



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL E
EXPRESSÃO DE RESVERATROL SINTASE EM
ESPÉCIES DE *ARACHIS*

PAULA ANDRÉA S. DE VASCONCELOS CARVALHO

BOTUCATU-SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL E EXPRESSÃO
DE RESVERATROL SINTASE EM ESPÉCIES DE
ARACHIS

MESTRANDA: PAULA ANDRÉA S. DE VASCONCELOS CARVALHO

ORIENTADOR: DR. MARCOS A. GIMENES

CO- ORIENTADORA: DRA. ANA CRISTINA M. BRASILEIRO

CO- ORIENTADORA: DRA. TÂNIA AGOSTINI S. COSTA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, AC: Genética.

BOTUCATU-SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Carvalho, Paula Andréa Sampaio de Vasconcelos.

Concentração de resveratrol e expressão da *resveratrol sintase* em espécies de *Arachis* / Paula Andréa Sampaio de Vasconcelos Carvalho. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Aparecido Gimenes

Coorientador: Ana Cristina Miranda Brasileiro

Coorientador: Tânia Agostini Silveira Costa

Capes: 20203004

1. Leguminosa. 2. Fitoalexina. 3. Botânica – Classificação. 4. Plantas – Resistência. 5. Variação (Biologia).

Palavras-chave: *Arachis*; Expressão relativa; Resveratrol; *Resveratrol sintase*.

Dedico meu mestrado e tudo
mais o que conseguir nessa
vida aos meus pais Paulo e
Márcia.

Agradecimentos

Agradeço,

A Deus, que me ungiu, inspirou e me deu todas as oportunidades para realizar meu sonho.

Aos meus pais, que me deram o exemplo do estudo e do trabalho, que comigo sonharam os meus sonhos, e com as suas orações me fortaleceram e mostraram o caminho a seguir, me cobrindo de amor mesmo na distância. Agradeço às minhas irmãs Rafaella e Marina, minha tia Marcília, meus avós Maria José, Martinho Rodrigues, Raimundo Sampaio e Teresa Aragão, pela presença forte na minha vida e pela torcida sempre tão intensa.

Ao meu esposo Tiago, que fez da realização do meu sonho uma prioridade em sua vida, casando com a mestrandia e com o mestrado, dando todo o apoio e carinho necessários para a concretização deste projeto. Obrigada, meu amor, por ser o meu companheiro de todos os momentos, pelo incentivo, dedicação, compreensão, e esforço. Sem você eu não conseguiria! Te amo!

Ao meu orientador, Professor Marcos Aparecido Gimenes, por ser o grande responsável por tudo que aprendi nesses dois anos. Agradeço-o por todos os caminhos apresentados, pela paciência com que sempre me tratou e pelo otimismo que me fez crer tudo isso ser possível. Pelos ensinamentos de quem, mesmo doutor, será sempre meu Mestre.

À minha co-orientadora, Ana Cristina Miranda Brasileiro, por ser uma profissional tão dedicada e exemplar. Pela amizade, paciência, e todo conteúdo de biologia molecular ensinado.

À minha co-orientadora, Dra. Tânia Agostini Costa, também exemplo de profissionalismo, que com carinho, paciência, zelo e atenção me ensinou cada passo no laboratório.

À UNESP, em nome da professora Cláudia Rainho, sempre muito prestativa e dedicada à pós graduação de Genética, dando o acolhimento e o suporte necessários para a minha carreira de pesquisadora.

À Embrapa Cenargen, pela estrutura dada a mim para a pesquisa e desenvolvimento deste mestrado.

Aos profissionais da Embrapa Cenargen, fundamentais para a realização deste trabalho: Soraya Bertioli, David Bertioli, Ana Cláudia Guerra, Patrícia Guimarães, Leonardo, Francisco Valls, Adriana Custódio, Antonieta Salomão, Solange, Juliano Pádua, Leandro, Ismael, Rosa Mundim, Rosa de Belém, Ana Paula, Cláudia, Leonel, Márcio Moretson, Joseane Padilha.

Ao laboratório LPP3, que me acolheu e proporcionou muito mais que subsídios profissionais, ofereceu amizade e companheirismo. Obrigada Larissa Guimarães, Larissa Muniz, Thaís, Amanda, Andressa, Ana Luíza, Lílían, Lígia, Igor, Raquel, Karyne, Bruna, Uiara, Lorena, Maurício, Carolzinha, Isadora.

Às amigas feitas através do mestrado: Amanda, Andressa, Lígia, Marcela, Talita, Robertinha e Gabriela; bem como aos amigos de toda a vida da minha cidade de Teresina.

Aos meus formadores Sérgio Valente, Ângela Celis, Ingrid Sene, referências de compromisso e profissionalismo para mim, de modo que tudo o que eu conquistar na carreira de bióloga será dedicado a eles.

Ao meu grande e eterno companheiro de reuniões científicas, sejam elas em Teresina, em Brasília ou no Japão: Bráulio Fernandes de Carvalho, por ser o meu companheiro de sonhos, objetivos e saudades.

Este sonho não se realiza com a conquista do título, mas já se realizava todos os dias em que vivi este projeto, em cada novo aprendizado, a cada nova pessoa que conhecia, a cada experiência que dava certo, em cada pequena vitória. Meu sonho se realizou todos os dias durante esses dois anos.

Resumo

O resveratrol é uma fitoalexina produzida em função de estresses bióticos e abióticos e foi encontrado em um número limitado de espécies de plantas, incluindo o amendoim (*Arachis hypogaea*) e seus parentes silvestres. Este tem também propriedades antioxidantes e em função disso é um promissor antitumoral, cardioprotetor e neuroprotetor. O amendoim é um alotetraploide de constituição genômica AB sendo *A. ipaënsis* e *A. duranensis* os doadores de seus genomas B e A, respectivamente. Estudos prévios demonstraram que algumas espécies silvestres do gênero *Arachis* produzem resveratrol e que ampla variabilidade genética para diferentes características existe entre acessos das espécies silvestres, incluindo ampla variação nos níveis de resistência a doenças fúngicas e nematoides. Portanto, a avaliação de um maior número do gênero e a investigação da variação da produção de resveratrol também entre acessos é fundamental para uma exploração mais adequada das espécies silvestres do gênero *Arachis*. O melhor entendimento das causas da variação na produção de resveratrol sem dúvida contribuirá para o uso das mesmas e o primeiro passo para esse entendimento sem dúvida passa pela identificação do padrão de expressão da *resveratrol sintase* (RS). Este trabalho tem como objetivos avaliar a variação na produção de resveratrol entre espécies (*A. hypogaea*, *A. stenosperma*, *A. valida*, *A. williamsii*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e um anfidiplóide sintético proveniente do cruzamento artificial entre *A. duranensis* e *A. ipaënsis*) e entre acessos de duas espécies (*A. hypogaea* e *A. stenosperma*) por meio de HPLC e avaliar a expressão relativa da *resveratrol sintase* por meio de RT-qPCR em *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e um anfidiplóide sintético. Folhas foram coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação para os grupos teste e controle e três repetições biológicas foram produzidas para cada espécie avaliada. A síntese de resveratrol em folhas foi induzida por tratamento com UV por 2 horas e trinta minutos e posteriormente foi observada variação da concentração de resveratrol entre as espécies e entre os acessos e cultivares de uma mesma espécie. A variação no teor de resveratrol inter e intraespecífica demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados, pois deixa claro que potencialmente todas as espécies da seção produzem resveratrol e que existe ampla variação intraespecífica. O estudo do papel da *resveratrol sintase* em espécies silvestres foi realizado comparando-se os níveis de expressão relativa RS, avaliados por meio de RT-qPCR, com os teores de resveratrol, medidos por HPLC. Foram testados nove pares

de *primers* e destes quatro tiveram expressão aumentada em função do tratamento com UV. Destes quatro, apenas dois (RSArAsT14 e RSAsAs2) identificaram alelos cujos níveis de expressão em todas as amostras analisadas dos quatro genótipos eram similares permitindo o agrupamento das mesmas na análise de componente principais. Os resultados demonstram que existe elevada variação na produção de resveratrol entre espécies da seção *Arachis* e que espécies silvestres de *Arachis* são, sem dúvida, uma fonte de alelos para uma maior produção de resveratrol no amendoim cultivado o que pode resultar no aumento da resistência a estresses abióticos e bióticos, bem como no aumento o seu valor nutricional.

Palavras chave: Resveratrol, *Arachis*, expressão relativa, *resveratrol sintase*

Abstract

Resveratrol is a phytoalexin produced under biotic and abiotic stresses. It has been found in a restricted number of plant species including peanut (*Arachis hypogaea*) and its wild relatives. This phytochemical has antioxidant properties, being considered a promising antitumour, cardioprotective and neuroprotective agent. Peanut is an allotetraploid specie with an AABB genomic constitution. *Arachis ipaënsis* and *A. duranensis* are the donors of the B genome and the A genome, respectively. Previous studies have shown that wild species of the genus *Arachis* can produce resveratrol. Therefore, the evaluation of other species of this genus and the analysis of the variation in the production of resveratrol between accessions is essential for better exploitation of wild species in the genus *Arachis*. It is also important the understanding of the variation in resveratrol concentration between species and accessions and that could be reached through the better understanding of the role resveratrol synthase. . The aims of this work were to evaluate the variation in resveratrol production between species (*A. hypogaea*, *A. stenosperma*, *A. valida*, *A. wiliamsii*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* and in a synthetic amphidiploid derived from these two wild species *A. duranensis* and *A. ipaënsis*) and between accessions of the same specie (*A. hypogaea* and *A. stenosperma*) through HPLC, and to quantify the expression of resveratrol synthase by RT-qPCR in *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* and in a synthetic amphidiploid. Leaves for the test and control groups were collected from plants cultivated in a greenhouse and three biological replicates were evaluated for each specie. The synthesis of resveratrol in leaves was induced by treatment with UV for 2 hours and thirty minutes and then the difference in the concentration of resveratrol between species and between the accessions and cultivars of the same species was analyzed. We found new species that synthesize resveratrol and variation between accessions, what highlights the need for more detailed studies concerning the genus *Arachis*. The results allowed the identification of one allele involved in the resveratrol synthesis that was induced by the UV treatment and that was related to resveratrol production. We concluded that there is a high variation in the resveratrol produced between species *Arachis* and that wild species could be an excellent source of alleles to achieve a higher resveratrol production in the cultivated peanut that could improve resistance to abiotic and biotic stress and increase its nutritional value.

Key words: Resveratrol, *Arachis*. relative expression, *resveratrol synthase*

Lista de Figuras

Figura 1- Produção das principais oleaginosas cultivadas no mundo, nas safras de 2008 a 2011 (USDA-FAS, 2011).....21

Figura 2- Esquema da biossíntese do resveratrol (biossíntese mista). As enzimas apresentadas nessas vias são as seguintes: PAL, phenilalanina amonia-liase; C4H, cinamato-4-hidroxilase; 4CL, 4-cumaroil: CoA-liase; CHS, chalcona sintase; STS, estilbeno sintase (Vannozzi *et al.*, 2012).....27

Figura 3- Árvore filogenética obtida utilizando-se sequências de DNA dos fragmentos gerados a partir da amplificação com pares de *primers* degenerados para RS e DNAs de seis espécies de *Arachis* e um anfidiplóide sintético (*A. hypogaea*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *A. magna*, *A. stenosperma*, *A. ipaënsis*, *A. ipaënsis* X *A. duranensis*).....30

Figura 4- Esquema de coleta, indução e armazenamento das folhas de *A. hypogaea*, *A. stenosperma*, *A. valida*, *A. williamsii*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e anfidiplóide. Cultivo das plantas (A), foram utilizadas folhas de 15 plantas de cada genótipo (B), distribuição randômica das folhas em bandejas com papel germitest, algodão e água (C), tratamento com UV por 2 h e 30 min (D), folhas em repouso por 15hs (E), amostras separadas em tubo falcon contendo 1g de folha (F), acondicionamento em freezer -80°C (G).....36

Figura 5- Cromatogramas de extratos obtidos de folhas de *A. stenosperma* acesso V3712 controle e tratado. Na Figura 5A pode ser observado o cromatograma da amostra não tratada com UV, na qual apenas é observado o pico da fenolftaleína (**) e na 5B o cromatograma da amostra tratada com os picos de resveratrol* e de fenolftaleína**.....45

Figura 6- Média das concentrações de resveratrol encontradas em folhas de quatro cultivares de *A. hypogaea* submetidas ao UV.....47

Figura 7- Médias das concentrações de resveratrol encontradas em folhas induzidas por UV de quatro diferentes acessos de *A. stenosperma*.....48

Figura 8- Médias das concentrações de resveratrol encontradas em folhas induzidas por UV de quatro diferentes espécies da seção *Arachis*, do gênero *Arachis*.....49

Figura 9 - Concentração de resveratrol encontrada em folhas induzidas por UV em acessos de espécies de genoma AA (*A. stenosperma*, 6 acessos analisados), genoma BB (*A. valida*, 1 acesso analisado, *A. williamsii*, 1 acesso analisado) e AB (*A. hypogaea*, 1 acesso analisado).....50

Figura 10- Concentração de resveratrol em folhas de *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, anfidiplóide e *A. hypogaea* (runner) submetidas à radiação UV. As legendas “a”, “b”, e “c” demonstram que houve diferença significativa entre os grupos que as contêm. ...52

Figura 11- Gel não desnaturante de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, contendo RNA total de folha de *A. ipaënsis* e *A. duranensis* (1µL de RNA total/poço). Amostras no gel: M - Marcador molecular (1Kb Plus – Invitrogen); amostras de 1 a 3 - amostras de *A. ipaënsis* tratadas com UV do segundo experimento biológico; amostras de 4 a 6 - amostras *A. ipaënsis* não tratadas com UV do segundo experimento biológico; amostras de 7 a 8 - amostras de *A. duranensis* tratadas com UV do segundo experimento biológico.....54

Figura 12- Gel não desnaturante de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR onde foram testadas amostras de cDNA sintetizadas. Amostras de 1 a 3 - produtos de PCR que tiveram como molde cDNA de anfidiplóide não tratado com UV do terceiro experimento biológico; amostras de 4 a 6 - produtos de PCR que tiveram como molde cDNA de anfidiplóide tratado com UV do terceiro experimento biológico; amostra 7 - controle no qual foi utilizado DNA genômico; amostras 8 - controle com cDNA de qualidade já conhecida; amostra 9 - controle sem cDNA molde. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1Kb Plus (Invitrogen).....54

Figura 13- Curvas de amplificação obtidas pelas reações de RT-qPCR utilizando *primers* para o gene da proteína ribossomal 60S, que foi utilizado como gene referência para amostras tratadas e não tratadas com UV de *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e para o anfidiplóide sintético.....55

Figura 14- Curvas de dissociação (*melt curve*) obtidas para o produto de dois pares de *primers* utilizados neste estudo. A - Pode ser observado que com par de *primers* RSArAs2 apenas um pico foi detectado indicando a amplificação de um único fragmento específico; na Figura 14 B, pode ser observado que com o par de *primers* RSGbAsA12 foram observados vários picos indicando que o mesmo não foi específico.....55

Figura 15- Alelos de *resveratrol sintase* que tiveram aumentos significativos da expressão relativa nas amostras tratadas com UV em relação ao controle identificadas pelos pares de *primers* RSGbAhT14, RSArAhT5, RSArAs2 e RSArAs6 em folhas de *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e anfidiplóide sintético. As barras de erros representam o desvio padrão observado entre as replicatas biológicas.....57

Figura 16- Relação entre a concentração de resveratrol e os níveis de expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primers* RSArAs2 para *A. hypogaea* (▲), anfidiplóide sintético (●), *A. duranensis* (◆), *A. ipaënsis* (■)59

Figura 17- Relação entre a concentração de resveratrol e os níveis de expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primers* RSGbAhT14 para *A. hypogaea* (▲), anfidiplóide sintético (●), *A. duranensis* (◆), *A. ipaënsis* (■).....59

Figura 18- Concentração de resveratrol e expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primer* RSArAhT5 para os resultados de *A. hypogaea* (▲), anfidiplóide sintético (●), *A. duranensis* (◆), *A. ipaënsis* (■)61

Figura 19- Concentração de resveratrol e expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primer* RSArAs6 para os resultados de *A. hypogaea* (▲), anfidiplóide sintético (●), *A. duranensis* (◆), *A. ipaënsis* (■).....61

Lista de tabelas

Tabela 1- Espécies, genomas, acessos e cultivares da seção *Arachis* avaliadas em relação à concentração de resveratrol (análise por HPLC) e em relação à expressão gênica relativa de *resveratrol sintase* (análise por RT-qPCR) no presente estudo...34

Tabela 2- Sequências dos pares de *primers* desenhados a partir da árvore filogenética desenvolvida pelo grupo de *Arachis* da Embrapa Cenargen (dados não publicados). Pares de *primers* identificados como RSGbAhT ou como RSGbAhT foram desenhados utilizando-se sequências gênicas de *resveratrol sintase* de *A. hypogaea* (Ah); pares de *primers* identificados como RSGbAs ou como RSGbAsA foram utilizando-se sequências de *resveratrol sintase* de *A. stenosperma* (As).....42

Tabela 3- Espécies analisadas para avaliação do teor de resveratrol entre espécies e entre acessos, tipos de genomas de cada uma delas, identificação dos acessos e médias das concentrações encontradas em folhas tratadas com UV.....46

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	9
Lista de Figuras	11
Lista de tabelas	14
1.0. Introdução.....	17
2.0. Objetivos	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3.0. Revisão da Literatura	20
3.1. A importância do amendoim.....	20
3.2. Gênero <i>Arachis</i> , seção <i>Arachis</i>	21
3.3. Espécies silvestres e o Melhoramento do amendoim cultivado.....	23
3.4. Resveratrol	24
3.5. Resveratrol como substância bioativa	25
3.6. Via biossintética da formação do resveratrol.....	26
3.7. Quantificação do resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- HPLC	27
3.8. Gene <i>resveratrol sintase</i>	28
3.9. Análise da expressão relativa de <i>resveratrol sintase</i> e RT-qPCR	31
4.0. Materiais e Métodos.....	33
4.1. Materiais	33
4.2. Métodos	34
4.2.1. Indução da síntese de resveratrol por UV- Preparo das amostras.....	34
4.2.2. Análise de conteúdo de resveratrol	36
4.2.3. Análise da expressão do gene da <i>resveratrol sintase</i>	38
4.2.4. Análise dos resultados	43
5.0. Resultado e discussão.....	44
5.1. Análise das concentrações de resveratrol entre espécies e entre acessos	44
5.2. Avaliação do comportamento de transcritos de <i>resveratrol sintase</i> em função da produção de resveratrol	52
5.2.1. Teor de resveratrol	52
5.2.2. Análises de expressão gênica relativa de <i>resveratrol sintase</i>	53

5.2.3. Correlação entre a concentração de resveratrol e a expressão relativa de <i>resveratrol sintase</i>	58
6.0. Conclusão	63
7.0. Referências Bibliográficas	64

1.0.Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) tem elevado valor nutricional devido ao seu alto teor de proteínas (20 a 30%), de óleos (aproximadamente 50% do peso seco da semente), além de carboidratos, sais minerais e vitaminas (Agrobyte, 2012). É a quarta oleaginosa mais plantada no mundo, sendo produzida principalmente na China, Índia e Estados Unidos (Freitas *et al.*, 2005). No Brasil, nos últimos 10 anos houve um aumento significativo na produção e a área total cultivada na safra 2011/12 está em torno de 101,4 mil hectares, sendo 74,9 mil hectares (73,2%) cultivados em São Paulo (boletim CONAB maio 2012). O consumo do amendoim é realizado de diversas maneiras, indo desde o grão inteiro até doces, confeitos, pastas ou aperitivos (Freitas *et al.*, 2005).

