo foi preparado de acordo com o proposto por Paiva Neto et al. (2003b).

Clonagem e caracterização de genes *SERK* em *B. orellana*

Extração de RNA total

RNA total foi extraído a partir de culturas embriogênicas com 30 dias em meio de indução, utilizando o kit RNAqueous® Ambion® (Life Technologies™), de acordo com recomendações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™) com absorbância de 260 nm e a integridade das amostras verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em condições livres da ação de RNAses.

Síntese de cDNA fita simples (Superscript II – Invitrogen™)

Para a síntese de cDNA fita simples, 2 µg de RNA total e Oligo(dT) 15 Primer (Promega, USA) 40 µM, em um volume total de 12 µL em água DEPC, foram incubados a 65 °C por cinco minutos, em seguida, no gelo por dois minutos. Logo após, foram adicionados 4 µL do tampão de síntese de primeira fita de DNA, 2 µL de mistura de dNTPs (10mM cada) e 1 µL (200 U) da enzima transcriptase reversa (SuperScript™ *Reverse transcriptase*, Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante. A reação ocorreu em um ciclo de 42 °C por 50 minutos seguidos de 15 minutos a 70 °C para a inativação da enzima no termociclador (Biocycler MJ25). O cDNA foi armazenado a -20 °C, até o momento do uso.

Amplificação e clonagem da sequência codificadora de *SERK*

O cDNA sintetizado foi utilizado como molde para a amplificação das sequências codificadoras de genes *SERK* expressos durante a embriogênese somática em *B. orellana*.

Para amplificação foram utilizados iniciadores degenerados desenhados por Baudino et al. (2001) nas seguintes combinações: S1-S5; S1-S4; S2-S5; e S2-S4 (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Iniciadores degenerados utilizados para amplificação de *SERK* em cDNA de *Bixa orellana* L. e a localização na proteína (Baudino et al., 2001)

Iniciadores	Sequência	Domínio estrutural
S1	5'TGTHACRTGGGTRTCCTTGTARTCCAT3'	Domínio quinase (exon VII)
S2	5'CGRTGMACWGCCATRCTIATCAT3'	Domínio quinase (exon III)
S3	5'GTGAAYCCTTGCACATGGTTYCATGT3'	Zipper de leucina
S4	5'CCMTGYCCIGGATCTCCCCITTT3'	SPP
S5	5'ATGCACTSACYAATATYACWACYCTTCAAG3'	LRR

W = A ou T; R = A ou G; M = A ou C; Y = C ou T; H = A ou C ou T; S = C ou G; S1 e S2 (iniciadores reversos); S3, S4 e S5 (iniciadores diretos).

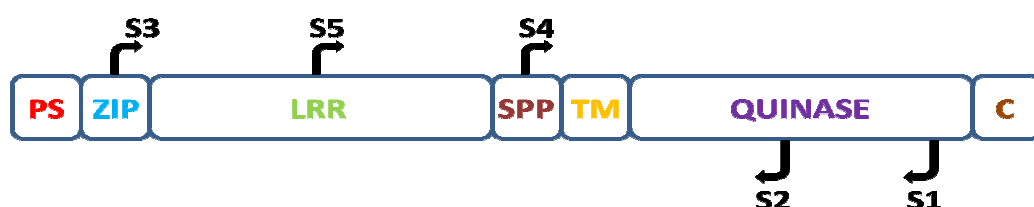


Figura 1. Estrutura geral de genes *SERK* e posição dos indicadores degenerados utilizados na amplificação. PS = Peptídeo sinal; ZIP = Zíper de leucina putativo; LRR = Repetições ricas em leucina; SPP = Região rica em prolina; TM = domínio transmembrana; Quinase = domínio quinase da proteína; C = Região Carboxi-terminal. Modificado de Baudino et al. (2001).

A reação de PCR ocorreu em um volume final de 25 µL contendo: 2,0 µL de cDNA concentrado, 2,5 µL de tampão 10X, 0,5 µL de dNTPs (10mM), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1µL de cada iniciador e 0,2 µL de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™). Foi utilizado o seguinte programa de amplificação: desnaturação a 95 °C por cinco minutos, 35 ciclos a 95 °C (1 minuto), 50 °C (1 minuto) e 72 °C (1 minuto), e uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %.

Os fragmentos amplificados foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o Kit Wizard® SV Gel e PCR clean up (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a quantificação, os fragmentos foram ligados no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA) na proporção 3:1 de inserto:vetor com a enzima T4 DNA ligase (Promega, USA), seguindo-se instruções do fabricante. A transformação em *Escherichia coli* (células ultracompetentes DH5α), por choque térmico, foi realizada

utilizando-se 2 µL da ligação e 40 µL de células ultracompetentes (1×10^8). Após incubação, a 37 °C por 1 hora, as células foram plaqueadas em meio seletivo LB (Sambrook & Russel, 2001) sólido, contendo 100 µg/mL de ampicilina, 20 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-galactopiranosídeo (X-Gal) (Promega, USA), 0,1 mM isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Promega, USA) e, posteriormente, incubadas a 37 °C por aproximadamente 14 horas. Para a confirmação da presença do inserto no vetor, o DNA plasmidial das colônias selecionadas foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI* e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %.

Sequenciamento dos clones e análise das sequências

Os clones confirmados pela análise de restrição foram sequenciados pela empresa MacroGen, localizada na Coreia do Sul. Os clones foram sequenciados nos sentidos senso e anti-senso com os iniciadores universais M13 e SP6, respectivamente.

Os cromatogramas obtidos foram processados e a montagem dos *consensus* executada no programa CodonCode™ Aligner-Software (LI-COR, Inc., Lincoln, USA).

As sequências *consensus* obtidas foram comparadas com as sequências já depositadas no banco de dados do NCBI utilizando-se o programa BLASTn (Altschul et al., 1997). O programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi utilizado para identificação da fase de leitura e predição das proteínas. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com sequências homólogas de proteínas SERK disponíveis no banco de dados do NCBI com maior identidade às de *B. orellana* para análise dos domínios conservados.

Análise filogenética

O relacionamento filogenético das sequências de SERK de *B. orellana* com as de outras espécies foi inferido mediante a construção de árvores filogenéticas. As sequências obtidas foram alinhadas com sequências de eudicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas, disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no MEGA versão 5.0 (Tamura et al., 2011) disponível em <http://www.megasoftware.net/mega5>. Árvores filogenéticas foram obtidas utilizando o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com o modelo de

substituição JTT (Jones et al., 1992) e distribuição Gamma. A confiabilidade de cada ramo da árvore foi estimada via teste *Bootstrap* (Felsenstein, 1985), com 1000 repetições.

Localização dos transcritos dos genes *SERK* durante a embriogênese de *B. orellana* por hibridização *in situ*

Coleta e preparo dos tecidos

Embriões zigóticos com 0, 10, 15, 20, 25, 30, 32 e 52 dias de indução foram coletados em condições livres da ação de RNases e imersas imediatamente em solução fixadora (paraformaldeído 4 % e glutaraldeído 0,25 %, em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2). As amostras foram submetidas a vácuo por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução fixadora foi renovada e as amostras foram mantidas a 4 °C durante a noite.

No dia seguinte, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2 e desidratadas em série etílica (30, 50, 70, 80, 85, 90, 95 e 100 %), por 1 hora cada. As amostras foram infiltradas em parafina histológica (Dinâmica, Brasil), e para tanto, foram desidratadas em séries crescentes de etanol:xilol nas proporções 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, v/v e xilol puro (duas trocas), sendo que cada etapa teve a duração de pelo menos 12 horas. Durante a etapa de xilol puro, as amostras foram colocadas em estufa a 65 °C e foram sendo acrescentados flocos de parafina. A cada troca, era descartado um terço da solução dos frascos e acrescentados novos flocos de parafina, até a substituição completa de xilol por parafina pura. As amostras foram colocadas em formas de papel e, após a polimerização fixadas em blocos de madeira e estocadas a 4 °C.