Arachis hypogaea faz parte da seção *Arachis*, uma das nove seções taxonômicas do gênero *Arachis*, que contêm 31 outras espécies, as quais são na maioria silvestres e diploides (Krapovickas & Gregory, 1994). Algumas espécies silvestres do gênero *Arachis* são filogeneticamente muito próximas ao amendoim (Bechara *et al.*, 2010; Friend *et al.*, 2010) e tem tido um papel importante no melhoramento de *A. hypogaea* porque possuem características não encontradas em seu *pool* gênico primário, como, por exemplo, resistência a doenças fúngicas (Subrahmanyam *et al.*, 1985, 1989; Pande & Rao, 2001; Fávero *et al.*, 2009; Leal-Bertioli *et al.*, 2009). As espécies silvestres podem também serem utilizadas no melhoramento do amendoim para a qualidade nutricional e por isso também têm sido caracterizadas para quantidade de óleos e teores de proteínas (Giannuzzo *et al.*, 2000). Recentemente Lopes (2011) caracterizou dez espécies silvestres da seção *Arachis* com relação à produção de resveratrol, que é um composto bioativo de comprovada ação na redução do risco de câncer e de cardiopatias (Baur & Sinclair, 2006).

O resveratrol é também uma fitoalexina envolvida na resposta da planta a estresses bióticos e abióticos (Chung *et al.*, 2003). A análise de folhas de algumas cultivares de *A. hypogaea* demonstrou relação entre maiores teores de resistência e maiores teores de resveratrol (Sobolev *et al.*, 2007). Portanto, o aumento dos teores de resveratrol no amendoim pode resultar em aumento de resistência além do aumento de seu valor nutracêutico.

Os estudos de Lopes (2011) demonstrou que espécies silvestres produzem resveratrol e que, portanto, podem ser fontes de alelos para o melhoramento genético do amendoim para essa característica. Lopes (2011) também demonstrou que espécies de genoma AA, BB e AABB produzem resveratrol. As espécies de genoma AA e BB da seção *Arachis* são as mais importantes, pois possuem genomas mais similares aos encontrados no amendoim cultivado,

o que facilita a transferência de genes. Portanto, é fundamental que um maior número de espécies de genomas A e B sejam avaliadas.

A literatura mostra grande variabilidade intraespecífica em espécies silvestres do gênero *Arachis* para diferentes características como resistência à mancha preta e ferrugem do que *A. hypogaea* (Pande & Rao, 2001; Fávero *et al.*, 2009). Portanto, muito provavelmente existe variabilidade para produção de resveratrol entre acessos de espécies silvestres de *Arachis*.

A investigação da síntese de resveratrol em amendoim tem sido feita utilizando-se diferentes tecidos da planta submetidos a diferentes formas de estresse (Lanz *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2003; Resurreccion *et al.*, 2009; Zorzete *et al.*, 2011; Yvonne *et al.*, 2012). Segundo Chung *et al.* (2003), uma vez que o resveratrol é o último composto a ser sintetizado em sua via bioquímica e que sua produção é catalisada pela enzima resveratrol sintase, a expressão do gene que codifica a enzima (chamado de *resveratrol sintase* ou RS) possui um papel regulatório na síntese do resveratrol. Esses mesmos autores demonstraram em *A. hypogaea* que o acúmulo de resveratrol foi correlacionado ao aumento do mRNA de *resveratrol sintase* indicando controle transcricional exercido pelo gene RS. Uma vez que existe tal relação, a variação no teor de resveratrol entre as espécies silvestres do gênero *Arachis* (Lopes, 2011) também podem estar relacionadas a variação na expressão do gene *resveratrol sintase*. Chung *et al.* (2003) investigaram o comportamento gênico de RS por meio de *northern blot* apenas em *A. hypogaea* e em função de diferentes estímulos. Nenhuma informação existe sobre a variação no acúmulo de resveratrol e a expressão do gene *resveratrol sintase* entre espécies silvestres de *Arachis*.

Caracterizar o comportamento do gene *resveratrol sintase* sem dúvida pode contribuir para o melhor entendimento da variação observada no acúmulo de resveratrol entre espécies do gênero *Arachis* contribuindo assim para a exploração do uso de espécies silvestres de *Arachis* no pré-melhoramento do amendoim ou no uso das mesmas para produção industrial de resveratrol.

2.0. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a variabilidade entre e dentro de espécies para a produção de resveratrol e a expressão de *resveratrol sintase* em função da produção de resveratrol em espécies silvestre de *Arachis* após tratamento com UV.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 - Avaliar a produção de resveratrol em sete genótipos (*A. hypogaea*, *A. stenosperma*, *A. valida*, *A. williamsii*, *A. ipaënsis*, *A. duranensis* e anfidiplóide sintético) após tratamento com UV por meio de HPLC;

2.2.2 - Avaliar a variação na produção de resveratrol entre acessos da mesma espécie (*A. stenosperma*) após tratamento com UV;

2.2.3 - Avaliar a variação na produção de resveratrol entre cultivares de *A. hypogaea* após tratamento com UV;

2.2.4 - Avaliar a expressão relativa de *resveratrol sintase* (RS) entre diferentes espécies por meio de RT-qPCR após tratamento com UV;

2.2.5 - Correlacionar os resultados de produção de resveratrol e expressão gênica relativa da RS.

3.0. Revisão da Literatura

3.1. A importância do amendoim

O consumo do amendoim ocorre desde tempos pré-históricos devido ao seu alto valor nutricional. Até hoje, várias populações indígenas cultivam o amendoim como fonte de óleos e proteínas em sua dieta diária (Freitas *et al.*, 2003).

A semente de amendoim contém de 44 a 56% de óleo, sendo esse teor variável conforme as condições de cultivo, e de 22 a 30% de proteína, dependendo da variedade e condições ambientais (Freitas *et al.*, 2005). Aproximadamente 80% dos óleos são ácidos graxos insaturados, o que indica que o óleo do amendoim é saudável, com predominância de ácido oleico e de ácido linoleico (Chung *et al.*, 2002).

O amendoim apresenta alto teor proteico e por isso é cada vez mais importante como fonte de proteína na alimentação humana e animal, especialmente nos países em desenvolvimento onde a proteína a partir de fonte animal é escassa. Os teores proteicos do amendoim são superiores ao do feijão (25%), girassol (24%) e ao do gergelim (23%) (Freire *et al.*, 1999).

O amendoim também é considerado uma rica fonte de minerais, sendo os mais abundantes o fósforo (263,60 mg/100g) e o potássio (328,00 mg/100g) (Asibuo *et al.*, 2010). Também contém vitaminas E, K, e do complexo B (Savage & Keenan, 1994).

Devido ao seu alto valor nutricional e por ser de fácil consumo, o amendoim é a quarta oleaginosa mais cultivada em todo mundo (Figura 1). Estima-se que a produção mundial esteja em mais de 30 milhões de toneladas por ano, sendo que o Brasil apresentou em seu balanço de 2012 cerca de 87.000 hectares plantados de amendoim com produção de aproximadamente 227.000 toneladas (Instituto de economia agrícola, 2012).

A procura pelo amendoim no mercado mundial cresce principalmente devido ao aumento da demanda chinesa, país que é o maior produtor global de amendoim, seguido da Índia, Estados Unidos e Argentina. O Brasil ocupa a 17ª posição na lista de países produtores. O mercado mundial movimenta cerca de US\$ 19 bilhões ao ano, sendo os maiores consumidores a União Europeia, Japão, Rússia, Indonésia, Canadá e México. Os maiores exportadores de grãos de amendoim são a Argentina e China, estando o Brasil em quinto lugar exportando cerca de 25% de sua produção (Abicab, 2012).

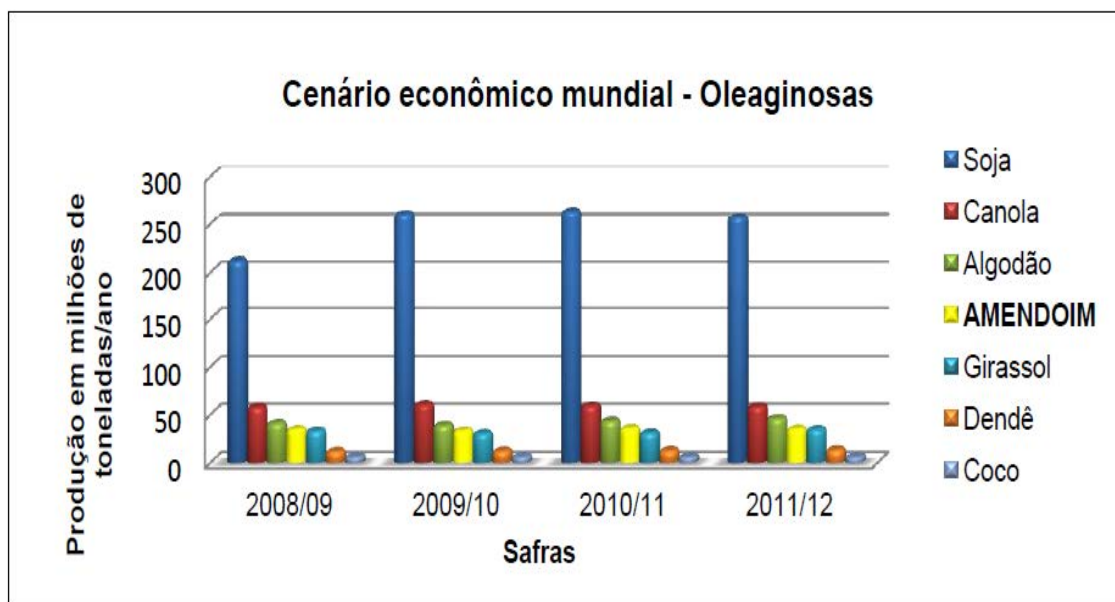


Figura 1- Produção das principais oleaginosas cultivadas no mundo, nas safras de 2008 a 2011 (USDA-FAS, 2011).

No Brasil a maior produtividade ocorre devido ao cultivo em rotação ou como segunda safra, sendo parte da produção exportada ou destinada à indústria de alimentos (Freitas *et al.*, 2005). Em termos produtivos, a região que mais produz amendoim é a região Sudeste, seguida pela Centro-Oeste e Nordeste. O Estado de São Paulo é responsável por 80% da produção e contém quase a totalidade das exportações de amendoim em grão que, a partir de 2010 com a participação de Minas Gerais nas exportações de óleo de amendoim, passou a responder por cerca de 90% das exportações desse produto (Instituto de economia agrícola, 2012). Em São Paulo as cultivares IAC-Tatu e IAC-Caiapó têm participação no mercado de sementes de 34% e 13%, respectivamente (Fagundes, 2002). Por outro lado, na região nordeste as cultivares Tatu e BR1 são as mais plantadas.

3.2. Gênero *Arachis*, seção *Arachis*

O gênero *Arachis*, da família Leguminosae, é caracterizado por conter espécies que produzem seus frutos de forma geocárpica, o que o diferencia dos demais gêneros da família das leguminosas. O gênero possui estípulas (estruturas laminares, geralmente em número de dois, presentes na base das folhas) soldadas e número básico de cromossomos $x=10$ (Krapovickas & Gregory, 1994).

Krapovickas & Gregory (1994) consideram que o gênero *Arachis* se originou na Serra de Amambai, no limite do Mato Grosso do Sul com o Paraguai, onde ocorre *A. guaranítica*, a espécie mais antiga do gênero (Gregory *et al.*, 1980). Estudos apontam que o gênero se estendeu por cerca de 4000 km e com essa expansão as espécies do gênero *Arachis* tiveram que se adaptar a diferentes condições ambientais e desenvolver mecanismos de resistência/tolerância a diferentes pragas e patógenos, o que as faz um repositório importante de alelos para uso no melhoramento do amendoim cultivado.

O gênero *Arachis* contém 80 espécies descritas e este gênero ocorre naturalmente no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Valls & Simpson, 1994). Este gênero foi dividido em nove seções (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides*, e *Triseminatae*) com base na morfologia, distribuição geográfica e cruzabilidade (Krapovickas & Gregory, 1994). A seção *Arachis* é a mais importante, pois contém *A. hypogaea*, espécie de alto valor nutricional e comercial. Dentro da seção *Arachis*, existem 32 espécies, sendo 30 diploides e duas tetraploides (*A. hypogaea* e *A. manticola*). O amendoim cultivado é um alotetraploide ($2n = 4x = 40$ cromossomos) apresentando os genoma AA e BB, que são encontrados separadamente em espécies silvestres da seção *Arachis* (Seijo *et al.*, 2004).

As espécies silvestres portadoras do genoma AA são diploides e podem ser caracterizadas pela presença de um par de cromossomos de tamanho reduzido e com um menor nível de condensação da eucromatina em comparação com os outros cromossomos (Seijo *et al.*, 2004). *Arachis duranensis* e *A. stenosperma* são exemplos de espécies que possuem genoma AA. As espécies silvestres diploides da seção *Arachis* com $2n=20$ cromossomos e sem o par de cromossomos A foram por muitos anos consideradas como de genoma BB, apesar de serem muito mais heterogêneas (Moretzsohn *et al.*, 2009). Recentemente, tais espécies foram classificadas em genomas BB, KK e DD por meio de evidências de citogenética molecular (Seijo *et al.*, 2004; 2007; Grabiele *et al.*, 2012). Como exemplos de espécies de genoma BB existem *A. ipaënsis*, *A. valida* e *A. williamsii*.

Arachis hypogaea se originou através do evento de hibridação de duas espécies diploides silvestres, *A. duranensis* (doador do genoma AA) e *A. ipaënsis* (doador do genoma BB), seguido por uma duplicação cromossômica espontânea (Halward *et al.*, 1991; Kochert *et al.*, 1996; Seijo *et al.*, 2004; 2007) e por isso é caracterizada como um alotetraploide ($2n=4x=40$), ou seja, dois conjuntos completos de cromossomos de diferentes genomas (genoma AA e BB) estão presentes no mesmo núcleo. O tetraploide resultante da duplicação dos cromossomos do híbrido entre *A. duranensis* e *A. ipaënsis* foi isolado reprodutivamente

de seus parentes silvestres diploides e esse isolamento, levou a uma limitada variabilidade genética no amendoim cultivado como observado em diferentes estudos utilizando marcadores moleculares (Kochert *et al.*, 1996; Subramanian *et al.*, 2000; Milla *et al.*, 2005). Apesar da grande variabilidade fenotípica observada no pool gênico primário do amendoim, apenas um nível limitado de polimorfismo de DNA ocorre entre diferentes genótipos dessas espécies (He *et al.*, 1997; Hopkins *et al.*, 1999; Gimenes *et al.*, 2007; Cuc *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2009). Em contraste, as espécies diplóides silvestres de *Arachis* são geneticamente mais diversificadas (Moretzsohn *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2006; Raina *et al.*, 2001; Gimenes *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002; Tallury *et al.*, 2005; Seijo *et al.*, 2007; Robledo *et al.*, 2009, 2010) e como compõem o pool gênico secundário do amendoim cultivado representam uma fonte importante de novos alelos que podem ser utilizados em programas de pré-melhoramento.

3.3. Espécies silvestres e o Melhoramento do amendoim cultivado

Programas de pré-melhoramento atuam principalmente com o objetivo de manter ampla a base genética de espécies cultivadas (Foncéka *et al.*, 2009) explorando alelos de interesse contidos em espécies silvestres, como por exemplo aqueles que podem conferir mais resistência a uma dada doença, a um dado estresse abiótico ou elevar o valor nutricional. No caso do amendoim, vários são os estudos que apontam espécies silvestres como sendo mais resistentes do que o amendoim cultivado a diferentes tipos de estresses (Reddy *et al.*, 2000; Pande & Rao, 2001; Dwivedi *et al.*, 2002).

A introgressão de genes de espécies silvestres para *A. hypogaea* é mais dificultada pelo fato das espécies silvestres serem diplóides. Tal barreira tem sido superada pelo desenvolvimento de anfidiploides sintéticos resultantes da duplicação cromossômica de híbridos obtidos pelo cruzamento de espécies silvestres diploides. Fávero *et al.* (2006) desenvolveram um anfidiploide sintético fértil a partir de um híbrido resultante de um cruzamento entre *A. ipaënsis* e *A. duranensis*, os doadores do genoma BB e A de *A. hypogaea* respectivamente. Portanto, anfidiploides são comprovadamente as melhores maneiras de introgridir genes de espécies silvestres no amendoim cultivado.

Dados prévios demonstraram que existe diferenças de compatibilidade dos genomas das espécies com o cultivado e que há variabilidade intraespecífica para características de interesse agrônomo. Portanto, a seleção da espécie e de seu acesso mais adequado para um determinado problema é fundamental para o sucesso do programa de pré-melhoramento.

3.4. Resveratrol

O cultivo do amendoim tem como fator limitante as doenças que provocam anomalias nas folhas, caule, raízes, vagens e sementes, causadas por agentes infecciosos ou fatores abióticos (Subrahmanyam *et al.*, 1989; Porter, 1997). Uma das defesas naturais da planta mediante estresses bióticos e abióticos é a produção de fitoalexinas, que são caracterizadas como compostos de baixo peso molecular, muitos da classe dos estilbenos, com atividade antifúngica e antibacteriana (Ingham *et al.*, 1976; Paxton *et al.*, 1991; Sobolev *et al.*, 1995). Um dos principais estilbenos produzido em vários tecidos da planta do amendoim é o resveratrol (Sobolev *et al.*, 1995).

A presença natural de resveratrol foi observada em diferentes tecidos da planta de amendoim não infectadas em concentrações extremamente baixas (Dorner *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003; Resurreccion, 2009; Nepote *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2000). O resveratrol atuando como uma fitoalexina em amendoim foi primeiramente identificado em hipocótilos infectados por fungos (Ingham *et al.*, 1976). Em trabalhos em que folhas e raízes de amendoim foram tratadas com leveduras, a concentração de resveratrol encontrada foi em torno de 2,8 µg/g (Chung *et al.*, 2003). Yang *et al.* (2010) encontraram em culturas celulares infectadas por fungos concentrações de resveratrol de aproximadamente 9 µg/g, o que demonstra que também existe variação das concentrações de resveratrol por materiais infectados, tanto entre cultivares, entre tecidos da planta utilizados e entre as diferentes formas de indução (Zorzete *et al.*, 2011). Tang *et al.* (2010) observaram que o estresse em amendoim foi fundamental no aumento da biossíntese simultânea de resveratrol e outros estilbenos, além disso demonstraram que as concentrações de resveratrol variam conforme o tempo de incubação, atingindo um pico seguido de uma baixa na produção do composto.

Chung *et al.* (2003) verificaram aumento substancial no conteúdo de resveratrol em folhas, raízes, cascas e sementes em desenvolvimento de amendoim em resposta a estresses abióticos (ferimentos), hormônios e tratamentos com luz ultravioleta (UV), sendo que folhas submetidas a radiação UV foi o material que apresentou maiores concentrações de resveratrol em relação a todos os materiais analisados submetidos a todas as outras formas de estresse (2 horas de indução UV seguida de 12 horas de incubação). Potrebko & Resurreccion (2009) analisaram sementes de *A. hypogaea* submetidas à combinação de tratamentos com ultra-som (US) seguido por exposição ao UV durante 15 a 55 minutos e observaram que todas as

amostras submetidas ao tratamento produziram resveratrol e que as amostras do grupo controle tiveram níveis insignificantes da fitoalexina.

Em outro trabalho Sobolev *et al.* (2007) utilizando sementes de diferentes cultivares de *A. hypogaea* submetidos a diferentes tipos de estresses, associaram a resistência a algumas doenças com maiores níveis de resveratrol. Esses autores sugerem que resveratrol pode ser utilizado como um marcador para estimar o nível de resistência de cultivares de *A. hypogaea*. Se as espécies silvestres diploides se comportam como o amendoim em relação ao nível de resveratrol e nível de resistência a estresse, tal informação seria útil em programas de pré-melhoramento. Lopes (2011) ao analisar concentrações de resveratrol em espécies silvestres do gênero *Arachis*, tendo folhas submetidas ao tratamento de luz ultravioleta como material de análise, observou que estas também produzem a fitoalexina em concentrações variáveis de acordo com as espécies.

3.5. Resveratrol como substância bioativa

Vários polifenóis da classe dos estilbenos, incluindo o resveratrol, possuem atividade antioxidante e antiinflamatória conhecida (Frémont, 2000). Ao resveratrol é atribuído os efeitos cardioprotetores do vinho (Siemann & Creasy, 1992) que explicaria o "paradoxo francês" (Renaud & Lorgeril, 1992; 1998), isto é, a baixa frequência de doenças cardiovasculares em franceses apesar da dieta rica em gordura saturada (Richard, 1987).

Várias pesquisas subsequentes mostraram que o resveratrol pode prevenir ou retardar a progressão de várias doenças. Jang *et al.* (1997) concluíram que aplicações tópicas de resveratrol podem inibir a iniciação e o crescimento de tumores em peles de ratos em até 98%. Estudos também demonstraram que o resveratrol pode ser útil na proteção contra danos cerebrais em casos de isquemias (Wang *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2003).

Visando os benefícios à saúde, a indústria alimentícia tenta agregar valor aos seus produtos pela adição ou aumento do teor de resveratrol. Burns *et al.* (2002) realizaram um estudo para determinar os níveis de resveratrol nas principais fontes alimentares de estilbenos (amendoim, uva, vinho tinto) e encontraram maiores concentrações em vinhos. Outros trabalhos também descreveram o antioxidante em casca da uva e em produtos a base de uva, principalmente sucos e vinhos (Mattivi & Nicolini, 1993). Sobolev *et al.* (1999) ao analisarem produtos a base de amendoim, observaram que amendoins torrados tinham o menor teor de resveratrol (0,055 µg/g), enquanto que em manteiga de amendoim a concentração encontrada foi significativamente maior (0,32 µg/g) e em amendoim cozido foi observado o nível mais

alto de resveratrol (5,13 µg/g). As concentrações de resveratrol em produtos comerciais de amendoim foram semelhantes ao encontrado em grãos de amendoim cru rotineiramente utilizado como matéria prima.

3.6. Via biossintética da formação do resveratrol

A biossíntese do resveratrol é desencadeada por um sinal químico, gerado em função de algum tipo de estresse sofrido por uma planta e que induz o aumento da expressão do gene *resveratrol sintase*, o qual promove o acúmulo de mRNA e consequentemente da enzima resveratrol sintase (também chamada estilbeno sintase- STS) (Lanz *et al.*, 1990). Por sua vez esta enzima catalisa a condensação entre uma molécula de 4-coumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA, formando o resveratrol (Figura 2) (Soleas *et al.*, 1997). O resveratrol existe nas formas *cis* e *trans* com a forma *trans* sendo mais comum e de maior atividade biológica (Tokusoglu *et al.*, 2005).

Halls & Yu (2008) indicaram que a molécula instável formada pela condensação de *p*-cumaril CoA e malonil-CoA é o substrato para a formação de resveratrol ou de chalcona e as enzimas envolvidas nesse processo são a resveratrol sintase (STS) e a chalcona sintase (CHS), respectivamente. As sequências de aminoácidos das diferentes STS têm sequências muito similares as das CHS, sugerindo que o STS evoluiu várias vezes de forma independente de CHS, por um número limitado de trocas de aminoácidos e que a vantagem obtida por esta função enzimática favoreceu a seleção de plantas com atividade melhorada de STS (Tropf *et al.*, 1994).

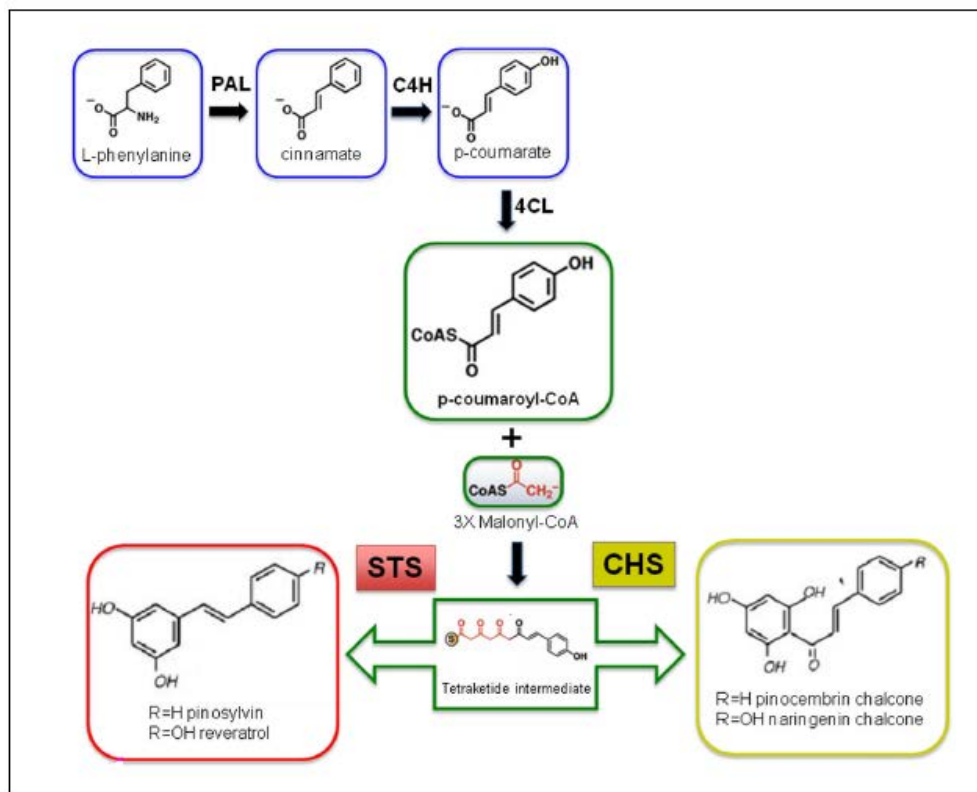


Figura 2- Esquema da biossíntese do resveratrol (biossíntese mista). As enzimas apresentadas nessas vias são as seguintes: PAL, phenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato-4-hidroxilase; 4CL, 4-cumaroil: CoA-liase; CHS, chalcona sintase; STS, estilbeno sintase (Vannozzi *et al.*, 2012).

3.7. Quantificação do resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC

A atividade farmacológica do resveratrol estimulou o desenvolvimento de métodos analíticos para sua detecção e quantificação em diferentes metodologias principalmente como extrato de plantas (Gerogiannaki-Christopolou *et al.*, 2006). Informações a respeito do resveratrol têm sido obtidas devido ao desenvolvimento de análises instrumentais (Filip *et al.*, 2003). A literatura aponta a metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência- HPLC ideal para detecção de resveratrol em sementes, folhas e raízes de amendoim (Chung *et al.*, 2003; Rudolf *et al.*, 2005; Potrebko & Resurreccion, 2009; Chang *et al.*, 2009; Lopes, 2011).

O HPLC é uma técnica cromatográfica que tem um líquido como fase móvel e fases estacionárias que podem ser líquidas e sólidas, além disso, emprega alta pressão na separação dos componentes da amostra. A técnica tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostra,

em escala de tempo de minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade, gerando no final da análise um cromatograma utilizado para identificar e quantificar os componentes da amostra analisada (Collins *et al.*, 2006).

3.8. Gene *resveratrol sintase*

A reação biossintética da produção de resveratrol é determinada pela presença da enzima resveratrol sintase, sugerindo que a expressão do gene desempenha um papel regulador na síntese do resveratrol. Aumentos paralelos de mRNA do gene de *resveratrol sintase* e da atividade da enzima em resposta a situações de estresse na planta indica um possível controle transcricional da expressão do gene na síntese da fitoalexina (Chung *et al.*, 2003). Quando investigado a variação da expressão do gene RS bem como no acúmulo de resveratrol em resposta a estresses em *A. hypogaea*, os resultados indicam que os níveis de expressão de *resveratrol sintase* determinam a síntese de resveratrol em plantas de amendoim, e que o estresse é fundamental para síntese de resveratrol (Chung *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2010). Além disso, a análise de diferentes tecidos submetidos à mesma forma de estresse e do mesmo tecido submetido a diferentes de formas de indução permite concluir que as concentrações de resveratrol e os níveis de transcrito de *resveratrol sintase* foram diferentes de acordo com os tecidos e os tipos de estresse analisados, indicando uma regulação tecido específica na síntese de resveratrol.

A enzima resveratrol sintase em uva é codificada por uma família multigênica que compreende oito genes (pSV21, pSV25, pSV696, pSV368, StSy, Vst1, Vst2 e VST3) podendo cada um destes estar relacionado a um tipo de tecido da planta bem como a um tipo de indução (estresse biótico ou abiótico) (Melchior *et al.*, 1991; Wiese *et al.*, 1994).

A literatura aponta o tratamento com UV em folhas de *A. hypogaea* como o que induz a síntese das maiores concentrações de resveratrol e que as concentrações, tanto de resveratrol como de transcritos, atingem um pico de expressão e produção seguido de uma queda (Chung *et al.*, 2003).

Em *A. hypogaea* foi descrito o gene de AHRS que tem sido utilizado para pesquisas de engenharia metabólica de microrganismos ou plantas. A transferência do gene de *resveratrol sintase* de *A. hypogaea* para tabaco (*Nicotiana tabacum*) levou ao acúmulo de resveratrol em resposta a luz UV (Hain *et al.*, 1990). Este mesmo gene, posteriormente também foi introduzido em alfafa (*Medicago sativa*) conferindo resistência a fungos (Hipskind & Paiva, 2000).

A análise do gene que codifica a enzima resveratrol sintase em espécies silvestres de *Arachis*, no amendoim cultivado e em um anfídiploide sintético foi realizada utilizando-se pares de *primers* degenerados desenhados baseando-se no alinhamento de sequências de *resveratrol sintase* disponíveis no *GenBank* (Bertioli, comunicação pessoal). Os pares de *primers* degenerados foram utilizados para amplificar regiões genômicas de *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu, *A. hypogaea* cv. IAC-Runner, *A. cardenasii*, *A. magna*, *A. stenosperma*, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Os fragmentos obtidos foram sequenciados (dados não publicados) e a partir dessas informações foi obtida uma árvore filogenética (Figura 3). Foram observados vários clados na árvore filogenética e nenhum foi formado por sequência de uma determinada espécie. Esse resultado indica que mais de uma cópia do gene *resveratrol sintase* existe no genoma de *Arachis* e essas cópias apresentam grande similaridade nas sequências o que pode indicar a existência de uma família gênica, como observado em outras espécies (Vannozzi *et al.*, 2012). Baseado nos diferentes clusters, foram desenhados nove pares de *primers* para tentar avaliar a função de diferentes alelos na produção de resveratrol em função do tratamento com UV.

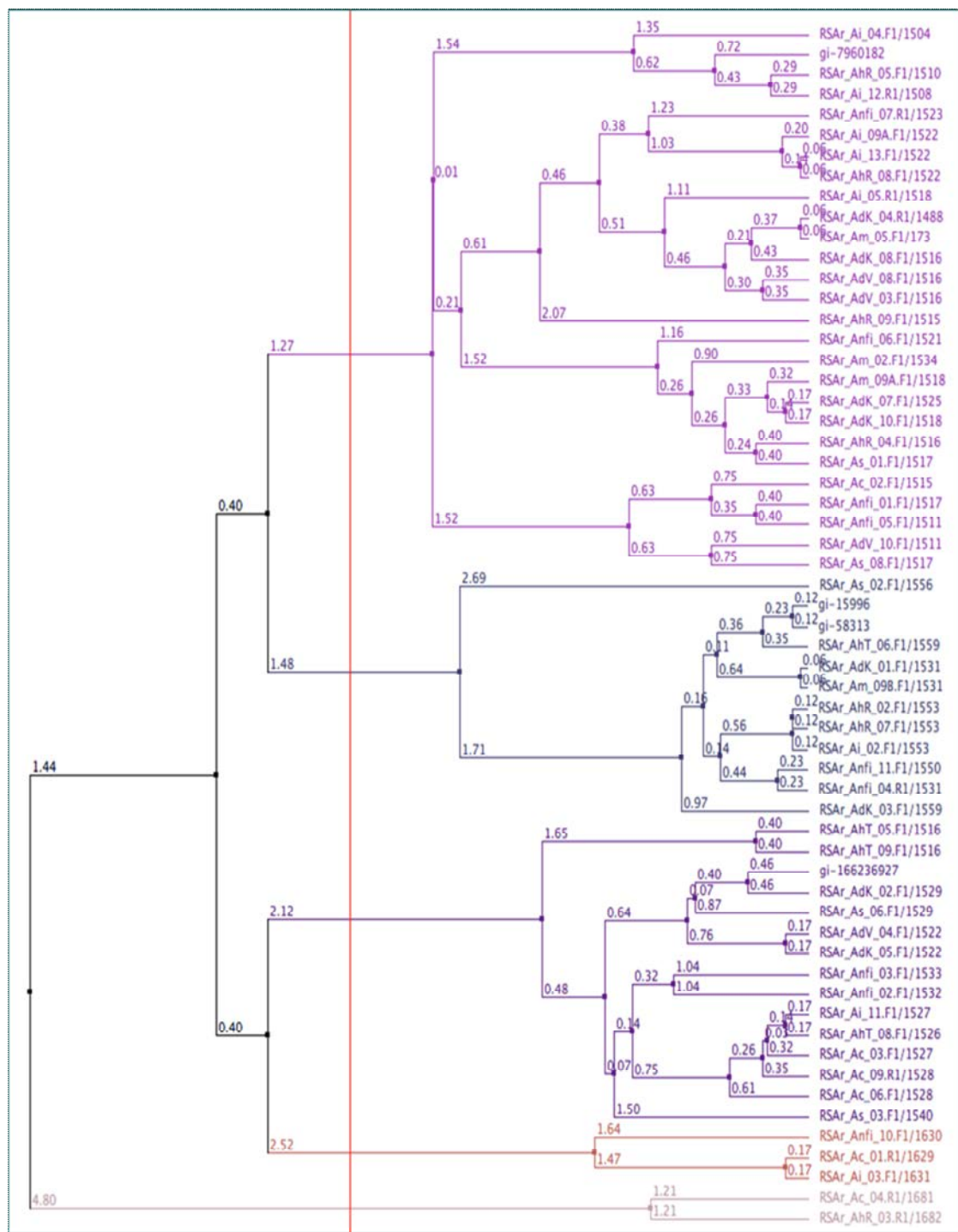


Figura 3- Árvore filogenética obtida utilizando-se sequências de DNA dos fragmentos gerados a partir da amplificação com pares de *primers* degenerados para RS e DNAs de seis espécies de *Arachis* e um anfidiplóide sintético (*A. hypogaea*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *A. magna*, *A. stenosperma*, *A. ipaënsis*, *A. ipaënsis* X *A. duranensis*).