Secções de 10 µm foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço manual Leica RM2255 (Leica, Alemanha) e colocadas em banho-maria contendo água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC), aquecida a 42 °C para distender as secções e depois foram colocadas em lâminas livres de RNases.

As lâminas utilizadas receberam um pré-tratamento com Extran[®] 5 % (Merck, Alemanha) durante 4 horas, depois foram tratadas com ácido clorídrico 10 % por mais 4 horas e, logo após foram enxaguadas em água corrente e secas em estufa a 65 °C. Após essa etapa, as lâminas foram esterilizadas em estufa a 180 °C e passaram por tratamento com organossilano (Sigma-Aldrich, USA), consistindo das seguintes etapas: imersão em acetona durante 10 segundos, depois imersão em solução de organossilano 2 % em

acetona durante 6 minutos e, por fim, imersão em acetona durante 10 segundos. Depois desse processo, as lâminas foram secas em estufa a 65 °C e armazenadas a 4 °C, até o momento do uso.

Antes da hibridização, a parafina foi removida em xilol 100 % (duas trocas de 5 minutos), xilol:etanol (1:1, v/v) por 5 minutos e etanol 100 % (10 minutos). As lâminas foram secas à temperatura ambiente.

Síntese das sondas *sense* e *antisense* marcadas com digoxigenina

Foi utilizado como molde para síntese das sondas um fragmento de 595 bp, referente ao clone Bo6 (Tabela 2), de uma região conservada que codifica parte da região rica em leucina e os domínios SPP, específico de SERK e ausente nas demais proteínas LRR quinases, o domínio transmembrana e parte do domínio quinase. O fragmento foi amplificado a partir de 10 ng do DNA plasmidial utilizando os iniciadores T7 e SP6, nas mesmas condições de amplificação já mencionadas anteriormente. Os produtos amplificados foram purificados com fenol/clorofórmio (1:1) e em seguida em clorofórmio puro para remoção do fenol. A precipitação do DNA foi feita com acetato de sódio 3 M (1/10 volumes) e 2 volumes de etanol absoluto. Os produtos foram quantificados em gel de agarose 1,0 % com o auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®). A escolha do clone foi feita após analisar a orientação do inserto na sequência. O clone escolhido para síntese da sonda foi estocado em glicerol 20 % a -80 °C.

Para a síntese das sondas, 1 µg de cada um dos produtos purificados foi utilizado. As sondas de RNA (senso e anti-senso) foram sintetizadas por transcrição *in vitro*, utilizando o *DIG RNA Labeling kit (SP6/T7)* (Roche®) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração da sonda foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % utilizando 100 e 200 ng do controle positivo de RNA marcado (vial 5 do kit) e a marcação confirmada por ‘dotblot’.

Reação de hibridização

Uma alíquota de 60 ng de tRNA de levedura (Invitrogen®) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por 5 minutos e adicionados a 100 µL do tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, formamida 50 %, EDTA 1 mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X). Para a hibridização, 120 µL do mix de hibridização foram colocados sobre cada lâmina e cobertas com Parafilm®. As lâminas foram

incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por um período de aproximadamente 16 horas.

Reação de pós-hibridização e detecção imunológica

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em SSC 4X, 2X, 1X e 0,5X (solução SSC 20X = NaCl 3 M, Na₃-citrato 0,3 M, pH 7,2), cada solução por 20 minutos. Em seguida, foram mantidas por 5 minutos em tampão de detecção 1 (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 minutos na solução bloqueadora 2 (tampão de detecção 1 acrescido de BSA 1 %). As secções foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por 5 minutos e incubadas durante 1 hora com anticorpo *Anti-Digoxigenina-AP, Fab Fragments* (Roche®) diluído 1:1.000 em tampão de detecção 1. Após a sequência de duas lavagens, de 15 minutos cada, em tampão de detecção 1 e uma lavagem de 5 minutos em tampão de detecção 3 (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de MgCl₂, com pH final ajustado para 9,5) as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (Promega, USA) (0,05 g/mL) e 4,5 µL de NBT (nitrobluetetrazólio) (Promega, USA) (0,05 g/mL) em 1 mL de tampão 3 por aproximadamente 40 minutos, no escuro. Para cessar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 (0,01 M de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) por 10 minutos, e depois, lavadas duas vezes em água bidestilada. As lâminas foram montadas em água ultrapura.

A análise e captura das imagens foram realizadas em microscópio de luz e fluorescência (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com sistema U-Photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insight Colour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic 4.8.

RESULTADOS

Obtenção dos embriões somáticos

Os embriões somáticos de *B. orellana* se desenvolveram por embriogênese direta a partir de embriões zigóticos imaturos tanto no eixo embrionário quanto na região cotiledonar nas faces adaxial e abaxial.

As células do eixo e dos cotilédones dos embriões zigóticos no tempo 0 (início da indução) são constituídas de superfície lisa e contorno nítido. Logo depois, com o início da indução, os tecidos apresentam grande desorganização devido ao constante processo de divisões celulares que culmina na formação dos embriões somáticos. Estruturas proembrionárias e embriões somáticos globulares foram observados a partir do décimo e vigésimo dias de cultivo, respectivamente. Ao final de 30 dias, foram observados embriões nos diversos estádios de desenvolvimento desde estruturas proembrionárias, embriões globulares a embriões em estágio cotiledonar.

Clonagem da provável sequência codificadora de *SERK* em *B. orellana*

Todas as combinações de iniciadores degenerados (Tabela 1) utilizados para a amplificação do cDNA de *SERK* em *B. orellana* ('M2') geraram fragmentos apresentando tamanhos esperados no gel. A amplificação de produtos inespecíficos foi também observada nas combinações de iniciadores S5/S1 e S4/S1, entretanto apenas os fragmentos de tamanhos desejados foram purificados do gel. Esses fragmentos foram clonados e através da análise de restrição foram identificados 14 clones positivos das combinações S5/S1, S5/S2, S3/S1, S3/S2. Não foram identificados clones positivos para as combinações S4/S1 e S4/S2. Os clones foram numerados de 1 a 14 e, após sequenciamento apresentaram tamanhos variados de acordo com a combinação de iniciadores (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho dos fragmentos dos clones positivos do cDNA de *Bixa orellana* L. ('M2') obtidos por PCR de acordo com a combinação de iniciadores

Combinação dos iniciadores	Tamanho (kb)
S5/S1	0,9
S5/S2	0,6
S3/S1	1,2
S3/S2	0,9

Como esperado a combinação S3/S1 apresentou as maiores sequências com cerca de 1189 bp. A combinação S5/S2 gerou clones de aproximadamente 596 bp e a combinação S5/S1 gerou um único clone com fragmento de 910 bp.

Análises dos homólogos de *SERK* através das sequências de nucleotídeos

A comparação das sequências nucleotídicas dos clones sequenciados com as depositadas no banco de dados demonstrou alta identidade com os homólogos de *SERK*. As sequências de nucleotídeos dos 14 clones de *B. orellana* foram alinhadas e um cladograma construído para analisar a proximidade a dos mesmos (dados não mostrados). Após análise, foram selecionados os clones ‘Bo9’, ‘Bo10’ e ‘Bo12’ devido a diferenças encontradas no agrupamento. O clone ‘Bo9’ apresentou alta identidade (79 a 83 %) com SERK2 e SERK3 de espécies pertencentes a diferentes famílias botânicas (Tabela 3). O clone ‘Bo10’ apresentou maior identidade com SERK3 de *Gossypium hirsutum* (82 %) (Tabela 4). O clone ‘Bo12’ apresentou identidade de 88 % com SERK de *Theobroma cacao* e *Citrus sinensis*, e 79 a 86 % com SERK1 de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, *G. hirsutum* e *Rosa canina* (Tabela 5).