3.9. Análise da expressão relativa de *resveratrol sintase* e RT-qPCR

O estudo dos transcritos presentes em um genoma tem potencial para revelar os genes não conhecidos, em função de seus comportamentos em uma determinada situação (ex.: estresse hídrico) envolvidos na expressão de características de interesse.

Sabe-se que existem vários locos de *resveratrol sintase* em amendoim e em outras espécies como uva, na qual estudo prévio demonstra que os diferentes genes de *resveratrol sintase* são expressos diante de diferentes estímulos. O número exato de genes de *resveratrol sintase* em *Arachis* ainda não é conhecido, mas estudos prévios demonstram que diferentes alelos são encontrados na diferentes espécies (Leal Bertoli, comunicação pessoal). Portanto, a análise dos transcritos produtos de tais alelos em relação à síntese de resveratrol contribuirá na elucidação do padrão de expressão dos diferentes genes de *Arachis* em função de diferentes estímulos.

No amendoim (*A. hypogaea*) a análise da expressão do gene *resveratrol sintase* tem sido realizada principalmente por meio de *northern blot* (Lanz *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003). Os resultados obtidos demonstram variação na quantidade de transcritos de *resveratrol sintase* em função do tempo, e em diferentes tecidos e estímulos. Entretanto a técnica *northern blot* demanda uma grande quantidade de mRNA e consequentemente uma grande quantidade de material vegetal que é um fator limitante quando se trabalha com algumas espécies silvestres do gênero *Arachis*.

A técnica de *northern blot* vem sendo substituída pelo método de transcrição reversa do RNA por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), pois essa utiliza menor quantidade de RNA nas análises. Além disso, o RT-qPCR apresenta maior sensibilidade, quantificação precisa e especificidade na análise de transcritos (Rajeevan *et al.*, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002; Derveaux *et al.*, 2010).

A técnica de RT-qPCR funciona com ciclos subsequentes em que ocorre a desnaturação do cDNA (DNA complementar ao RNA mensageiro) de grupos amostrais distintos como molde na reação de qPCR para comparação dos níveis de expressão de genes de interesse entre a amostra tratada e a controle. Em seguida ocorre a hibridização de pares de *primers* (iniciadores) a sequências específicas e a extensão, mediada por uma DNA polimerase termoestável resultando em um aumento exponencial do número de *amplicons* ao longo dos ciclos da reação (Applied Biosystem, s/d). Portanto nesta fase exponencial (fase que fornece os dados mais precisos e exatos para a quantificação) dois valores são calculados: o limiar (*threshold line*) e o CT (*Cycle threshold*) ou Cq (Ciclo de quantificação –

Quantification cycle value) (Bustin, *et al.*, 2009). O aumento do sinal fluorescente é captado a cada ciclo até atingir um limiar (*threshold*). E Cq é o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial (Life Technologies, s/d; Peirson & Butler, 2007). A fluorescência mais utilizada é SYBR® Green que consiste em um corante fluorescente que se incorpora ao cDNA dupla fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação, permitindo o monitoramento da amplificação de qualquer sequência de cDNA, por meio da emissão de luz verde, captada pelo instrumento de RT-qPCR. Na detecção utilizando o sistema SYBR® Green, é importante executar uma análise da curva de dissociação (*melting curve*) após a RT-qPCR para garantir que o *amplicon* desejado foi detectado, isto porque, este corante intercala em todo DNA dupla fita presente na amostra, podendo gerar falso-positivos, ou seja, ele também pode se ligar à sequências não específicas (produtos inespecíficos) e dímeros de *primer* (Life Technologies, s/d; Applied Biosystem L. T., s/d; Novais, *et al.*, 2004).

Os níveis de mRNA entre as diferentes amostras são normalizados por meio da comparação da expressão do gene de interesse com a de um gene de referência, cuja expressão não deve variar entre diferentes tecidos, estágios de desenvolvimento ou condições experimentais (Gutierrez *et al.*, 2008). Os níveis de expressão do gene de interesse, desse modo, são descritos pela razão entre os níveis de mRNA deste gene e os do gene de referência (Hugget *et al.*, 2005). Diversas espécies vegetais já tiveram genes de referência caracterizados, como *Arabidopsis thaliana* (Czechowski *et al.*, 2005), cana-de-açúcar (Iskandar *et al.*, 2004), soja (Libault *et al.*, 2008), *Brachiaria brizantha* (Silveira *et al.*, 2009) entre outras. Morgante *et al.* (2011) avaliaram a estabilidade de dez genes de referência para normalização em RT-qPCR de folhas e raízes de três espécies silvestres da seção *Arachis* (*A. magna*, *A. duranensis* e *A. stenosperma*) e do amendoim cultivado (*A. hypogaea*), submetidos a estresses bióticos e abióticos, permitindo a identificação de combinações específicas de genes de referência com espécies, órgãos e estresses e encontraram genes que não apresentam variação na expressão entre matérias tratados ou não tratados.

4.0. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. As espécies e acessos analisados (Tabela 02) foram escolhidos por serem da seção *Arachis*, que possui as espécies com genomas mais relacionados aos encontrados em *A. hypogaea* (Godoy *et al.*, 1999). As sementes foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, e foram cultivadas durante o período de dezembro de 2011 a março de 2012.

A análise de variação de teor de resveratrol entre espécies foi realizada utilizando-se acessos de *A. stenosperma*, *A. hypogaea*, *A. valida*, *A. williamsii* (Tabela 1). A análise de variação intra-específica foi realizada utilizando quatro acessos de *A. stenosperma* (VMiSv 10229, VSv 10309, VAcLf 15076, SvW 3712) e quatro cultivares de *A. hypogaea* (IAC Tatu, IAC Caiapó, BR-1, IAC Runner). *Arachis stenosperma* foi selecionada para análise por ser uma espécie silvestre diploide da seção *Arachis* portadora do genoma AA, reconhecida como uma fonte de genes importantes para o melhoramento genético do amendoim (Pacheco, *et al.*, 2008) e por apresentar resistência a inúmeras doenças (Proite, *et al.*, 2007). *Arachis williamsii* (WiDc 1118) e *A. valida* (VPzRcSgSv 13514) foram selecionadas por serem espécies do genoma BB próximas filogeneticamente de *A. ipaënsis*, doador do genoma BB para *A. hypogaea*. Tendo em vista que *A. ipaënsis* possui apenas um acesso disponível é fundamental a caracterização de outros acessos do genoma BB, que possam ser fontes de alelos em programas de pré-melhoramento. (Valls & Simpson, 1994; Moretzsohn *et al.*, 2004, Bechara *et al.*, 2010).

As análises da concentração de resveratrol em paralelo com o estudo da expressão relativa de *resveratrol sintase* por RT-qPCR (Tabela 1) foram realizadas em amostras de *A. hypogaea* (cultivar runner, genoma AABB), *A. ipaënsis* (acesso KGPScS 30076, genoma BB) e *A. duranensis* (acesso VNvEv 14167, genoma AA) e um anfidiplóide sintético (originado pelo cruzamento artificial do acesso KGPScS 30076 de *A. ipaënsis* e VNvEv 14167 de *A. duranensis*, genoma AABB). *A. duranensis* e *A. ipaënsis* foram selecionadas por serem os progenitores do amendoim cultivado (Kochert *et al.*, 1996). A utilização do anfidiplóide sintético foi fundamental para avaliarmos o comportamento da produção de resveratrol em função do nível de ploidia, isto é, em diploides e tetraploides.

Os experimentos de concentração de resveratrol e expressão relativa da *resveratrol sintase* foram realizados utilizando-se tecido foliar, pois este é produzido em abundância pela planta e é o tecido mais susceptível as doenças fúngicas, fator limitante para o aumento do cultivo no Brasil (Freitas *et al.*, 2005).

Tabela 1- Espécies, genomas, acessos e cultivares da seção *Arachis* avaliadas em relação à concentração de resveratrol (análise por HPLC) e em relação à expressão gênica relativa de *resveratrol sintase* (análise por RT-qPCR) no presente estudo.

Espécies	Genoma	Acesso/ Cultivar	Análise	Análise
			HPLC	RT-qPCR
<i>A. hypogaea</i>	AABB	IAC Runner	•	•
<i>A. hypogaea</i>	AABB	IAC Caiapó	•	
<i>A. hypogaea</i>	AABB	BR-1	•	
<i>A. hypogaea</i>	AABB	IAC Tatu	•	
Anfidiploide	AABB (sintético)	<i>A. ipaënsis</i> X <i>A. duranensis</i>	•	•
<i>A. duranensis</i>	AA	VNvEv 14167	•	•
<i>A. ipaënsis</i>	BB	KGPScS 30076	•	•
<i>A. stenosperma</i>	AA	VMiSv 10229	•	
<i>A. stenosperma</i>	AA	Sv 10309	•	
<i>A. stenosperma</i>	AA	VAcLf 15076	•	
<i>A. stenosperma</i>	AA	SvW 3712	•	
<i>A. valida</i>	BB	VPzRcSgSv 13514	•	
<i>A. williamsii</i>	BB	WiDc 1118	•	

4.2. Métodos

4.2.1. Indução da síntese de resveratrol por UV- Preparo das amostras

O tempo de indução, tempo de coleta pós-indução e o tratamento utilizado para indução da produção de resveratrol foram escolhidos baseando-se em dados da literatura que comparam várias formas de indução e demonstram que a forma de indução mais eficiente na produção de resveratrol é por meio de tratamento com UV (Lanz *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 2001; 2003; Chang *et al.*, 2006; Zorzete *et al.*, 2011).

Folhas das espécies de *Arachis* (Tabela 1) foram coletadas em casa de vegetação durante os meses de janeiro e fevereiro de 2012, com intervalo de vinte dias entre as três repetições biológicas do experimento. Depois de coletadas, foram colocadas em sacos

plásticos e umedecidas e no laboratório foram dispostas em duas bandejas que foram revestidas com uma camada de algodão umedecida com 500 ml de água, sob a qual foi colocada uma camada de folhas de papel germitest.

Uma bandeja foi colocada 50 cm abaixo da luz ultravioleta (UV-C) (Fluxo Laminar: Trox Modelo FLV série: 235-81, com Lâmpada Philips TUV 30W/ 630 TB *LONGLIFE*) a 50 cm de distância da luz, por duas horas e trinta minutos, enquanto a outra (grupo controle) ficou em uma sala ao lado, livre da radiação. Após o período indicado, as duas bandejas foram reunidas em uma mesma sala, onde permaneceram por quinze horas a temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida as folhas de cada espécie foram divididas em alíquotas de 1g em três tubos falcon de 50 mL protegidos da luz com papel alumínio.

Todas as espécies foram induzidas simultaneamente e o experimento foi repetido três vezes (repetições biológicas). A cada nova indução, a disposição das folhas de cada espécie na bandeja foi diferente, certificando que o local na bandeja não influenciaria na intensidade da indução por UV e consequentemente nos resultados.

Para *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e o anfidiplóide sintético, que tiveram o conteúdo de resveratrol e a expressão relativa de *resveratrol sintase* analisadas, o dobro de folhas foi coletado e submetido ao tratamento com UV. As folhas tratadas com UV de cada espécie foram divididas em seis tubos de 50 ml, sendo três destinados para a análise de conteúdo de resveratrol, contendo 1 g de folha cada, e três para análise da expressão do gene da *resveratrol sintase*, estes últimos contendo 300 mg de folhas. A mesma divisão foi feita para o grupo controle. Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e depois guardadas em freezer -80° C até o momento das análises laboratoriais. O fluxo de preparo das amostras para análise é demonstrado na Figura 4.

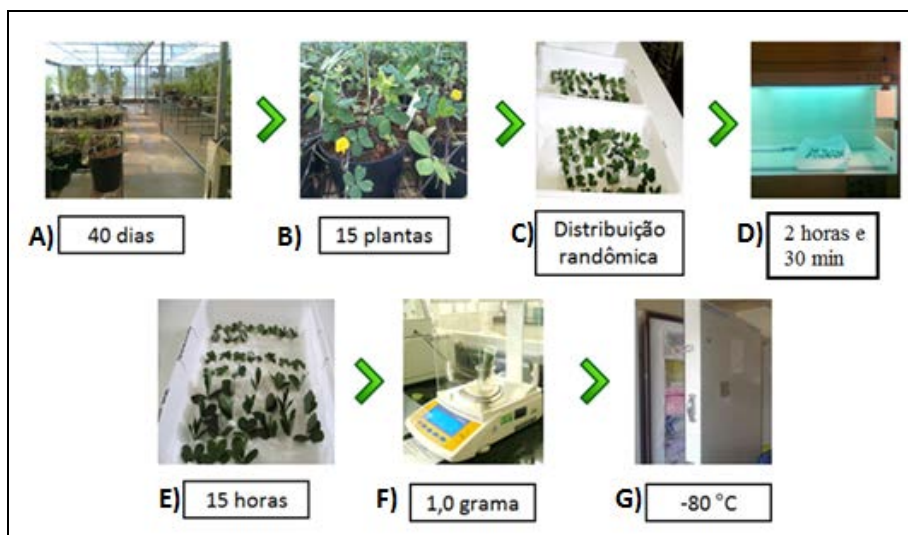


Figura 4- Esquema de coleta, indução e armazenamento das folhas de *A. hypogaea*, *A. stenosperma*, *A. valida*, *A. williamsii*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e anfidiplóide. Cultivo das plantas (A), foram utilizadas folhas de 15 plantas de cada genótipo (B), distribuição randômica das folhas em bandejas com papel germitest, algodão e água (C), tratamento com UV por 2 h e 30 min (D), folhas em repouso por 15hs (E), amostras separadas em tubo falcon contendo 1g de folha (F), acondicionamento em freezer -80°C (G).

4.2.2. Análise de conteúdo de resveratrol

4.2.2.1. Extração de resveratrol

O protocolo para extração de resveratrol usado foi baseado em Potrebko & Resurreccion (2009), com as modificações de Lopes (2011).

Todas as etapas da metodologia de extração de resveratrol foram protegidas da luz e todas as amostras foram analisadas em triplicatas. As amostras de cada tubo (1 g de folha) foram maceradas com auxílio de bastão de vidro e nitrogênio líquido e em seguida foi adicionado 0,840 mL de fenoltaleína (>98%, 2927-2835 µg/mL, Sigma-Aldrich) como padrão interno e 10 mL de EtOH 80%. A extração foi realizada com auxílio de homogeneizador de tecidos (Polytron®) por 2 minutos a 20.000 rpm. As fases foram separadas em centrífuga a 10.000 rpm, 25°C por 10 minutos e a fase líquida foi transferida para outro tubo. Ao tubo contendo restos sólidos de folhas, foi adicionado 5 mL de EtOH 80%, misturado com auxílio de vórtex por dois minutos e centrifugado novamente na mesma rotação anterior. Esse procedimento foi repetido três vezes.

4.2.2.2. Limpeza do extrato

Para a limpeza da amostra, foram adicionados 20 mL de hexano (Merck). O frasco foi agitado manualmente, de modo que as duas fases se misturassem de forma eficiente. Em seguida o frasco foi mantido em repouso por aproximadamente um minuto para a separação das fases. A fase superior, que apresentou coloração verde intensa pela presença de clorofila, foi extraída cuidadosamente da mistura com auxílio de uma pipeta de pasteur e descartada. O procedimento de limpeza do extrato foi repetido mais uma vez, usando 10 mL de hexano. Em seguida o solvente foi evaporado em chapa quente (60 °C) e jato de gás nitrogênio (1 hora e 30 minutos). Os frascos (encobertos em papel alumínio) contendo o resíduo seco foram tampados e estocados por 24 h a -20°C para posterior análise por HPLC (HPLC- *High Performance Liquide Chromatography*).

4.2.2.3. Preparo das amostras para injeção por HPLC

Antes da injeção por HPLC, o resíduo seco foi reconstituído com 6,8 mL de EtOH 15%. O frasco foi vortexado por 1 minuto para que o extrato desprendesse totalmente da parede do tubo e então submetido a banho de ultrassom onde permaneceu por quatro minutos. O procedimento foi repetido para assegurar a total recuperação do extrato. Em seguida, a amostra foi transferida para microtubos tipo *ependorf* de 2,0 mL e centrifugado por 15 minutos a 25 °C a 13.400 rpm. O sobrenadante do material centrifugado foi acondicionado em frasco de 2 mL, e posteriormente utilizado para injeção em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Varian®), com bomba ternária, mostrador automático e detector de arranjo de fotodiodos acoplados (PDA Varian® PS-240/PS-410/ PS-335/Software Galaxie 1.9).

4.2.2.4. Análise por HPLC

A coluna utilizada foi a C18 Zorbax XDB Agilent (250 x 4,6 mm, 5µm), sem coluna de guarda. Como fase móvel foi empregada acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico 0,02% (J.T.Baker). As condições de análise foram: acetonitrila durante 0 minutos a 13 %; durante 6-9 minutos a 15 %; por 17 minutos a 17 %; durante 28-33 minutos a 28 %; durante 40 minutos a 50 %; durante 45 minutos a 60 %; durante 46-48 minutos a 80 %; durante 49-54 minutos a 13%; fluxo de 1,0 mL/minuto. A absorção UV foi monitorada a 308 nm, 280 nm e

também no comprimento de máxima absorção de cada eluente (DAD); o volume de injeção do que da amostra foi de 10 µL.