Tabela 3. Comparação da sequência nucleotídica do clone ‘Bo9’, obtida a partir de cDNA amplificado com a combinação S3/S1 (1.189 bp), com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados

Acesso	Descrição	Banco de dados	Cobertura (%)	E-value	Identidade Máxima (%)
JF800909.1	<i>Gossypium hirsutum</i> SERK3	NCBI	100	0,0	83
NM001247697.1	<i>Solanum lycopersicum</i> SERK3A	NCBI	99	0,0	80
HQ332144.1		NCBI	99	0,0	79
	<i>Nicotiana benthamiana</i> SERK3A				
AF384970.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> SERK3	NCBI	100	0,0	79
HM640001.1	<i>Medicago truncatula</i> SERK2	NCBI	99	0,0	79

Tabela 4. Comparação da sequência nucleotídica do clone ‘Bo10’, obtida a partir de cDNA amplificado com a combinação S3/S1 (1.186 bp), com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados

Acesso	Descrição	Banco de dados	Cobertura (%)	E-value	Identidade Máxima (%)
JF800909.1	<i>Gossypium hirsutum</i> SERK3	NCBI	100	0,0	82
JF430801.1	<i>Gossypium hirsutum</i> SERK2	NCBI	100	0,0	81
HQ332144.1		NCBI	99	0,0	79
	<i>Nicotiana benthamiana</i> SERK3A				
AF384970.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> SERK3	NCBI	100	0,0	79
HM640001.1	<i>Medicago truncatula</i> SERK2	NCBI	99	0,0	79

Tabela 5. Comparação da sequência nucleotídica do clone ‘Bo12’, obtida a partir de cDNA amplificado com a combinação S3/S2 (908 bp), com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados

Acesso	Descrição	Banco de dados	Cobertura (%)	E-value	Identidade Máxima (%)
AY570507.1	<i>Theobroma cacao</i> SERK	NCBI	99	0,0	88
FJ851422.1		NCBI	100	0,0	88
	<i>Citrus sinensis</i> SERK				
HM802242.1		NCBI	100	0,0	86
	<i>Rosa canina</i> SERK1				
AY162176.1	<i>Medicago truncatula</i> SERK1	NCBI	100	0,0	82
NM105841.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> SERK1	NCBI	100	0,0	79

O alinhamento das sequências dos clones SERK de *B. orellana* permitiu a observação de algumas diferenças nucleotídicas entre os clones, com destaque para a ausência de 30 pares de bases entre as posições 443 e 473 (no alinhamento) nos clones ‘Bo8’ a ‘Bo14’, com exceção do ‘Bo12. Nos demais clones, ‘Bo1’ a ‘Bo7’ e ‘Bo12’, a presença desses nucleotídeos foi conservada (Figura 2).

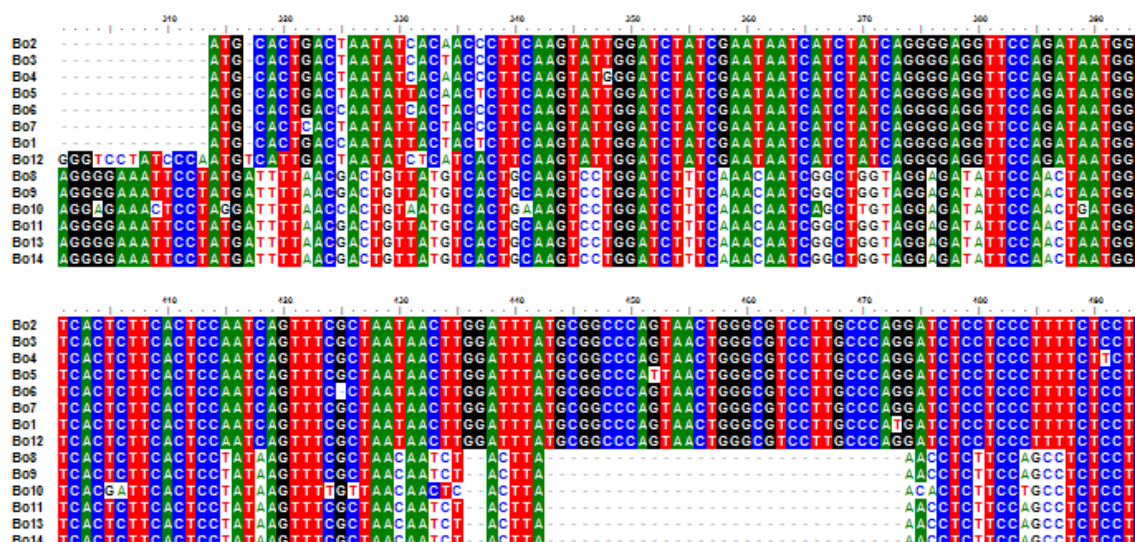


Figura 2. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos clones de *B. orellana*.

Análise da sequência de aminoácidos da proteína SERK de *B. orellana*

As sequências dos clones de *B. orellana* ('M2') foram analisadas no programa ORF Finder (NCBI). Existiu alta similaridade entre as sequências de aminoácidos desses clones, que foi demonstrada pelo cladograma construído apenas com as sequências de *Bixa*. Então, foram selecionados apenas três clones, os quais representavam as pequenas diferenças existentes entre eles. Os clones 'Bo9' e 'Bo10' apresentaram uma *Open Read Frame* (ORF) de 366 e 365 aminoácidos, respectivamente. O clone 'Bo12' apresentou uma ORF de 275 aminoácidos. A comparação das sequências de aminoácidos deduzidas dos clones 'Bo9', 'Bo10' e 'Bo12' demonstrou identidades de 87 %, 83 % e 98 % com SERK3 de *N. benthamiana*, SERK2 e SERK3 de *G. hirsutum*, com SERK1 de *G. hirsutum* e SERK de *C. papaya*, respectivamente.

A diferença marcante observada pela ausência de 30 nucleotídeos nas sequências dos clones 'Bo9' e 'Bo10' (Figura 2) refletiu na sequência das proteínas, com a ausência de 10 aminoácidos próximos ao domínio SPP que se repete em proteínas SERK de outras espécies (Figura 3). A sequência do clone 'Bo12', que alinha principalmente com as sequências de proteínas SERK, SERK1 e SERK2 de outras espécies vegetais, apresenta os 10 aminoácidos próximos àquele domínio.

Figura 3. Comparação das sequências de aminoácidos deduzidas dos clones ‘Bo9’, ‘Bo10’ e ‘Bo12’ de *B. orellana* com homólogos de SERK disponíveis no banco de dados: Os domínios estruturais foram indicados por retângulos abaixo do alinhamento. LRR1-5: domínios contendo os motivos repetitivos de leucina (*Leucine Rich Repeats*); SPP: região rica em prolina; C-terminal: domínio carboxi-terminal. Gaps incluídos para otimização do alinhamento são indicados por “-”.

As ORFs deduzidas dos três clones de *B. orellana* incluem parte do domínio zíper de leucina, os cinco domínios contendo o padrão repetitivo de leucina, os domínios rico em prolina e transmembranar, e parte do domínio quinase (Figura 3). O restante das sequências, referente ao início da proteína e à extremidade C-terminal estão ausentes nos três clones analisados de *B. orellana* devido à região de anelamento dos iniciadores degenerados. Desta forma, para maiores informações sobre essas regiões, experimentos futuros de 3’ e 5’-RACE com extensão dos clones a partir de iniciadores internos específicos devem ser realizados.

Análise Filogenética

A análise filogenética das sequências protéicas dos clones de *B. orellana* com os possíveis homólogos de SERK em outras espécies vegetais foi realizada visando investigar a relação entre essas proteínas. A árvore não-enraizada foi construída considerando as sequências das proteínas incluindo desde os motivos LRR ao domínio quinase, por conter as regiões compreendidas entre as combinações de primers degenerados, e que estão presentes nos clones ‘Bo9’, ‘Bo10’ e ‘Bo12’.

Na filogenia, foi observada a formação de diversos grupos bem sustentados pelo teste de *Bootstrap* (Figura 4). Os clones de *B. orellana* agruparam com diferentes membros de SERK presentes em outras espécies vegetais. O clone ‘Bo12’ agrupou-se com membros SERK e SERK1 de outras eudicotiledôneas e o ramo foi sustentado por valor *Bootstrap* de 95 % (Figura 4). Os clones ‘Bo9’ e ‘Bo10’ agruparam em outro ramo da árvore, sustentado por um valor *Bootstrap* de 99 % (Figura 4). Estes clones apresentaram alta divergência entre si, dando indícios que podem se tratar de dois outros membros distintos da subfamília SERK (Figura 4). Em função da alta similaridade das sequências de aminoácidos das proteínas encontradas em *B. orellana* com as demais encontradas no banco de dados, a partir daqui essas proteínas serão denominadas, de forma geral, BoSERK-like.

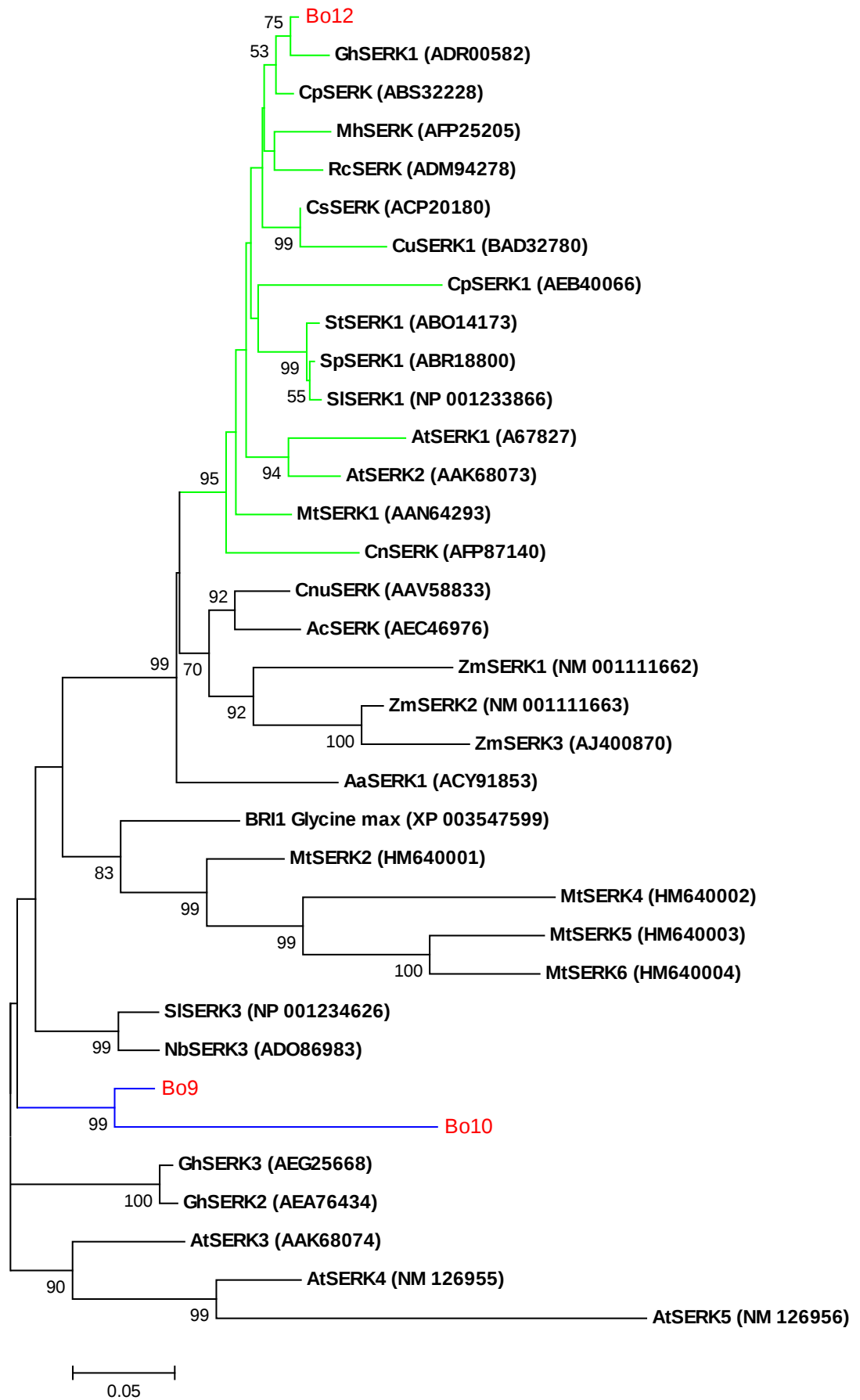


Figura 4. Inferência das relações filogenéticas entre homólogos da proteína SERK com base nas sequências parciais de aminoácidos deduzidas. Os diferentes homólogos foram alinhados e foi gerada uma matriz de distância para construção do cladograma por neighbor-joining. A barra indica 5 % de substituições não-sinônimas. Os números indicam valores de *Bootstrap*, em porcentagem (1000 repetições). São apresentados apenas os valores acima de 50 %. Os clones de *B. orellana* são destacados em vermelho e os ramos nos quais estão agrupados destacados de verde ('Bo12') ou azul ('Bo9' e 'Bo10'). As letras e números entre parênteses indicam o código de acesso no banco de dados do NCBI. GmSERK (*Gossypium hirsutum*); CpSERK (*Carica papaya*); MhSERK (*Malus hupehensis*); RcSERK (*Rosa canina*); CsSERK (*Citrus sinensis*); CitSERK (*Citrus unshiu*); CpSERK1 (*Cyclamen persicum*); StSERK1 (*Solanum tuberosum*); SlSERK3 (*Solanum lycopersicum*); SpSERK1 (*Solanum peruvianum*); AtSERK (*Arabidopsis thaliana*); MtSERK (*Medicago truncatula*); CnSERK (*Camellia nitidissima*); CnuSERK (*Cocos nucifera*); AcSERK (*Ananas comosus*); ZmSERK (*Zea mays*); AaSERK (*Araucaria angustifolia*); BR1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1); NbSERK3b (*Nicotiana benthamiana*).

Caracterização do padrão de expressão de *SERK* por hibridização in situ

Com a finalidade de explicar o possível papel fisiológico dos transcritos de *SERK* na planta foram realizados ensaios de hibridização in situ. A análise dos cortes histológicos hibridizados com a sonda anti-senso demonstrou sinal característico da expressão de *SERK* nos embriões zigóticos em tempo zero de indução (Figura 5A). Os transcritos de *BoSERK*-like se distribuíram uniformemente nas células da protoderme do embrião e foram observados no procâmbio (Figura 5A). Nenhuma resposta positiva foi observada nos tecidos dos embriões com vinte dias de indução, quando hibridizados com a sonda senso, apenas uma coloração enegrecida, referente ao acúmulo de compostos fenólicos (Figura 5B). Contudo, quando foi testada a sonda anti-senso em outra lâmina do mesmo material (vinte dias de indução) a coloração característica foi observada (Figura 5C). Embriões somáticos em estágio globular inicial foram fortemente marcados após trinta e dois dias de indução (Figura 5D). O sinal foi visto também na protoderme e no domo apical do embrião zigótico (Figura 5D). Aos cinquenta e dois dias, foram observados transcritos de *SERK* em embriões somáticos em diversas fases de desenvolvimento, desde aglomerados de células em proliferação a embriões em estágio cotiledonar (Figura 5E, F e G). Sinal mais fraco nos embriões somáticos em início de desenvolvimento a partir de células da protoderme na face adaxial e presença de compostos fenólicos no meristema fundamental do embrião zigótico (Figura 5E). Embriões globulares foram fortemente marcados com coloração

roxa (Figura 5F), enquanto mais baixo sinal de expressão é observado em embrião somático em estágio cotiledonar (Figura 5G).