O pico do resveratrol no extrato foi identificado por comparação com o tempo de retenção do padrão comercial adquirido. As soluções padrão de resveratrol (>99%, 230-240 µg/mL, Sigma-Aldrich) e fenolftaleína (>98%, 2927-2835 µg/mL, Sigma-Aldrich) foram injetadas diariamente para verificação das áreas. Outras formas de identificação foram o espectro fornecido pelo detector de arranjo de diodos, e a quantificação foi realizada pela co-eluição com o padrão de resveratrol e comparação dos cromatogramas das amostras induzidas e controle, visto que após indução por UV ocorreu um aumento expressivo do pico no tempo de retenção correspondente ao do resveratrol.

Para ciência da concentração final de resveratrol por grama de folha, os resultados foram calculados de acordo com Potrebko & Resurreccion (2009).

4.2.3. Análise da expressão do gene da *resveratrol sintase*

4.2.3.1. Extração de RNA Total

O protocolo de extração de RNA foi baseado em Chang *et al.* (1993) com alterações. Foram extraídos RNA total de folhas de *Arachis* congeladas a -80°C obtidas em três experimentos biológicos independentes, nos quais foram obtidas amostras induzidas por UV e as amostras controle. Cada amostra foi subdividida em três sub amostras (triplicatas técnicas). As folhas congeladas (300 mg) foram trituradas com nitrogênio líquido e logo após foi adicionado 900 µL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA, 2mM NaCl, 0,5 g/L espermidina, água DEPC e beta-mercaptoetanol a 2% adicionado ao tampão imediatamente antes do uso) pré-aquecido durante cinco minutos. Os tubos foram misturados em vórtex e incubados em banho-maria a 60°C por 10 minutos. Nessa fase ocorreu a liberação dos componentes celulares no tampão de extração por lise das membranas. Para separar a solução em fases aquosa e orgânica, foi adicionado 700 µL de CIA (24 Clorofórmio: 1 álcool isoamílico), misturado e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante, fase aquosa contendo o RNA, foi transferido para outro tubo onde repetiu-se o procedimento. Depois da remoção dos restos celulares e precipitação das proteínas desnaturadas por centrifugação, foi realizado o fracionamento do RNA por solubilização diferencial sob alta concentração de sal, adicionando ¼ do volume da solução do tubo de LiCl (4M). Depois de duas horas as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm

por 30 minutos a 4°C. O RNA foi recuperado adicionando-se 500 µl de álcool 70% e centrifugando-se a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e depois de seco, o precipitado foi ressuspensionado em 20µl de água DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase) autoclavada.

Para verificar a quantidade do RNA total extraído foi feita uma quantificação a 260nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific). Também foi estimada a quantidade por meio da relação 260/280 nm ($> 1,8$). Para análise da integridade do material extraído, o RNA foi submetido à análise de eletroforese em gel de agarose 1,5%, não desnaturante, que foi corado com brometo de etídio, com tampão de corrida TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1% e voltagem de 60 V, por aproximadamente 60 minutos.

Para purificar as amostras extraídas, o RNA foi tratado em colunas do Kit Invisorb® Spin Plant RNA Mini (Invitex), adicionando-se 900 µL da solução de lise DCT, agitando-os manualmente. As amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente, formando um *pellet* gelatinoso e transparente. O sobrenadante foi transferido, para o pré-filtro contido em um tubo receptor de 2,0 ml, os quais foram centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto. Ao filtrado foi adicionado 500 µL de etanol absoluto. Transferiu-se 750µL desse filtrado para o filtro RTA *spin*, e depois foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o filtrado, e retornou o filtro RTA *spin* ao seu tubo receptor RTA. Repetiu-se essa etapa. Ao filtro RTA *spin*, adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem R1. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 segundos e descartou-se o filtrado. Ao filtro RTA *spin* adicionou-se 700 µL do tampão de lavagem R2 e centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 segundos, descartando o filtrado. Esta etapa de lavagem com o tampão R2 foi repetida mais uma vez para eliminar qualquer traço de etanol, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos. O filtro RTA *spin* foi transferido para o tubo de eluição livre de RNase, onde foram adicionados 30-60 µL (dependendo do volume de RNA inicial usado) do tampão de eluição R. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto .

Mais uma vez as amostras foram avaliadas tanto em relação à quantidade (espectrofotômetro Nanodrop) quanto à qualidade (eletroforese em gel de agarose).

4.2.3.2. Tratamento com DNase e síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram tratadas com desoxirribonuclease (TURBO™ DNase, Ambion® - Applied Biosystem™) para eliminação de eventuais contaminações com DNA genômico. De cada amostra, foi retirado 2 µg de RNA aos quais foram adicionado 2 µL

de DNase, que foram incubados a 37°C por uma hora. Após a incubação a DANse foi desativada adicionando-se 2,5 mM de EDTA a cada tubo e incubando-os por 10 minutos a 65°C.

Livre de contaminações por DNA, as amostras foram submetidas à síntese de cDNA. Ao tubo, foi adicionado 1 µL de Anchored Oligo (dT)20 50mM (*Invitrogen*TM) e 1 µL de dNTP 10mM, e em seguida cada tudo foi incubado a 65°C por 5 minutos e depois no gelo por mais 5 minutos. Foi adicionado em seguida 4 µL do tampão 5X FS (*First Strand Buffer*), 2 µL de DTT 0,1M e 1 µL da enzima transcriptase reversa SuperScript III (*Invitrogen*TM), e incubou-se a 42°C por 60 minutos. Para a inativação da enzima, as amostras foram aquecidas a 70°C por 15 minutos.

Para corroborar a eficácia da reação de síntese de cDNA, realizou-se uma PCR, utilizando-se um par de *primers* para o gene Actina C24 (F: GAGCTGAAAGATTCCGATGC, R: GCAATGCCTGGGAACATAGT) que flanqueiam uma região intrônica conservada em *Arachis* (Hougaard *et al.*, 2008; Morgante *et al.*, 2011). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 13,5 µL, contendo tampão MgCl₂ 1X; 1,44 mM de dNTP 2,44 mM; BSA 0,5 mg/ml; 0,15 µM de cada par de *primer*; 1,5 µL da enzima *Taq* DNA Polimerase Recombinante (*Invitrogen*TM®) e 1 µL de cDNA. Esta reação foi realizada no termociclador Master Cycler (*Eppendorf*), sendo submetida a 94°C por 5 minutos, para uma desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de amplificação: 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e a um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídio.

4.2.3.3. PCR quantitativo com transcrição reversa (RT-qPCR)

Para análise da expressão gênica foi utilizado o sistema F7300 Real Time PCR (*AppliedBiosystem*) com detecção de fluorescência SYBR Green (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi realizada em 10 µL contendo o cDNA de fita simples (diluído 10⁻²), água estéril e Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG w/ROX kit (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) e solução contendo um par de *primers* (10 µM). Os genes utilizados como referência foram os que codificam as seguintes proteínas: ribossomal 60S (C43) (F: GAGCTGAAAGATTCCGATGC; R: GCAATGCCTGGGAACATAGT) e ubiquitina (UBI2) (F: AAGCCGAAGAAGATC AAGCAC; R: GGTTAGCCATGAAGGTTCCAG) baseado nos estudos de Morgante *et al.*, 2011 e Luo *et al.*, 2005, respectivamente.

Os nove pares de *primers* para identificação de sequências de *resveratrol sintase* utilizados neste estudo (Tabela 2) foram desenvolvidos pelo grupo de *Arachis* da Embrapa Cenargen (dados não publicados), cujas eficiências foram calculadas pelo programa Real Time PCR Miner 2.2 (Zhao & Fernald, 2005).

Para cada amostra foram realizadas três repetições analíticas independentes. Como controle negativo dessas reações, utilizou-se para cada par de *primers* testado, o NTC (*No template Control*) composto pelo mesmo *mix* de reação utilizada nas demais amostras, porém sem a adição da fita molde. As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e por fim, uma curva de dissociação de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e 95°C por 15 segundos. O resultado da reação foi expresso em valor de CT (valor referente ao número de ciclos necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção) que foram calculados pelo programa Real Time PCR Miner 2.2 (Zhao & Fernald, 2005) a partir dos valores de fluorescência das reações. Os resultados individuais expressos em valores de CT foram agrupados de acordo com a espécie analisada e o tratamento (tratado e não tratado) para realização da análise estatística.

Os valores de expressão relativa, isto é, quantas vezes o gene foi mais expresso nas amostras tratadas com UV do que nas amostras não tratadas, foram normalizados com os genes de referência (genes codificadores das proteínas ribossomal 60S (F:TGG AGTGAGAGTGCATTTG/R:TCTTTTGACGACCAGGGAAC), UBI2 (F: AAGCCGA AGAAGATCAAGCAC/R:GGTTAGCCATGAAGGTTCCAG) para anular qualquer variação ocorrida não pelo tratamento. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl *et al.*, 2002).

Tabela 2- Sequências dos pares de *primers* desenhados a partir da árvore filogenética desenvolvida pelo grupo de *Arachis* da Embrapa Cenargen (dados não publicados). Pares de *primers* identificados como RSGbAhT ou como RSGbAsA foram desenhados utilizando-se sequências gênicas de *resveratrol sintase* de *A. hypogaea* (Ah); pares de *primers* identificados como RSGbAsA ou como RSGbAsA foram utilizando-se sequências de *resveratrol sintase* de *A. stenosperma* (As).

Nome do primer	Sequência 5'-3'	Tamanho primer (bp)
RSGbAhT14	F: GGCGTTGCATTGCCTGGTGTG	22
	R: CAGCCAAGTCCTTAGCCAAGCG	22
RSArAhT5	F: TCCTAACATGTGCGCATACAA	21
	R: GTTGCAGCCTCTTTTCCAAC	20
RSArAhT6	F: CAAGGGTATTGATGGATGTGAA	22
	R: AACGACGGTGCCTTATATGC	20
RSGbAhT8	F: TCCGTCCGTGAAGAGGTACATG	22
	R: AACCACCAGCACACGAGCAC	20
RSArAs1	F: TCCTAACATGTGCGCATACAA	21
	R: TTGCAGCCTCTTTTCCAAC	20
RSArAs2	F: TCCTAACATGTGCGCATACAA	21
	R: CAGCCTCTTTTCCAAC	20
RSArAs6	F: AGGAGAATCCTAACATGTGC	20
	R: GTTGCAGCCTCTTTTCCAAC	20
RSGbAsA6b	F: CCTGGCGTTGATTACGAACT	20
	R: AGCAGCCTTGGTGGTACATC	21
RSGbAsA12	F: CCGTCCGTGAAGAGGTACATG	21
	R: AACCACCAGCACACGAGCAC	20

4.2.4. Análise dos resultados

4.2.4.1. Análise de conteúdo de resveratrol

Para comparar a produção de resveratrol utilizou-se um modelo linear misto. As médias foram comparadas através da Análise de Variância atribuindo efeito aleatório entre os grupos de plantas ao longo do tempo (blocos), com o intuito de filtrar a variabilidade observada devido a estas repetições. A análise foi desenvolvida no programa de linguagem estatística R, livre para download no sitio <http://www.r-project.org/>. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.2.4.2. Comparação entre expressão de RS e produção de resveratrol

Foi usado um modelo de regressão mista para relacionar os resultados de resveratrol e a expressão relativa de *resveratrol sintase*.

5.0. Resultado e discussão

5.1. Análise das concentrações de resveratrol entre espécies e entre acessos

Foram avaliadas as concentrações de resveratrol inicialmente nas espécies submetidas exclusivamente a análise de concentração de resveratrol, que tiveram suas folhas submetidas a tratamento com luz UV totalizando em dez acessos de quatro espécies (*A. hypogaea*, *A. stenosperma*, *A. wiliamsii* e *A. valida*). Em todas as amostras induzidas pelo tratamento foi encontrado resveratrol (Tabela 3, Figura 5) e não houve diferença significativa entre as concentrações de resveratrol para os mesmos genótipos submetidos ao tratamento em momentos diferentes (repetições biológicas) bem como não houve diferença significativa entre as concentrações de resveratrol para as repetições técnicas das análises de cada amostra. Os teores variaram de 62,1 µg/g em *A. hypogaea* (runner) a 512,56 µg/g em *A. stenosperma* V10309. Por outro lado, em todas as amostras controle de todas as espécies analisadas os teores de resveratrol foram tão baixos que apenas traços foram detectados. Vários estudos demonstraram também que após o tratamento com UV as concentrações de resveratrol aumentaram em relação às amostras não submetidas ao tratamento (Chung *et al.*, 2003; Potrebko & Resurreccion, 2009; Sales & Resurreccion 2009, 2010; Tang *et al.*, 2010). Sabe-se que as concentrações de resveratrol em diferentes tecidos de plantas de amendoim sem qualquer tipo de tratamento (estresse biótico ou abiótico) são extremamente baixas (Dorner *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003; Resurreccion *et al.*, 2009; Nepote *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2000). Lopes (2011) ao analisar diferentes espécies do gênero *Arachis* também encontrou elevadas concentrações de resveratrol em amostras tratadas com UV e valores baixos ou apenas traços detectados pelo HPLC quando analisadas as amostras do grupo controle. Nossos resultados e os de Lopes (2011) demonstram que todas as espécies silvestres da seção *Arachis* que foram testadas até o presente momento produzem resveratrol, sugerindo que todas as espécies dessa seção são capazes de produzir resveratrol mediante estresse. Em alguns casos, determinado composto pode ser característico entre as espécies do gênero, como é o caso de determinadas classes de diterpenos no gênero *Baccharis* (Verdi *et al.*, 2005) e de lectinas como uma classe de proteínas que caracteriza as sementes das espécies da tribo Diocleae (família das Leguminosas) (Oliveira *et al.*, 1990). Portanto, de acordo com a literatura podemos supor que o resveratrol pode ser produzido por todas as espécies e espécies próximas do gênero *Arachis*.

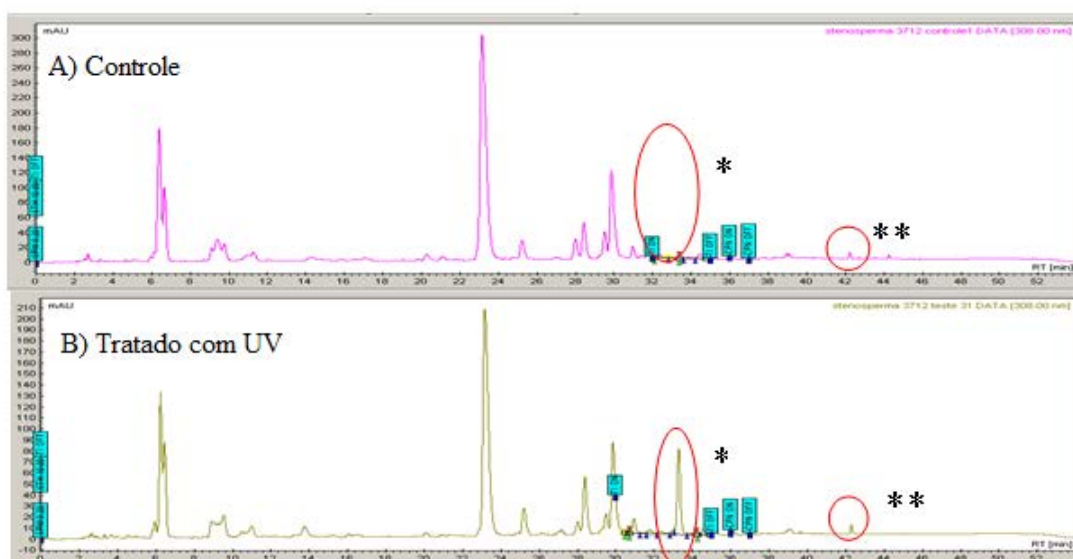


Figura 5- Cromatogramas de extratos obtidos de folhas de *A. stenosperma* acesso V3712 controle e tratado. Na Figura 5A pode ser observado o cromatograma da amostra não tratada com UV, na qual apenas é observado o pico da fenolftaleína (**) e na 5B o cromatograma da amostra tratada com UV e os picos de resveratrol* e de fenolftaleína**.

Tabela 3- Espécies analisadas para avaliação do teor de resveratrol entre espécies e entre acessos, tipos de genomas de cada uma delas, identificação dos acessos e médias das concentrações encontradas em folhas tratadas com UV.

Espécie	Genoma	Acesso/ cultivar	Quantidade de Resveratrol em $\mu\text{g/g}$ (desvio padrão)
<i>A. hypogaea</i>	AABB	BR-1	477,31 $\pm$ 80,76
<i>A. hypogaea</i>	AABB	IAC Caiapó	185,99 $\pm$ 55,86
<i>A. hypogaea</i>	AABB	Tatu	206,49 $\pm$ 63,27
<i>A. hypogaea</i>	AABB	IAC Runner	62,1 $\pm$ 20,81
<i>A. stenosperma</i>	AA	V 10229	422,18 $\pm$ 81,79
<i>A. stenosperma</i>	AA	V 10309	512,56 $\pm$ 96,12
<i>A. stenosperma</i>	AA	V 15076	412,25 $\pm$ 69,76
<i>A. stenosperma</i>	AA	S 3712	336,14 $\pm$ 47,72
<i>A. wiliamsii</i>	BB	W 1118	120,24 $\pm$ 30,84
<i>A. valida</i>	BB	V 13514	170,76 $\pm$ 74,71

A partir da análise dos cromatogramas obtidos foi possível perceber que além do resveratrol, o tratamento da amostra com radiação UV induziu a produção de outros compostos não identificados, provavelmente outras fitoalexinas. De acordo com dados da literatura, as fitoalexinas mais prevalentes em folhas de espécies de *Arachis* são resveratrol, dimetilmedicarpina, formononetina, 7,4'-dimetoxi-2'-hidroxisoflavanona e medicarpina (Edwards *et al.*, 1991).