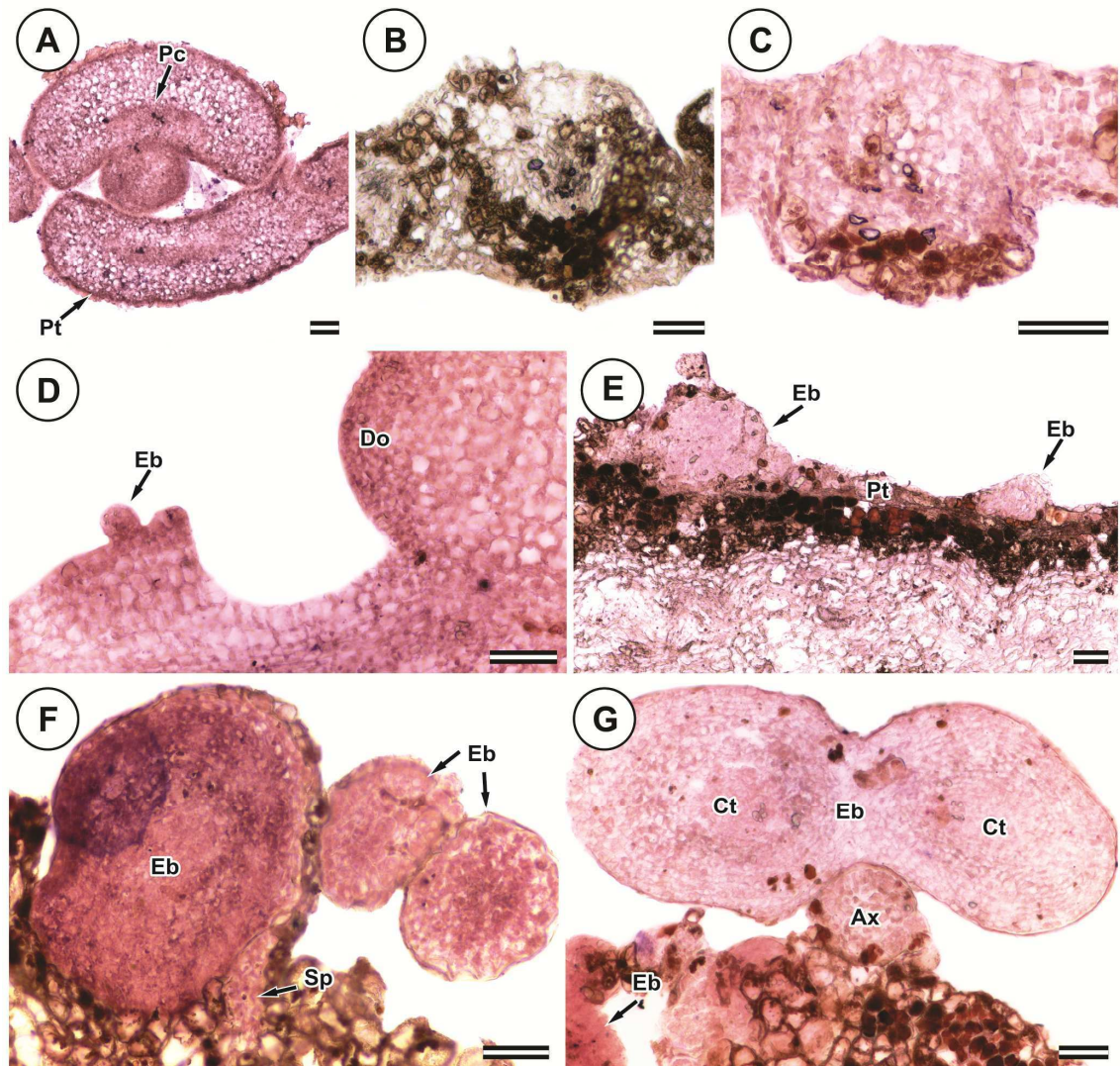


Figura 5. Localização dos transcritos do gene *SERK* por hibridização in situ em cotilédones de *B. orellana*. (A) Embrião zigótico em tempo zero (controle). (B) Embrião zigótico após 20 dias de indução, hibridizado com sonda senso (controle negativo). (C) Embrião zigótico após 20 dias de indução, hibridizado com sonda anti-senso. (D) Embriões somáticos (seta) e camada externa do domo apical do embrião zigótico. (E, F e G) Embriões somáticos após 52 dias de indução. Ax: Eixo cotiledonar; Eb: Embrião somático; Ct: cotilédone; Do: Domo apical; Sp: Suspensor; Pc: Procâmbio; Pt: Protoderme. Barras = 50 µm.

DISCUSSÃO

Auxina, estresse e embriogênese somática em *B. orellana*

A formação de embriões somáticos em *Bixa orellana* L. está relacionada com adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo, com a idade do embrião zigótico e é genótipo-dependente (Paiva Neto et al., 2003b). Apenas sob condições ideais células embriogênicas, determinadas geneticamente, irão se desenvolver e formar embriões em respostas a sinais específicos e ainda, nas células onde as condições fisiológicas são apropriadas (Guerra et al., 1998; 2001; Fehér, 2008). Esse fato, que inclui interação de fatores genéticos e fisiológicos explica porque em *B. orellana* e em outras espécies, apenas algumas células e genótipos são mais respondentes quando colocados nas mesmas condições de indução.

No presente estudo, foi observada a expressão de genes *SERK* durante indução da embriogênese somática em *B. orellana* em meio de cultivo contendo reguladores de crescimento. A presença desses reguladores no meio de cultivo é responsável pela ativação de diversos genes na planta, sendo aceito que estes desempenham um papel central na sinalização e na reprogramação de células somáticas para rota embriogênica (Jiménez, 2001; Fehér et al., 2003; Fehér, 2005). Entretanto, Pavlovic et al. (2012) observaram alta frequência de embriões somáticos obtidos no meio de indução tanto com 2,4-D quanto no meio com ausência do regulador.

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é amplamente utilizado como agente de sinalização celular por desempenhar o papel de auxina na planta (dependendo da concentração utilizada), atuando principalmente no controle da polaridade celular no início do desenvolvimento do embrião (Raghavan et al., 2006). A adição de auxinas endógenas ou mesmo o aumento da síntese de auxinas pela própria planta é responsável por alterações que induzem a embriogênese (Fehér, 2003; Nawy et al., 2008).

Em contrapartida, o uso de uma citocinina no meio indutor de embriogênese não é consenso entre as espécies e, normalmente é aplicada em combinação com auxina (Jiménez, 2001; Jiménez & Clément, 2006; Paim Pinto et al., 2011). A combinação de auxina com citocinina regulou positivamente a expressão de *MtSERK1* (Nolan et al., 2003). Em *B. orellana* foi necessária a aplicação de 4,52 μ M cinetina adicionada de 2,26 μ M 2,4-D para a obtenção das frequências mais altas de embriogênese somática direta a partir de embriões zigóticos imaturos (Paiva Neto et al., 2003b) e provavelmente, uma maior expressão de *SERK*.

A embriogênese somática em plantas é variável quanto ao tecido de origem. Pavlovic et al. (2012) observaram que os embriões somáticos em duas variedades de *Brassica oleracea* regeneram a partir de embriões zigóticos imaturos e observaram que embriões somáticos secundários são originados dos embriões primários. No presente estudo, foi possível visualizar que as alterações nos tecidos para formação de numerosos embriões somáticos ocorrem nos primeiros dias de cultivo no meio de indução com os reguladores de crescimento e somente em embriões zigóticos imaturos, não sendo, portanto vistas nos embriões zigóticos com idade avançada. Esses dados estão em concordância com os demais relatados na literatura onde é possível observar a grande variação quando comparamos a obtenção de embriões somáticos em diferentes culturas. Muñoz-Concha et al. (2012) obtiveram embriões somáticos em *Gomortega keule* a partir de embriões zigóticos maduros e segmentos do caule. Alta frequência de calos embriogênicos e embriões somáticos diferenciados foram observados por Paim Pinto et al. (2011) em diferentes genótipos de maracujazeiro. Rocha et al. (2012) notaram os primeiros embriões somáticos em *Passiflora cincinnata* a partir da superfície abaxial de cotilédones de embriões zigóticos maduros.

A desdiferenciação das células epidérmicas de *B. orellana* e conseguinte formação de embriões somáticos podem ser explicadas por uma possível condição de estresse a qual os explantes foram submetidos. Considerando que a quantidade de 2,4-D pode ser tóxica para determinados tecidos ou plantas, as alterações que ocorrem nessas células podem ser justificadas pelo estresse (Zavattieri et al., 2010). Esse estresse causa modificações no equilíbrio hormonal normal das células e faz com que estas saiam de um estado completamente diferenciado e retomem a atividade meristemática, denotando a plasticidade do hormônio nas plantas (Fehér, 2003; Zavattieri et al., 2010; Pandey et al., 2012; Rahman, 2013).

Além dos fatores listados, uma nova perspectiva tem sido considerada mutuamente atuante no processo de ativação/silenciamento de genes envolvidos na embriogênese somática: o remodelamento da cromatina (Fehér, 2008; Pandey et al., 2012). A atuação dessas duas vias em conjunto, ou seja, a ativação de um gene sinalizada por um agente externo pode causar o silenciamento de genes responsáveis pelo remodelamento da cromatina. Uma consequência desse processo é a ativação de rotas de genes de embriogênese somática (Fehér, 2008; Rose et al., 2010; Zavattieri et al., 2010; Pernisová et al., 2011; Pandey et al., 2012; Rocha & Dornelas, 2013).

Ativação/silenciamento gênicos são observados nas células somáticas que adquirem competência embriogênica durante o período de indução (Rocha & Dornelas, 2013). Normalmente essas células percebem sinais externos, muitas vezes de células vizinhas, podendo ser proteínas de parede celular ou nutrientes presentes no meio de cultivo, como o Boro (Pandey et al., 2012). O Boro é um nutriente essencial na síntese e organização da parede celular e estrutura da membrana plasmática (Brown & Hu, 1997; Pandey et al., 2012) e está envolvido na indução de embriogênese somática através da sinalização de rotas via estresse (Pandey et al., 2012).

Expressão de genes *SERK* durante a embriogênese somática

Dentre os diversos genes que são considerados chaves para o início da embriogênese somática em plantas em resposta a sinais externos, os membros da família multigênica de receptores semelhante à quinases (RLKs), *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* desempenham papel relevante na aquisição de competência embriogênica e já foram caracterizados em diversas espécies de plantas (Schmidt et al., 1997; Somleva et al., 2000; Baudino et al., 2001; Hecht et al., 2001; Nolan et al., 2003; 2009; 2011). No presente trabalho foi analisada a expressão do gene na indução da embriogênese somática para testar a função de marcador de embriogênese durante o cultivo in vitro.

Neste estudo, através da hibridização in situ, foi possível notar a presença dos transcritos de *SERK* tanto nos embriões zigóticos imaturos (tempo zero) quanto nos embriões somáticos nas diversas fases de desenvolvimento (desde globular a cotiledonar) de *B. orellana*. Contudo, o sinal decresceu de forma gradativa dos embriões mais jovens para os mais adiantados no desenvolvimento. Esse fato demonstra que a expressão de *SERK* em urucum pode estar relacionada não somente com embriogênese, mas também pode desempenhar função no desenvolvimento e crescimento da planta.

Os resultados encontrados no presente trabalho são comparados, de certa forma, àqueles encontrados para *Citrus sinensis* cv. 'Valencia' (Ge et al., 2010), onde foi observada a marcação característica de *SERK* de forma moderada nos embriões somáticos em transição da fase cordiforme para torpedo e um sinal mais fraco nos embriões globulares. Também foi observado sinal nas células vasculares, tanto de embriões quanto de outros tecidos da planta (Ge et al., 2010). Em *Arabidopsis*, Kwaaitaal & de Vries (2007), notaram a marcação de *AtSERK1* nas células mais jovens do procâmbio, o que sugere a expressão do gene na população de células TA (*Transit*

Amplifying) (Sthal & Simon, 2005). Savona et al. (2012), relataram que em ciclame (*Cyclamen persicum*) *CpSERK1* e *CpSERK2* são expressos tanto durante a embriogênese quanto na organogênese in vitro, e estão envolvidos na formação dos embriões somáticos e de órgãos e com sua expressão persistindo no meristema dos embriões e dos órgãos.

Os resultados obtidos com *B. orellana* não estão em plena concordância os resultados alcançados em *Daucus carota* (Schmidt et al., 1997), *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000) ou *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001). Isso reflete a alta plasticidade do gene *SERK*, pois apesar de codificar proteínas com domínios tão conservados entre as diferentes espécies de eudicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas, é expresso de maneira diferenciada, de acordo com a condição fisiológica submetida (Steiner et al., 2012).

Comparação entre BoSERK-like e SERK de outras espécies

A análise das sequências parciais indicou o isolamento de possíveis ortólogos de genes *SERK* expressos durante a indução de embriogênese somática de *B. orellana*. Avaliações posteriores levaram à conclusão de se tratar da expressão do gene *SERK*. Até onde se sabe, com base em buscas nos bancos de dados específicos, esse é o primeiro relato da ocorrência da expressão de genes da subfamília *SERK* nesta espécie.

Com esse resultado preliminar, pode-se sugerir também a utilização desse gene como marcador de embriogênese somática em *B. orellana*, assim como em outras espécies de eudicotiledôneas (Schmidt et al., 1997; Santos et al., 2005; Pérez-Núñez et al., 2008; Ge et al., 2010; Kedong et al., 2011) e monocotiledôneas (Baudino et al., 2001; Somleva et al., 2000).

As sequências parciais de proteínas analisadas de *B. orellana* revelaram alta similaridade com os domínios conservados de outras proteínas *SERK* depositadas no banco de dados do NCBI (Figura 3). Assim como nas outras proteínas caracterizadas, notou-se uma organização bem distinta. Os domínios ricos em leucina apresentaram alta identidade com os de outras proteínas *SERK*, assim como os domínios transmembrana e quinase. Contudo, formou-se um grupo no qual existe uma inserção de dez aminoácidos próximos da região rica em prolina (SPP) e um grupo no qual estes dez aminoácidos estão ausentes.

O grupo que contém na sua sequência a inserção dos dez aminoácidos é formado por membros *SERK* ou *SERK1*, de diversas espécies de planta e, em todos os relatos

estão envolvidos com embriogênese. Uma exceção nesse grupo é a presença de AtSERK2 que, apesar de ser diferente agrupa-se com os membros supracitados. A explicação mais coerente para este fato é que *AtSERK1* e *AtSERK2* codificam proteínas que compartilham mais de 90 % de similaridade em suas sequências e desempenham função redundante na determinação do destino celular durante o desenvolvimento da antera em *Arabidopsis* (Albrecht et al., 2005; Colcombet et al., 2005). Em *Cyclamen persicum*, o alinhamento das sequências das proteínas CpSERK1 e CpSERK2 também apresentou alta similaridade, o que pode indicar redundância funcional entre elas quando comparado com outras proteínas SERK(s) (Savona et al., 2012).