Os valores das concentrações de resveratrol nos quatro cultivares de *A. hypogaea* analisados são apresentados na Figura 6. A cultivar BR-1 foi o que atingiu maior concentração (477,31 $\mu\text{g/g}$) de resveratrol em relação às demais cultivares analisadas. Caiapó e tatu apresentaram concentrações em torno de 200 $\mu\text{g/g}$ e runner apresentou a menor média de resveratrol (62,1 $\mu\text{g/g}$). Vários estudos têm sido realizados para avaliação do teor de resveratrol em amendoim (Chang *et al.*, 2006; Lopes 2011; Sales & Resurreccion, 2009; Tang *et al.* 2010) e os valores variam de 668,7 $\mu\text{g/g}$ em folhas induzidas por UV (Lopes, 2011) a 3,3 $\mu\text{g/g}$ em sementes induzidas por UV (Sales & Resurreccion, 2009). Portanto, os valores encontrados nos diferentes cultivares de *A. hypogaea* analisados no nosso estudo são semelhantes aos previamente relatados folhas de amendoim também induzidas por UV. As variações observadas podem ser devido a pequenas diferenças na metodologia ou a diferenças

em função das idades das plantas analisadas em nosso experimento e no de Lopes (2011) ou ainda em função da época do ano em que as plantas foram cultivadas e o solo utilizado.

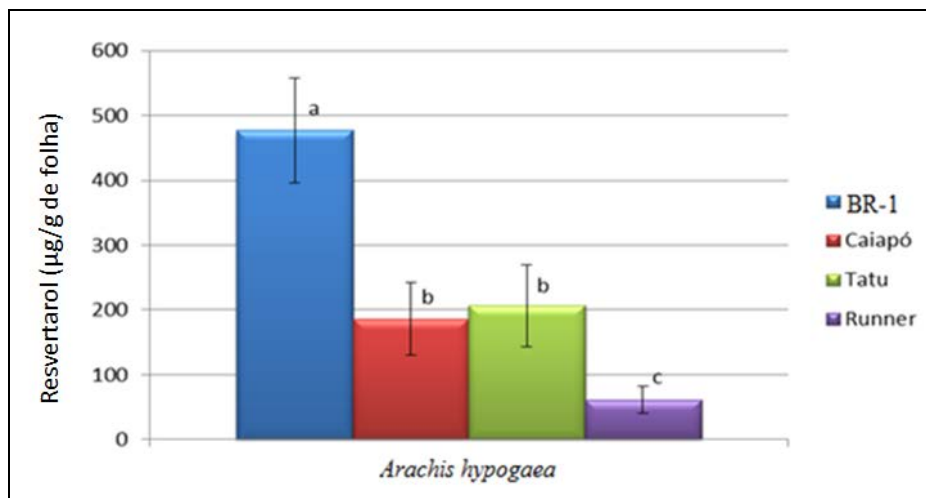


Figura 6- Média das concentrações de resveratrol (µg/g) encontradas em folhas de quatro cultivares de *A. hypogaea* submetidas ao UV.

A cultivar BR-1, que apresentou o maior teor de resveratrol, apresenta alta resistência a estresse hídrico (Nogueira & Santos, 2000) e é a mais adaptável e estável em diferentes ambientes de cultivo (Gomes *et al.*, 2007). Por outro lado, Godoy *et al.* (1999) demonstraram que a cultivar runner foi a mais suscetível às doenças foliares entre duas cultivares analisadas. As cultivares tatu e caiapó estiveram presentes em maioria dos estudos citados, porém com comportamento mediano em relação à resistência. A relação entre produção de resveratrol e resistência a fungos foi demonstrada por Sobolev *et al.* (2007). Apesar de não ter sido realizado nenhum teste de resistência ou tolerância a estresses bióticos ou abióticos nos acessos analisados, o fato dos teores de resveratrol encontrados nas amostras analisadas coincidirem com os níveis de resistência ou tolerância a outros estresses sugere que o resveratrol pode ter um papel no nível de resistência observado. Desse modo, estudos prévios sobre resistência a estresses bióticos e abióticos realizados em diferentes cultivares de *A. hypogaea* podem contribuir no direcionamento de estudos futuros para identificação de cultivares que produzam resveratrol em teores mais elevados que os observados até o momento.

A variação na concentração de resveratrol entre os acessos de *A. stenosperma* não foi tão ampla quanto à observada em amendoim, variando de 336,14 µg/g no acesso S3712 a 512 µg/g no acesso V10309. Como pode ser observado na Figura 7, o teste de análise de variância

demonstrou que não houve diferença significativa entre os acessos V15076, V 10229 e V10309 e que diferença significativa foi observada apenas entre os acessos V10309 e S3712. Este é o primeiro estudo de variação no teor de resveratrol entre acessos de uma espécie silvestre do gênero *Arachis* e por isso não existem dados prévios para comparação com os obtidos nesse estudo e, portanto, nenhuma inferência sobre a amplitude da variação no resveratrol entre acessos de *A. stenosperma* pode ser feita. Por outro lado, a alta variabilidade foi demonstrada entre acessos de *A. stenosperma* avaliados para diferentes características. Por exemplo, as resistências aos fungos causadores da mancha preta e ferrugem foram avaliadas entre oito acessos de *A. stenosperma* e a resposta de cada acesso foi bastante variada em relação à infecção (Fávero *et al.*, 2009). Uma vez que a alta variabilidade também é observada entre os acessos de espécies da seção *Arachis* para várias características, provavelmente a variação no teor de resveratrol deve ocorrer entre acessos de outras espécies da seção *Arachis* também, sugerindo que a análise de um maior número de espécies e acessos pode resultar na identificação de níveis maiores de resveratrol dos que os já relatados até o momento.

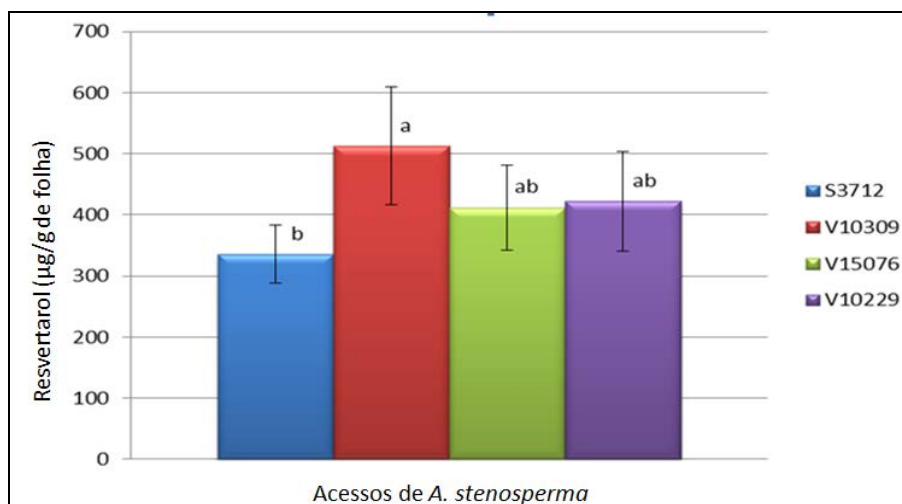


Figura 7- Médias das concentrações de resveratrol (µg/g) encontradas em folhas induzidas por UV de quatro diferentes acessos de *A. stenosperma*.

A variação no teor de resveratrol por entre as espécies é apresentada na Figura 8. Os teores mais elevados de resveratrol foram encontrados em *A. stenosperma* (420,78 µg/g). Em seguida veio *A. hypogaea* (232,97 µg/g), *A. valida* (170,76 µg/g) e *A. williamsii* (120,24 µg/g). *Arachis stenosperma* é uma espécie reconhecida por sua resistência a muitas doenças economicamente importantes, tais como ferrugem e nematoides (Subrahmanyam *et al.*, 1985;

Proite *et al.*, 2007, 2008; Leal-Bertioli *et al.*, 2009) e parte dessa resistência pode estar relacionada a produção de resveratrol, uma vez que resveratrol foi correlacionado a maior resistência de cultivares de amendoim a doenças fúngicas (Sobolev *et al.*, 2007).

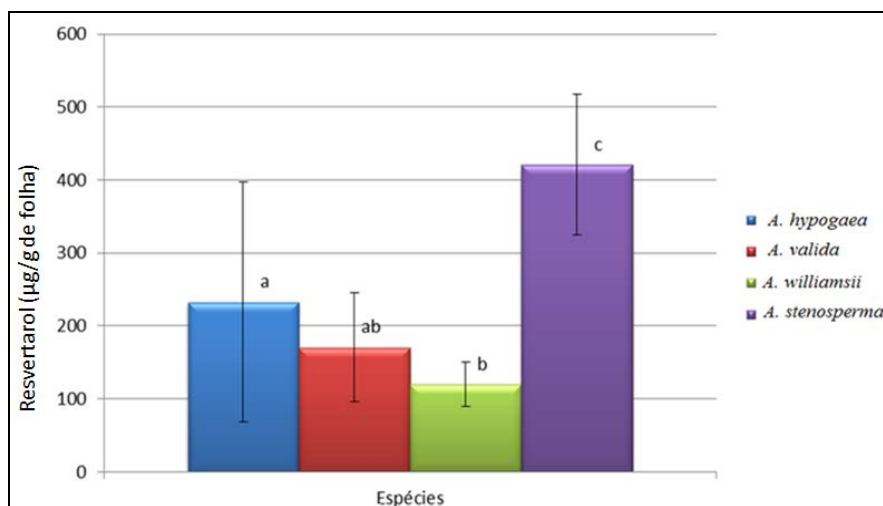


Figura 8- Médias das concentrações de resveratrol (µg/g) encontradas em folhas induzidas por UV de quatro diferentes espécies da seção *Arachis*, do gênero *Arachis*.

O amendoim é um alotetraploide de genoma AABB, que se originou de um cruzamento entre parentais de genoma AA e genoma BB (Fernández & Krapovickas, 1994; Kochert *et al.*, 1996; Seijo *et al.*, 2004; 2007). *Arachis stenosperma*, espécie portadora do genoma AA, foi a que apresentou teores significativamente maiores de resveratrol em relação à *A. hypogaea*, espécies portadora de genoma AABB e que foi o segundo nas análises em relação ao teor de resveratrol, e de *A. valida* e *A. williamsii*, ambas portadoras de genoma BB (Figura 9). Lopes (2011) ao comparar a produção de resveratrol entre espécies de genoma AA, BB e AABB, também observou que as espécies de genoma AA produzem concentrações de resveratrol significativamente maiores que os demais genomas analisados. No trabalho de Lopes (2011) *A. ipaënsis*, o doador do genoma BB para *A. hypogaea* (Bechara *et al.*, 2010; Grabiele *et al.*, 2012), também apresentou baixas concentrações de resveratrol em comparação com as outras espécies analisadas. Estudos filogenéticos mostraram que *A. ipaënsis* está intimamente relacionada com *A. valida* e *A. williamsii* (Cunha *et al.*, 2008; Bechara *et al.*, 2010) e essas espécies têm muitos acessos disponíveis. Além das espécies de genoma BB analisadas existem outras como *A. magna* e *A. batizocoi* (Fernández & Krapovickas, 1994; Lavia, 1999) das quais também estão disponíveis muitos acessos. Portanto, é provável que entre os acessos de espécies de genoma BB exista um ou vários

acessos com capacidade de produzir resveratrol em concentrações superiores às observadas até o momento. Nenhuma informação sobre variação na produção de resveratrol entre acessos de espécies do genoma BB está disponível, mas variação entre espécies existe e foi demonstrada nesse estudo e no de Lopes (2011).

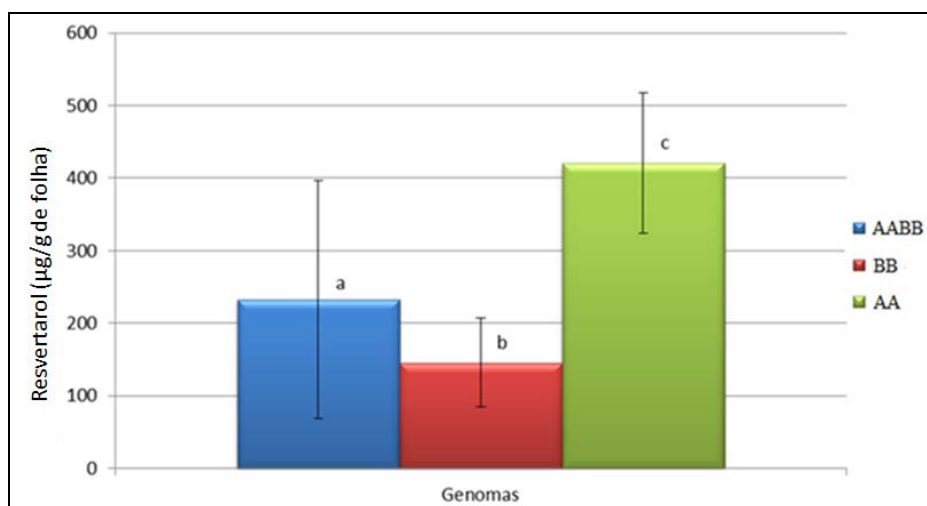


Figura 9 - Concentração de resveratrol (µg/g) encontrada em folhas induzidas por UV em acessos de espécies de genoma AA (*A. stenosperma*, 6 acessos analisados), genoma BB (*A. valida*, 1 acesso analisado, *A. williamsii*, 1 acesso analisado) e ABBB (*A. hypogaea*, 1 acessos analisado).

No geral, os níveis de resveratrol entre *A. hypogaea* e seus progenitores diferiram e não necessariamente foi maior no cultivado, o que poderia acontecer em função da poliploidização. Fávero *et al.* (2009) ao avaliarem resistência aos fungos causadores de manchas foliares *Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum* e *Puccinia arachidis* afirmam que as espécies do genoma BB não apresentaram diferença significativa entre os valores de resistência apresentados por espécies do genoma AA, e que ambos são significativamente mais resistentes que *A. hypogaea*, isto é, a poliploidização não teve como consequência elevação do nível de resistência no cultivado. As causas desses efeitos não aditivos podem ser muitas e estudos relacionados à poliploidização de plantas propõem que podem ocorrer mudanças em determinados genes durante esse evento, como, por exemplo, perda da função reguladora (Moore & Purugganan, 2005), terem novas funções adquiridas (Wolfe, 2001) ou que alelos novos surjam (Wendel, 2000). As espécies e acessos analisados tiveram diferentes respostas ao mesmo tratamento com UV e tempo de coleta (Tabela 03). Até o momento não somente o estudo de Lopes (2011) descreve o comportamento de algumas

espécies silvestres de *Arachis* ao UV. A resposta ao UV depende da percepção da planta a esse tipo de radiação, dos mecanismos de transdução de sinal e de modificações na expressão gênica (Boeger *et al.*, 2006). A literatura mostra que as correlações entre a produção de flavonoides e sensibilidade ao UV podem ocorrer em várias espécies (Caldwell *et al.*, 1989) isso porque em espécies onde a produção de flavonoides é mais baixa a sensibilidade aos raios UV e consequentemente os danos causados por essa são maiores (Li *et al.*, 1993; Lois & Buchanan, 1994). Alguns flavonoides atuam em conjunto com outros compostos fenólicos para proporcionar um filtro solar UV absorvente que limita a penetração de radiação UV nos tecidos foliares (Caldwell *et al.*, 1989). Outra provável causa de variação na percepção de planta é a ampla variação observada em caracteres morfológicos de folhas de espécies de *Arachis*. Não existe nenhum estudo sobre morfologia e percepção a UV, mas sabe-se que existe uma correlação positiva entre tolerância a frio e calor e a espessura da folha, indicando que quanto mais espessa a folha menor a injúria ou maior a tolerância a esses estresses (Nautiyal *et al.*, 2008). Estudos relacionados à síntese de fitoalexinas em duas espécies nativas tropicais da família *Rubiaceae*, revelaram que as diferenças anatômicas entre as folhas de cada espécie, bem como as diferentes substâncias químicas encontradas em cada uma delas, causaram diferenças quanto à capacidade de produzir fitoalexinas quando inoculadas com fungos (Braga *et al.* 1991, 1998).

5.2. Avaliação do comportamento de transcritos de *resveratrol sintase* em função da produção de resveratrol

Três espécies da seção *Arachis* (*A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis*) e em um anfidiploide sintético (resultado do cruzamento artificial entre *A. duranensis* e *A. ipaënsis*) foram avaliadas para as concentrações de resveratrol bem como foi realizado um estudo referente à expressão gênica relativa de diferentes transcritos de *resveratrol sintase*.

5.2.1. Teor de resveratrol

Os resultados apresentados na Figura 10 apresentam as diferentes concentrações de resveratrol encontradas entre as quatro amostras analisadas após tratamento com UV. Em todas as amostras que não foram submetidas ao tratamento por UV foram detectadas apenas traços de resveratrol, não permitindo a quantificação. Por outro lado, nas folhas de todas as espécies e do anfidiploide, tratadas por UV, foram encontradas concentrações elevadas de

resveratrol. *Arachis duranensis* apresentou teor de resveratrol de 371,97 $\mu\text{g/g}$ que foi significativamente maior em relação às outras três amostras avaliadas. *Arachis ipaënsis* e *A. hypogaea* não apresentaram diferenças significativas quanto à produção do composto, 225,85 $\mu\text{g/g}$ e 211,73 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. O anfidiplóide foi o que apresentou teores significativamente menores de resveratrol entre as espécies estudadas, com concentração igual a 193,66 $\mu\text{g/g}$. Os parentais do amendoim cultivado (*A. duranensis* e *A. ipaënsis*) apresentam maiores concentrações de resveratrol que os tetraploides originados pela tetraploidização destes, indicando que durante o evento de tetraploidização pode ter ocorrido eventos que comprometeram a funcionalidade destes, como já descrito acima.

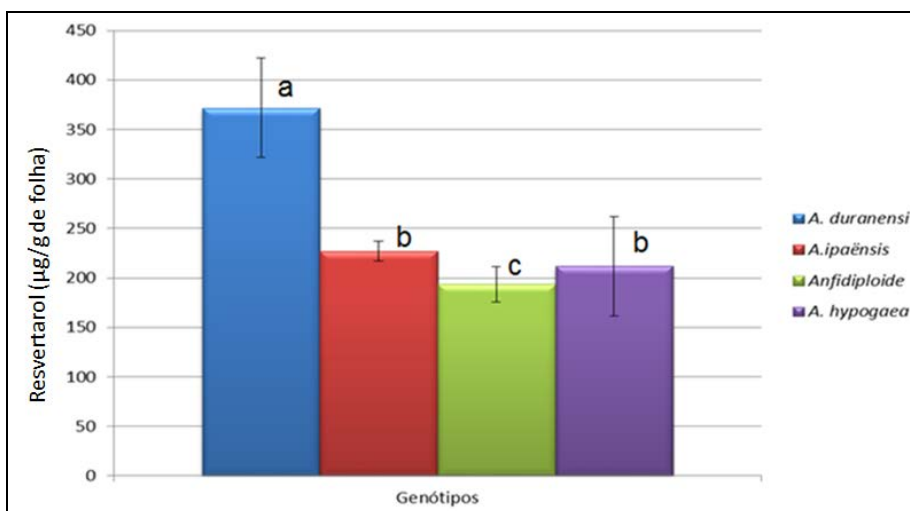


Figura 10- Concentração de resveratrol ($\mu\text{g/g}$) em folhas de *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, anfidiplóide e *A. hypogaea* (runner) submetidas à radiação UV. As legendas “a”, “b”, e “c” demonstram que houve diferença significativa entre os grupos que as contêm.

Para *A. hypogaea*, seus parentais (*A. duranensis* e *A. ipaënsis*) e o anfidiplóide sintético, também foi realizado o estudo referente expressão relativa da *resveratrol sintase* (RS) como veremos a seguir.

5.2.2. Análises de expressão gênica relativa de *resveratrol sintase*

Grande quantidade de RNA total foi obtido das extrações de folhas de *A. hypogaea*, *A. ipaënsis*, *A. duranensis* e do anfidiplóide tratadas e não tratadas, de acordo com quantificação por espectrofotometria e gel de eletroforese não desnaturante a 1,5% (Figura 11). As

concentrações variaram entre 712 ng/μL em *A. ipaënsis* não tratado com UV a 1749,8 ng/μL em amostra de anfidiplóide tratado com UV.

A qualidade do cDNA sintetizado de cada amostra de RNA total foi avaliada pela técnica de PCR utilizando o par de *primers* que codificam a proteína 60S ribossomal (Figura 12). Essa análise permite a identificação de eventuais contaminações com DNA genômico nas amostras de cDNA, o que pode comprometer a análise pela técnica de RT-qPCR gerando falsos positivos. Pode-se verificar que o tratamento das amostras com DNAses durante a síntese de cDNA foi eficiente, pois nenhuma contaminação por DNA foi identificada, garantindo que as amostras de cDNA apresentam qualidade suficiente para serem submetidas à técnica de RT-qPCR.

Para uma análise eficiente da expressão relativa de um gene é necessário que os pares de *primers* dos genes de referência e dos genes alvo, no caso os de *resveratrol sintase*, desempenhem com qualidade seu objetivo. Os genes de referência, que funcionam como normalizadores da reação de RT-qPCR, selecionados de acordo com estudos de Morgante *et al.* (2011) como os mais indicados para as análises de RT-qPCR em *Arachis* (gene codificador da proteína ribossomal 60S e UBI2), foram eficientes em todas as reações de RT-qPCR realizadas neste estudo. A Figura 13 mostra o comportamento similar dos genes de referência para todos os quatro genótipos analisados e para as amostras tratadas e não tratadas com UV. Pode ser observado que a expressão dos dois genes não variou conforme o tratamento e/ ou genótipo, garantindo que os diferentes valores de expressão relativa encontradas em RT-qPCR são devidas exclusivamente a variações na expressão relativa dos alelos de *resveratrol sintase*.

O valor da eficiência dos pares de *primers* que foram utilizados na reação de RT-qPCR foi calculado pelo programa Miner e variou de 93% para o par de *primers* RSGbAhT8 a 98,7% para o par de *primers* RSGbAsA1. Os pares de *primers* para *resveratrol sintase* utilizados em nosso estudo foram primeiramente testados pela técnica de PCR e foi observado que todos os nove pares de *primers* amplificaram fragmentos de tamanho esperado e tiveram boa especificidade ao cDNA molde, isto é, não foram observadas bandas inespecíficas (Figura 14). A exceção foi o par RSGbAsA12, que levou a amplificação de mais de um fragmento, o que foi detectado em análise de curva de dissociação e por isso foi retirado das análises posteriores.

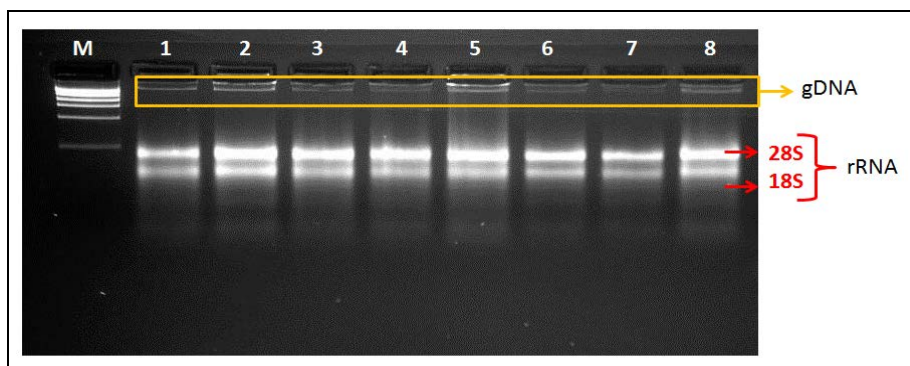


Figura 11- Gel não desnaturante de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, contendo RNA total de folha de *A. ipaënsis* e *A. duranensis* (1µL de RNA total/poço). Amostras no gel: M - Marcador molecular (1Kb Plus – Invitrogen); amostras de 1 a 3 - amostras de *A. ipaënsis* tratadas com UV do segundo experimento biológico; amostras de 4 a 6 - amostras *A. ipaënsis* não tratadas com UV do segundo experimento biológico; amostras de 7 a 8 - amostras de *A. duranensis* tratadas com UV do segundo experimento biológico.

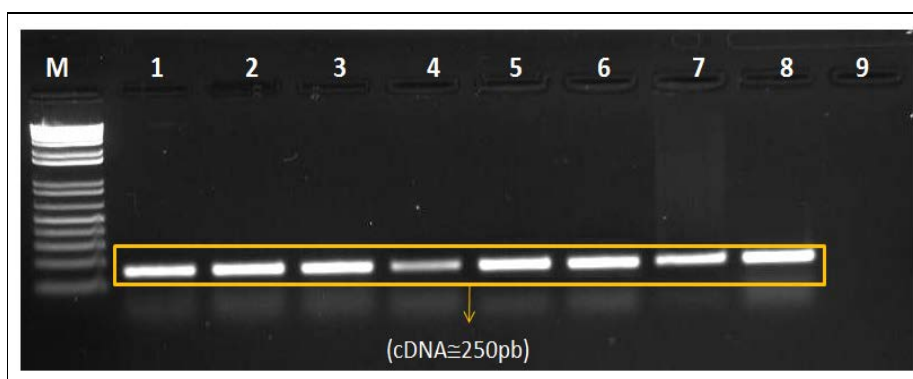


Figura 12- Gel não desnaturante de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR onde foram testadas amostras de cDNA sintetizadas. Amostras de 1 a 3 - produtos de PCR que tiveram como molde cDNA de anfidiploide não tratado com UV do terceiro experimento biológico; amostras de 4 a 6 - produtos de PCR que tiveram como molde cDNA de anfidiploide tratado com UV do terceiro experimento biológico; amostra 7 - controle no qual foi utilizado DNA genômico; amostras 8 - controle com cDNA de qualidade já conhecida; amostra 9 - controle sem cDNA molde. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1Kb Plus (Invitrogen).

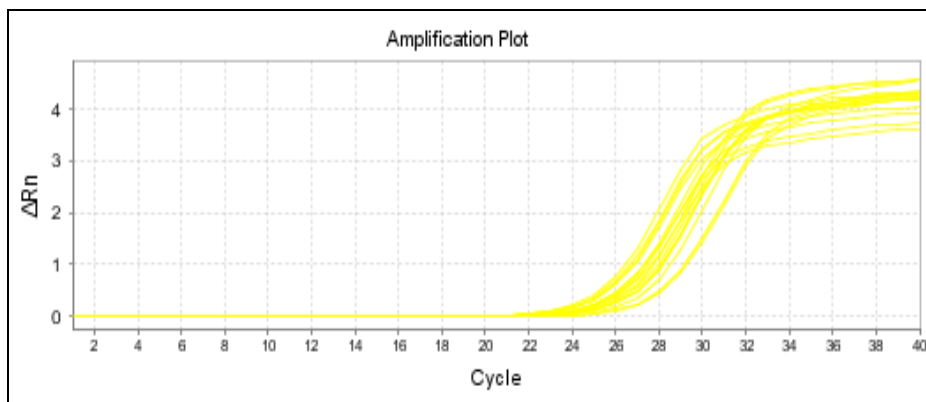


Figura 13- Curvas de amplificação obtidas pelas reações de RT-qPCR utilizando *primers* para o gene da proteína ribossomal 60S, que foi utilizado como gene referência para amostras tratadas e não tratadas com UV de *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e para o anfidiplóide sintético.

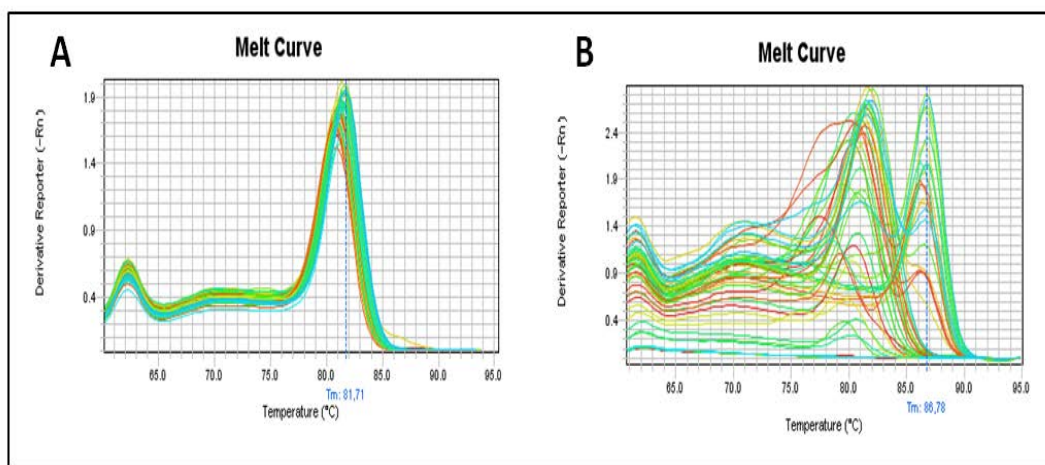


Figura 14- Curvas de dissociação (*melt curve*) obtidas para o produto de dois pares de *primers* utilizados neste estudo. A - Pode ser observado que com par de *primers* RSArAs2 apenas um pico foi detectado indicando a amplificação de um único fragmento específico; na Figura 14 B, pode ser observado que com o par de *primers* RSGbAsA12 foram observados vários picos indicando que o mesmo não foi específico.

A amplificação de fragmentos de tamanhos próximos ao esperado (150-200 pb) dos oito pares de *primers* em todas as três espécies estudadas (*A. hypogaea*, genoma AABB; *A. duranensis*, genoma AA; *A. ipaënsis*, genoma BB) e no anfidiplóide sintético (genoma AABB), sugere que os pares de *primers* desenvolvidos não são espécie e nem genoma específicos, uma vez que foram desenhados a partir de sequências de *A. hypogaea* (quatro

pares) e de *A. stenosperma* (cinco pares) e amplificaram em *A. duranensis* e *A. ipaënsis* no anfídiploide sintético. O estudo de espécies silvestres de *Arachis* com os pares de *primers* desenvolvidos para análise de locos microssatélites, tanto para regiões randômicas (Bravo *et al.*, 2006) quanto para gênicas, demonstraram que existem três tipos de pares de *primers* para *Arachis* de acordo com seus níveis de transferência para outras espécies : 1 – pares de *primers* que amplificam apenas no genoma AA; 2 – pares de *primers* que amplificam apenas no genoma BB; 3 – pares de *primers* que amplificam nos genomas A e B. Apesar do número reduzido de espécies analisadas de cada genoma, os resultados indicam que as sequências utilizadas para desenho dos pares de *primers* são de regiões presentes antes do surgimento dos diferentes genomas, e que foram conservadas desde então, sugerindo que sejam codificadoras de proteínas com funções biológicas importantes.

Os resultados de quantificação relativa obtidos por RT-qPCR são dados pela razão entre a expressão do gene-alvo (alelos de *resveratrol sintase*) e o gene de referência (60S e UBI2) no valor de 1. Dessa forma, 1 é o valor inicial comparativo, e portanto, todo valor encontrado por esta razão, acima de 1 entende-se que houve uma regulação positiva da expressão gênica, enquanto que um valor abaixo de 1, significa que houve uma regulação negativa da expressão gênica. Ao ser realiza as análises estatísticas foi observado que não existiu variação significativa entre os resultados de expressão relativa dos três experimentos biológicos realizados e nem nas repetições das análises de cada amostra (replicatas técnicas). Testes de significância demonstraram que dos oito pares de *primers* analisados, nenhum apresentou redução nas taxas de expressão, mas apenas RSGbAhT14, RSGbAhT5, RSGbAhT2 e RSGbAhT6 demonstraram aumento significativo dos níveis de transcritos das amostras tratadas com UV em relação as amostras controle (Figura 15). Pontin *et al.* (2010) ao analisar mudanças na expressão gênica de genes relacionados a produção de fitoalexinas em folhas de uva causada por tratamento com UV também não encontrou dentre os genes analisados em seu experimento algum que tivesse sua expressão regulada negativamente após o tratamento.

O aumento da expressão gênica relativa das amostras tratadas com UV em relação ao controle variaram de 1,7 em *A. hypogaea* utilizando o par de *primer* RSGbAhT14 a 116,71 em *A. ipaënsis* utilizando o par de *primer* RSGbAhT5. Em outros trabalhos em que foi avaliada a expressão gênica de *resveratrol sintase* inclusive em uva, foi observado também um aumento da expressão do gene em relação às amostras não tratadas após a indução do material por fatores bióticos e abióticos (Lanz *et al.* 1990; Chung *et al.*, 2003; Vannozzi *et al.*, 2012).

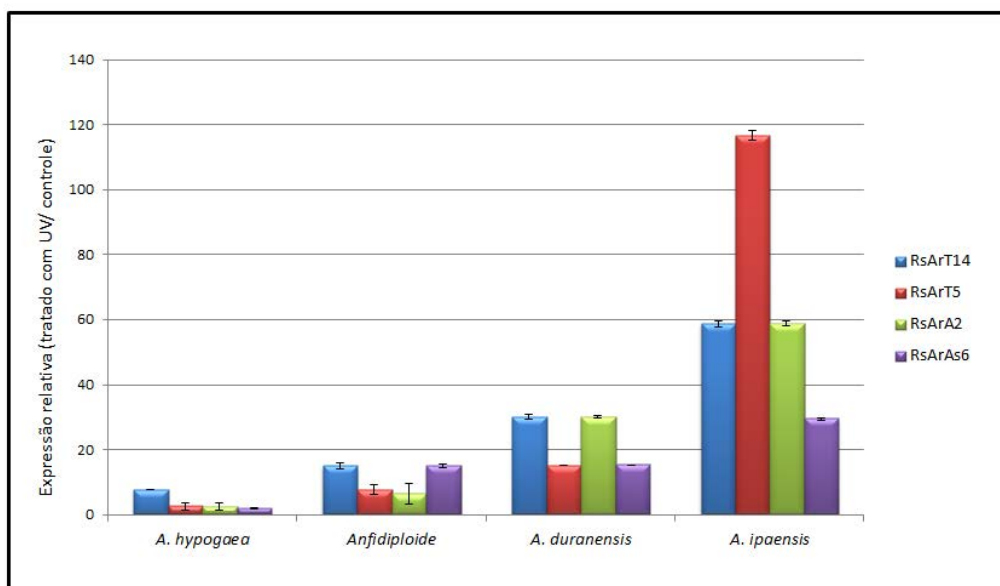


Figura 15- Alelos de *resveratrol sintase* que tiveram aumentos significativo da expressão relativa nas amostras tratadas com UV em relação ao controle identificadas pelos pares de *primers* RSGbAhT14, RSArAhT5, RSArAs2 e RSArAs6 em folhas de *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaensis* e anfidiplóide sintético. As barras de erros representam o desvio padrão observado entre as replicatas biológicas.

O alelo identificado pelo par de *primer* RSGbAhT14 foi o de maior expressão relativa em *A. hypogaea*, anfidiplóide e *A. duranensis*. RSArAs2 foi o segundo mais expresso em *A. hypogaea*, *A. duranensis* e *A. ipaensis*. Os pares de *primers* RSArAhT5 e RSArAs6 apresentaram comportamento aleatório nos quatro genótipos analisados.

As sequências de todos os pares de *primers* foram avaliadas utilizando-se o *Blastx*. RSGbAhT14 e RSArAs2 possuem alta similaridade com um alelo de *resveratrol sintase* de *A. hypogaea*, cuja função foi comprovada pela introdução desta sequência por meio de *Agrobacterium tumefaciens* em *Nicotiana benthamiana*, o que levou a síntese de resveratrol (Condori *et al.*, 2009). As sequências dos pares de *primers* RSArAhT5 e RSArAs6 tiveram homologia com uma chalcona sintase. Entretanto, como apenas as sequências dos pares de *primers* foram analisadas e não a sequência total do fragmento, estes podem ser alelos de *resveratrol sintase* não relacionados à produção de resveratrol em função do tratamento com UV. Análises em uva demonstraram que essa espécie possui uma família gênica de *resveratrol sintase* e que os diferentes alelos desta têm comportamentos diferentes diante diferentes estímulos (Vannozzi *et al.*, 2012; Jeandet *et al.*, 2012).