A inserção dos dez aminoácidos nas sequências das proteínas que fazem parte desse grupo pode exercer influência na rota de transdução de sinais intensificando ou ajudando a promover a indução de embriogênese somática por proporcionar, por exemplo, um diferente sítio de ligação para moléculas sinais ou mesmo ajudar na interação proteína-proteína permitindo um melhor ajustamento durante a formação de homo ou heterodímeros. Entretanto, seriam necessários estudos mais refinados com mutantes, nos quais esses nucleotídeos fossem deletados e os fenótipos obtidos, avaliados.

O outro grupo observado pelo alinhamento das sequências de aminoácidos compreende as demais proteínas SERK3/4/5/6. Nessas proteínas, a ausência dos aminoácidos foi evidenciada pela inserção de *gaps* para o melhor ajuste do alinhamento.

A topologia da árvore filogenética confirmou uma provável influência da inserção dos aminoácidos no agrupamento das proteínas por grupos funcionais. Assim, os membros de SERK, SERK1/2 agruparam em um ramo distinto dos membros SERK3/4/5/6 (Nolan et al., 2011). Essas proteínas tendem a formar grupos evolucionariamente relacionados de acordo com a função, como visto em *Arabidopsis* (*AtSERK1/2* e *AtSERK3/4/5*) (Albrecht, 2008; Nolan et al., 2011) e *Cyclamen* (*CpSERK1/2*) (Savona et al., 2012).

Os clones de *B. orellana* seguiram comportamento semelhante às demais proteínas, de forma que 'Bo12' pareou-se no mesmo ramo com os membros SERK, SERK1 de outras espécies e com SERK2 (*A. thaliana*). Os clones 'Bo9' e 'B10' agruparam-se em outro ramo, o qual reunia os demais membros SERK(s) (Figura 4). Com esse resultado, pode-se inferir que em *B. orellana* estão presentes ao menos três cópias distintas de *SERK*, pois apesar de os clones 'Bo9' e 'B10' estarem agrupados em um mesmo ramo, a diferença do comprimento dos ramos sugere que podem se tratar de

dois alelos ou membros distintos de *SERK*. Estudos posteriores para caracterização dos clones poderão confirmar exatamente quais são esses membros.

Através da observação da árvore filogenética é possível notar diferentes membros das proteínas agrupados em ramos diferentes, como por exemplo, *A. thaliana*, *M. truncatula* e *G. hirsutum* (Figura 4). Esse arranjo das proteínas na árvore também foi observado por Santos et al. (2005) e, segundo os autores, isso indica a ocorrência de eventos de duplicação gênica antes da divisão dessas espécies gerando diferentes cópias de *SERK*.

Outro fato que confirma essa análise é a topologia da árvore que dispôs as sequências de mono, eudicotiledôneas e gimnosperma em três ramos distintos, apesar de apenas uma espécie de gimnosperma ter sido adicionada no estudo (Steiner et al., 2012). Isso é uma forte indicação de que *SERK* tem funções conservadas entre as diferentes espécies e que os eventos de duplicação causaram alterações nas sequências nucleotídicas e, por consequência, em alguns aminoácidos.

Os resultados obtidos nesse trabalho levam à conclusão de que o processo de embriogênese somática em *B. orellana* é bastante complexo, sendo desencadeado inicialmente pela adição de reguladores de crescimento, principalmente 2,4-D, que podem funcionar como moléculas sinalizadoras ao início da indução. Possivelmente, esses sinais externos são reconhecidos por proteínas transmembranares específicas, as quais participam de rotas de transdução de sinais e ativam outras proteínas internamente nas células.

Entre as funções desempenhadas por essas proteínas, no presente estudo pode-se ressaltar que as mais prováveis são as de marcadores de embriogênese zigótica e somática. Foram observados três membros da família *SERK* e, de acordo com as análises das sequências de nucleotídeos, esses membros apresentam características distintas nas suas sequências. Estudos posteriores promoverão um entendimento nos mecanismos da regulação da expressão gênica na embriogênese somática da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, C.; RUSSINOVA, E.; HECHT, V.; BAAIJENS, E.; de VRIES, S.C. The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. **The Plant Cell**, 17:3337-3349, 2005.
- ALBRECHT, C.; RUSSINOVA, E.; KEMMERLING, B.; KWAAITAAL, M.; de VRIES, S.C. Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve Brassinosteroid-dependent and independent signaling pathways. **Plant Physiology**, 148:611-619, 2008.
- ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25:3389-3402, 1997.
- BAUDINO, S.; HANSEN, S.; BRETTSCHEIDE, R.; HECHT, V.F.G.; DRESSELHAUS, T.; LORZ, H.; DUMAS, C.; ROGOWSKY, P.M. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. **Planta**, 213:1-10, 2001.
- BEN MAHMOUD, K.; DELPORT, F.; MUHOVSKI, Y.; ELLOUMI, N.; JEMMALI, A.; DRUART, P. Expression of *PiABP19*, *Picdc2* and *PiSERK3* during induction of somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). **Molecular Biology Reports**, 40:1569-1577, 2013.
- BROWN, P.H.; HU, H. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? **Plant and Soil**, 196:211–215, 1997.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, 29:887-895, 2005.
- COLCOMBET, J.; BOISSON-DERNIER, A.; ROS-PALAU, R.; VERA, C.E.; SCHROEDER, J.I. *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. **Plant Cell**, 17:3350-3361, 2005.

CRUZ, A.C.F.; COSTA, M.G.C.; OTONI, W.C. Aspectos gerais da cultura e beneficiamento da semente do urucum. In: STRINGHETA, P.C.; SILVA, P.I. (eds.) **Pigmentos de Urucum: Extração, reações químicas, usos e aplicações**. Viçosa, 166p. 2008.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, 48:1493-1509, 1997.

D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37:168-172, 2001.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32:1792-1797, 2004.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74:201-228, 2003.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJID, A.; SAMAJ, J. (Eds). **Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs**. Springer: Berlin/Heidelberg, 2:85-101, 2005.

FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**, 52:53-56, 2008.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 39:783-791, 1985.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p. 2002.

FRANCO, C.F.O. Mercado **de urucum (*Bixa orellana* L.) no Brasil**. EMEPA – Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A. Governo do Estado da Paraíba. 2003. Disponível em <http://www.emepa.org.br/urucum_mercado.php>. Acesso em 26 jun. 2012.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50:151-158, 1968.

GE, X.-X.; FAN, G.-E.; CHAI, L.-J.; GUO, W.-W. Cloning, molecular characterization and expression analysis of a *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* gene (*CitSERK1-like*) in Valencia sweet orange. **Acta Physiologiae Plantarum**, 32:1197–1207, 2010.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa, Brasília. Vol. 2, pp. 533-568, 1998.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.; DUCROQUET J. P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 13:117-128, 2001.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127:803-816, 2001.

HU, H.; XIONG, L.; YANG, Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. **Planta**, 222:107-117, 2005.

HUANG, X.; LU, X.Y.; ZHAO, J.T.; CHEN, J.K.; DAI, X.M.; XIAO, W.; CHEN, Y.P.; CHEN, Y.F.; HUANG, X.L. *MaSERK1* gene expression associated with somatic embryogenic competence and disease gesistance response in banana (*Musa* spp.). **Plant Molecular Biology Reporter**, 28:309-316, 2010.

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13:196-223, 2001.

JIMÉNEZ, V.M.; CLÉMENT, T. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Monographs** (2), Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Published online, 2006.

- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, 8:275-282, 1992.
- JOSEPH, N.; SIRIL, E.A.; NAIR, G.M. An efficient in vitro propagation methodology for Annatto (*Bixa orellana* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 17:263-270, 2011.
- KEDONG, X.; QINGLIN, L.; HUIFANG, Y.; LI, Z.; LILI, D.; FENGLUAN, L.; LING, B.; NAN, M.; LIANGJUN, Z. Isolation and molecular characterization of *RcSERK1*: A *Rosa canina* gene transcriptionally induced during initiation of protocorm-like bodies. **African Journal of Biotechnology**, 10:4011-417, 2011.
- KISELEV, K.V.; TCHERNODED, G.K. Somatic embryogenesis in the *Panax ginseng* cell culture induced by the *rolC* oncogene is associated with increased expression of *WUS* and *SERK* genes. **Russian Journal of Genetics**, 45:445-452, 2009.
- KWAAITAAL, M.A.C.J.; de VRIES, S.C. The *SERK1* gene is expressed in procambium and immature vascular cells. **Journal of Experimental Botany**, 58:2887-2896, 2007.
- MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular characterization of a *SERK* gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reports**, 30:195–203, 2012.
- MAHENDRANATH, G.; VENUGOPALAN, A.; PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Annatto pigment production in root cultures of Achiote (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106:517-522, 2012.
- MUÑOZ-CONCHA, D.; MAYES, S.; RIBAS, G.; DAVEY, M.R. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and shoot-tips of the Chilean tree *Gomortega keule*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109:123-130, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-479, 1962.

NAWY, T.; LUKOWITZ, W.; BAYER, M. Talk global, act local – patterning of *Arabidopsis* embryo. **Current Opinion in Plant Biology**, 11:28-33, 2008.

NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, 133:218-230, 2003.

NOLAN, K.E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R.J. Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, 60:1759-1771, 2009.

NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Characterisation of the legume *SERK-NIK* gene superfamily including splice variants: Implications for development and defence. **BioMed Central Plant Biology**, 11:44, 2011.

PAIM PINTO, D.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107:521-530, 2011.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:159-167, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 39:629-634, 2003b.

PANDEY, D.K.; SINGH, A.K.; CHAUDHARY, B. Boron-mediated plant somatic embryogenesis: a provocative model. **Journal of Botany**. DOI: 10.1155/2012/375829, 2012.

PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105:285-290, 2011a.

PARIMALAN, R.; VENUGOPALAN, A.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Bixa orellana* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105:317-328, 2011b.

PAVLOVIĆ, S.; VINTERHALTER, B.; ZDRAVKOVIĆ-KORAĆ, S.; VINTERHALTER, D.; ZDRAVKOVIĆ, J.; CVIKIĆ, D.; MITIĆ, N. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 113:397-406, 2012.

PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZUNIGA-AGUILAR, J.J.; ORPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of this expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, 28:11-19, 2008.

PERNISOVÁ, M.; KUDEROVÁ, A.; HEJÁTKO, J. Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. **Current Protein & Peptide Science**, 12:137-147, 2011.

PINHEIRO, A.L.; ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, 1:31-35, 1992.

RAGHAVAN, C.; ONG, E.K.; DALLING, M.J.; STEVENSON, T.W. Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. **Functional and Integrative Genomics**, 6:60-70, 2006.

RAHMAN, A. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiologia Plantarum**, 147:28-35, 2013.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, 249:747-758, 2012.

ROCHA, D.I.; DORNELAS, M.C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews**, 8:1-17, 2013.

ROSE, R.J.; MANTIRI, F.R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S.-K.; WANG, X.-D.; NOLAN, K.E.; SHEAHAN, M.B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: PUA, E.-C.; DAVEY, M.R. (Eds.) **Plant developmental biology-biotechnological perspectives**, vol 2. Springer:Heidelberg, pp 3-26, 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4:406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2344p, 2001.

SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; YOTOKOC, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIASA, B.B.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, 168:723-729, 2005.

SAVONA, M.; MATTIOLI, R.; NIGRO, S.; FALASCA, G.; DELLA ROVERE, F.; COSTANTINO, P.; De VRIES, S.; RUFFONI, B.; TROVATO, M.; ALTAMURA, M.M. Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. **Journal of Experimental Botany**, 63:471-480, 2012.

SCHMIDT, E.D.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.; DE VRIES, S.C.A. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, 124:2049-2062, 1997.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 38:186-190, 2002.

SHARMA, S.K.; MILLAM, S.; HEIN, I.; BRYAN, G.J. Cloning and molecular characterization of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. **Planta**, 228:319-330, 2008.

SHIMADA, T.; HIRABAYASHI, T.; ENDO, T.; FUJII, H.; KITA, M.; OMURA, M. Isolation and characterization of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* gene homologue (*CitSERK1*) from *Citrus unshiu* Marc. **Scientia Horticulturae**, 103:233-238, 2005.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Science's Signal Transduction Knowledge Environment**, 113:22, 2001.

SIRIL, N.E. JOSEPH, N. Micropropagation of annatto (*Bixa orellana* L.) from mature tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants with RAPD markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 19:147-155, 2013.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.; DE VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Reports**, 19:718-726, 2000.

STAHL, Y.; SIMON, R. Plant stem cell niches. **International Journal of Developmental Biology**, 49:479-489, 2005.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; GUERRA, M.P.; CUTRI, L.; DORNELAS, M.C.; FLOH, E.I.S. A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1* (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109:41-50, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28:2731-2739, 2011.

THOMAS, C.; MEYER, D.; HIMBER, C.; STEINMETZ, A. Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42:35-42, 2004.

VALDEZ-OJEDA, R.; HERNÁNDEZ-STEFANONI, J.L.; AGUILAR-ESPINOSA, M.; RIVERA-MADRID, R. Assessing morphological and genetic variation in annatto (*Bixa orellana* L.) by sequence-related amplified polymorphism and cluster analysis. **HortScience**, 43:2013-2017, 2008.

YANG, C.; ZHAO, T.; YU, D.; GAI, J. Isolation and functional characterization of a *SERK* gene from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Plant Molecular Biology Reporter**, 29:334-344, 2011.

ZAVATTIERI, M.A.; FREDERICO, A.M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Plant Biotechnology**, 13:1. DOI: 10.2225, 2010.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, 5:1141-1423, 1993.

CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho foi observado que os primeiros embriões somáticos de *Bixa orellana* originaram-se a partir de embriões zigóticos imaturos após vinte dias de inoculação em meio de indução. Aos dez dias de cultivo, foram observadas proliferações celulares no eixo embrionário e nos cotilédones do embrião zigótico. As alterações anatômicas observadas no meristema fundamental e na protoderme culminaram na formação dos embriões somáticos.

Cordões de compostos fenólicos limitaram as regiões de desenvolvimento de embriões somáticos, os quais estavam presentes em toda a superfície do embrião zigótico após cinquenta e dois dias de cultivo. Polissacarídeos estavam presentes no embrião zigótico no tempo zero e sua diminuição foi notada no decorrer do processo. Compostos lipídicos foram notados no explante aos 20 dias e corpos proteicos foram evidenciados após 15 dias de indução e continuaram sendo observados até 52 dias de cultivo.

O estudo de clonagem e caracterização de genes *SERK* envolvidos na embriogênese somática de *Bixa orellana* permitiu isolar três possíveis membros dessa família que estão envolvidos em diversas funções de desenvolvimento da planta. As sequências de aminoácidos das proteínas *SERK* de *B. orellana* apresentam alta similaridade com as de outras plantas, o que reforça a hipótese de que as funções são conservadas entre as espécies. Estudos de hibridização *in situ* demonstraram resposta positiva tanto nos tecidos do embrião zigótico quanto nos embriões somáticos em desenvolvimento.

Os resultados apresentados nesse trabalho compõem informações importantes a respeito do processo de embriogênese somática do ponto de vista anatômico e histoquímico, além de contribuir com o primeiro registro da expressão de genes *SERK* para *B. orellana*, o que pode ser utilizado para subsidiar futuros estudos de expressão com mutantes.