5.2.3. Correlação entre a concentração de resveratrol e a expressão relativa de *resveratrol sintase*

Uma vez que as amostras de *hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e anfidiploide sintético foram analisadas por HPLC e RT-qPCR, cada material possui dois valores, cada um referente às análises submetidas, um corresponde à concentração de resveratrol e outro a expressão relativa de *resveratrol sintase*. Utilizando esses dois valores, foi realizada uma análise estatística por componentes principais para verificar se existe relação entre eles. Para essa análise foram utilizados os resultados dos pares de *primers* RSArAs2, RSGbAhT14, RSArAs6, RSGbAhT5, pois estes apresentaram diferenças significativas na expressão relativa das amostras tratadas por UV em relação às amostras controle .

A resposta de cada um dos quatro genótipos ao UV foi refletida nas diferentes concentrações de resveratrol e nos diferentes níveis de expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados em 15 horas após o término do tratamento. Os resultados das concentrações de resveratrol quando analisados simultaneamente com os valores de expressão relativa detectados pelo par de *primers* RSArAs2, apresentaram uma relação positiva, isto é, as amostras de mesmo genótipo tiveram seus valores de resveratrol e expressão relativas muito similares o que levou a formação de um agrupamento. Resultados muito similares foram observados com o par RSGbAhT14 (Figuras 16 e 17). Nos gráficos formados é possível perceber que o anfidiploide sintético se comporta de maneira semelhante ao anfidiploide natural *A. hypogaea*, ou seja, uma baixa produção de resveratrol e de expressão relativa, quando comparado às outras duas espécies analisadas. *Arachis duranensis* apresentou maiores concentrações de resveratrol, porém os valores de expressão relativa não foram os maiores em relação aos quatro genótipos estudados. *Arachis ipaënsis* apesar de apresentar os maiores valores de expressão relativa, teve concentrações de resveratrol intermediárias. Portanto, os resultados indicam que os *primers* RSArAs2 e RSGbAhT14 identificam alelos de *resveratrol sintase* induzidos por UV cujas expressões são aumentadas em função do UV .

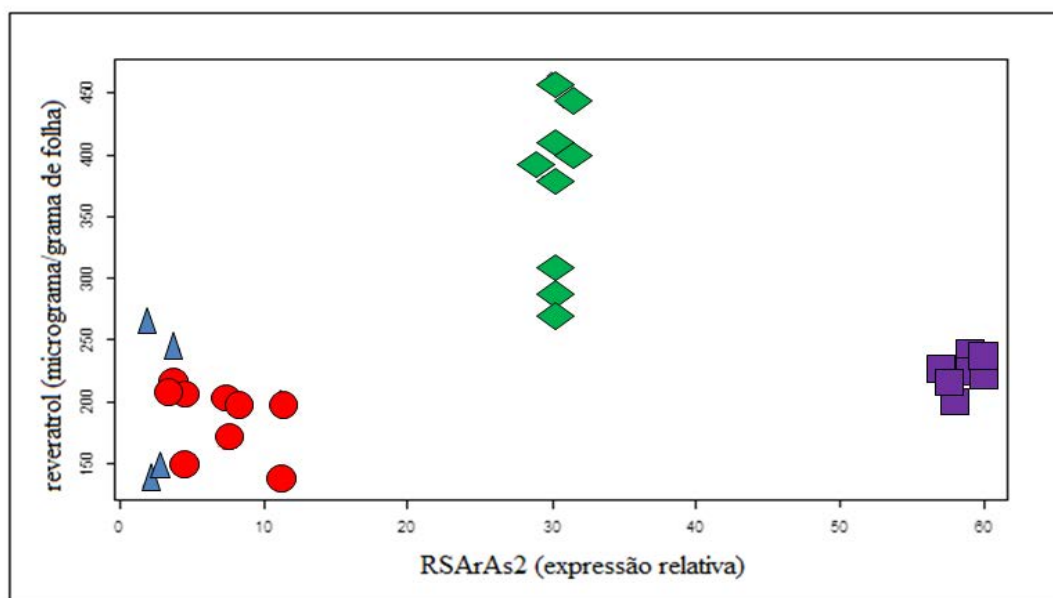


Figura 16- Relação entre a concentração de resveratrol e os níveis de expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primers* RSArAs2 para *A. hypogaea* (▲), anfidiploide sintético (●), *A. duranensis* (◆), *A. ipaënsis* (■).

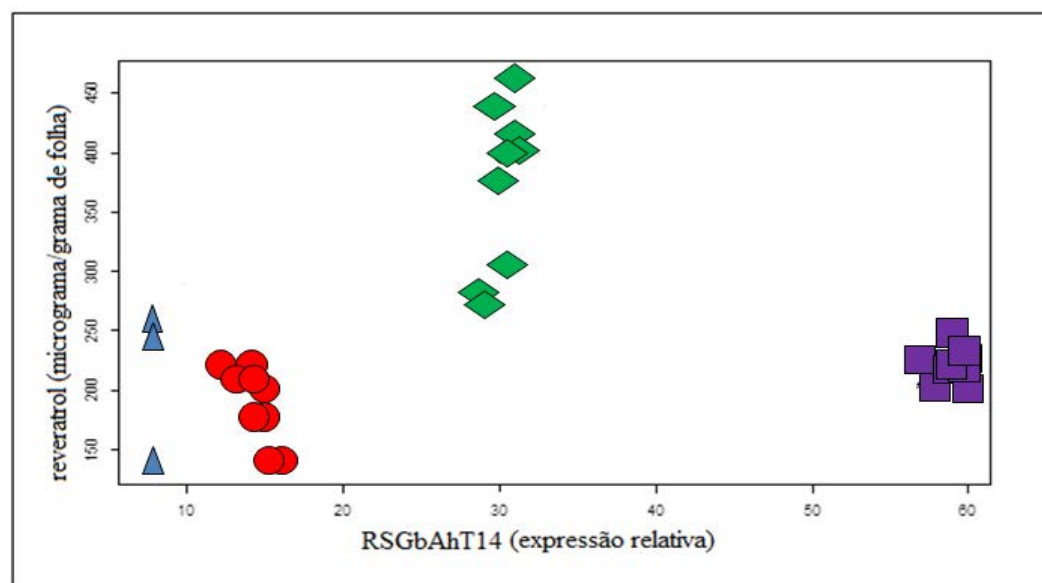


Figura 17- Relação entre a concentração de resveratrol e os níveis de expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primers* RSGbAhT14 para *A. hypogaea* (▲), anfidiploide sintético (●), *A. duranensis* (◆), *A. ipaënsis* (■).

Em *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e no anfidiplóide sintético, diferentes concentrações de resveratrol e níveis de transcritos foram encontrados no momento em que o material vegetal foi coletado para análise, isto é, 15 horas após o término da indução por UV. Chung *et al.* (2003) demonstraram que em *A. hypogaea*, diferentes tempos de coleta após o término da indução (zero, três e doze horas) as concentrações de resveratrol e de transcritos foram diferentes, ambos atingindo valores máximos a doze horas após o término da indução. Tang *et al.* (2010) também observaram para *A. hypogaea* um aumento nas concentrações de resveratrol e nos níveis de transcrito de *resveratrol sintase*, porém após um pico de produção (12 horas após o término da indução) esses valores diminuíram até se igualar as amostras controle, ou seja, não submetidas ao UV (48 horas após o término da indução). Em nosso estudo os tetraplóides (*A. hypogaea* e anfidiplóide sintético) podem ter atingido uma maior expressão relativa de *resveratrol sintase* e consequentemente de produção de resveratrol antes do momento em que o material foi coletado para análise, de modo que às 15 horas após o término da indução essa produção já teria sido reduzida. Em *A. duranensis* foi observada a mais alta concentração de resveratrol entre as amostras analisadas e concentração intermediária de transcritos de *resveratrol sintase*. Assumindo que o comportamento do referido diploide quando tratado com UV seja semelhante ao do amendoim, é possível que seja detectada maiores quantidades de resveratrol antes do tempo de coleta de 15 horas, pois os níveis de transcritos quando comparados com as outras espécies, não foram os maiores observados, sugerindo o início de uma redução em sua expressão. Avaliando os resultados de *A. ipaënsis* observamos indução tardia uma vez que os níveis de transcritos foram os mais altos, além disso, a elevada expressão relativa não refletiu em resveratrol no ponto de coleta de nosso estudo (15 horas após o tratamento). Caso *A. ipaënsis* se comporte semelhante a *A. hypogaea* o melhor ponto para análise do resveratrol nessa espécie pode ser maior que 15 horas após tratamento.

Em relação aos resultados de concentração de resveratrol e expressão relativa referente aos pares de *primers* RSArAhT5 e RSArAs6 não foi possível estabelecer correlação positiva (Figuras 18 e 19). Uma vez que a literatura demonstra que a RS é composta por uma família gênica e que os diferentes alelos respondem de formas distintas aos vários estímulos que a planta pode sofrer e a partir daí produzir o resveratrol, os pares de *primers* RSArAhT5 e RSArAs6 talvez identifiquem alelos de *resveratrol sintase* não regulados por UV, mas sim por outro tipo de estímulo. Dai *et al.* (2012) ao estudarem em uva infectada por fungo (*Erysiphe necator*) o comportamento de oito genes da família gênica de *resveratrol sintase*

observou que estes são regulados diferencialmente em resposta a infecção e durante o desenvolvimento da planta.

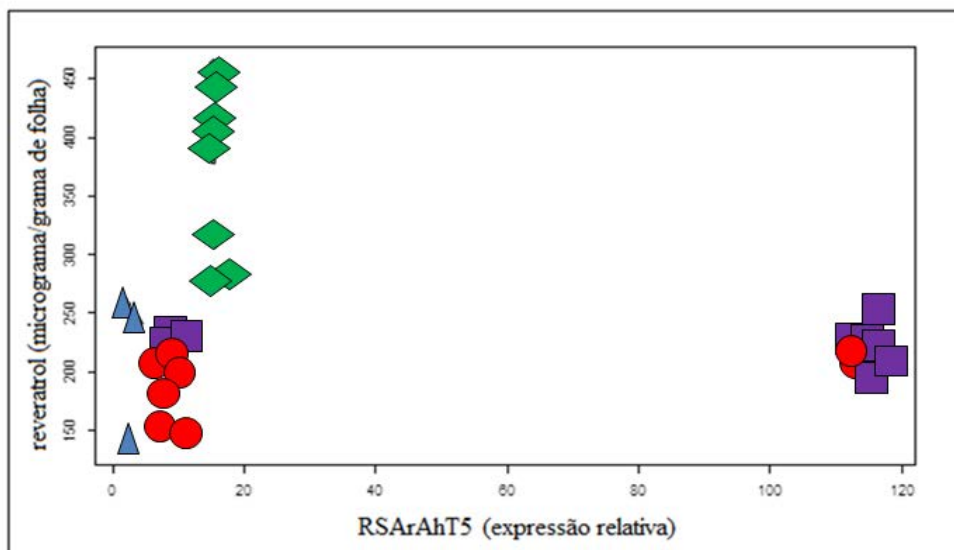


Figura 18- Concentração de resveratrol e expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primer* RSArAhT5 para os resultados de *A. hypogaea* ($\blacktriangle$), anfidiploide sintético ($\bullet$), *A. duranensis* ($\blacklozenge$), *A. ipäensis* ($\blacksquare$).

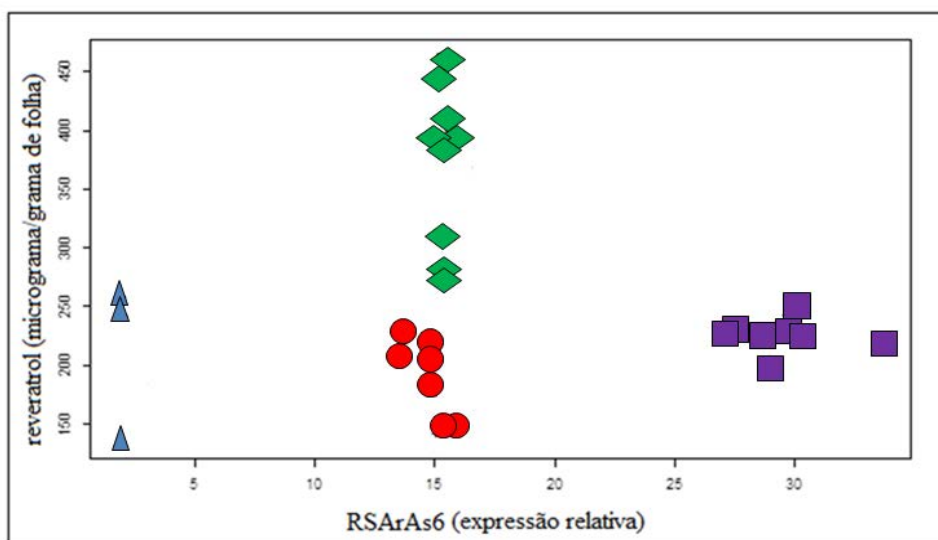


Figura 19- Concentração de resveratrol e expressão relativa de *resveratrol sintase* identificados pelo par de *primer* RSArAs6 para os resultados de *A. hypogaea* ($\blacktriangle$), anfidiploide sintético ($\bullet$), *A. duranensis* ($\blacklozenge$), *A. ipäensis* ($\blacksquare$).

Os diferentes resultados encontrados em cada espécie e no anfidiplóide para o mesmo tratamento e tempo de coleta podem estar relacionados às características próprias de cada genótipo analisado, como por exemplo, a anatomia foliar. Uma vez que existem diferenças anatômicas nas folhas entre espécies do gênero *Arachis* e que a intensidade de absorção do estímulo está diretamente ligada à produção da fitoalexina, podemos supor que a anatomia foliar pode interferir na absorção do UV, alterando toda a cadeia que inicia pelo reconhecimento do estresse, ativação da *resveratrol sintase* e produção de resveratrol (Menezes, 2009). Estudos relacionados à síntese de fitoalexinas em duas espécies nativas tropicais da família *Rubiaceae*, revelaram que as diferenças anatômicas entre as folhas de cada espécie, bem como as diferentes substâncias químicas encontradas em cada uma delas, causaram diferenças quanto à capacidade de produzir fitoalexinas quando inoculadas com fungos (Braga *et al.*, 1991; 1998).

O tetraploide sintético, resultado do cruzamento artificial entre os progenitores naturais do amendoim cultivado (*A. hypogaea*) (Singh & Smartt, 1998), *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, se comportou de forma semelhante ao amendoim cultivado tanto para a expressão gênica quanto para produção de resveratrol em folhas induzidas por UV e coletadas 15 horas após o tratamento. Portanto, o cruzamento artificial entre duas espécies diploides que expressam mais *resveratrol sintase* e sintetizam mais resveratrol não refletiu em um anfidiplóide com características semelhantes ou adicionais, na verdade o que houve foi uma redução tanto na expressão quanto na produção de resveratrol no tempo avaliado. Durante eventos de ploidização podem ocorrer uma ampla reestruturação genômica, com alterações e mudanças ao nível gênico, silenciamento gênico, reestruturação cromossômica, ação de transposons ou novos padrões de expressão gênica (Wolfe, 2001). Além disso, genes duplicados por poliploidia podem reter sua função original ou similar, sofrer diversificação na função ou na regulação, ou uma das cópias pode ser silenciada através de mutação ou mudanças epigenéticas (Wendel, 2000). Em aloploidos artificiais de *Arabidopsis*, por exemplo, já foi descrito mudanças na regulação gênica e no silenciamento gênico para determinadas características (McCallum *et al.*, 2000). Essas informações podem justificar o comportamento diferente do anfidiplóide em relação aos seus parentais, que em nossos experimentos funciona como importante elemento para entendermos o comportamento referente à herdabilidade da produção de resveratrol, tendo em vista que as informações por esse estudo geradas têm como um dos principais objetivos auxiliar em programas de pré-melhoramento.

6.0. Conclusão

- *Arachis hypogaea*, *A. stenosperma*, *A. valida*, *A. wiliamsii*, *A. ipaënsis* e *A. duranensis*, e o anfidiplóide sintético (*A. duranensis* X *A. ipaënsis*) produzem resveratrol quando induzidos por UV.
- Existe variação na produção de resveratrol entre acessos/ cultivares de uma mesma espécie e entre espécies, isto é, a análise da variação é importante para que se encontrar os melhores acessos, os que mais produzam resveratrol, para serem utilizados em programas de pré-melhoramento.
- É possível estabelecer uma relação entre expressão gênica de *resveratrol sintase* e produção de resveratrol em espécies silvestres de *Arachis*, mesmo existindo vários fatores atuando em toda a síntese do composto.
- O gene da *resveratrol sintase* tem potencial para ser um marcador para identificação de espécies que produzem resveratrol e dos melhores tempos de coleta após a indução.

7.0. Referências Bibliográficas

- Abicab (<http://www.abicab.org.br/amendoim/producao-brasileira-deve-crescer-55/>). Acessado em 11 de dezembro de 2012.
- Agrobyte (<http://www.agrobyte.com.br/index.php?Pag=amendoim>). Acessado em 7 de dezembro de 2012.
- Applied Biosystem, L. T. (s/d). *7300 Real-Time PCR System*. Acesso em Setembro de 2012, disponível em https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/7300_Real_Time_big.jpg
- Asibuo, J. Y., Akromah, R., Safo-Kantanka, O., Adu-Dapaah, H. K., Ohemeng-Dapaah, S., Agyeman, A. (2010). Chemical composition of groundnut, *Arachis hypogaea* (L) landraces. *African Journal of Biotechnology*, 7(13).
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. [Review]. *Nat Rev Drug Discov*, 5(6), 493-506.
- Bechara, M., Moretzsohn, M., Palmieri, D., Monteiro, J., Bacci, M., Martins, J., Gimenes, M. (2010). Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. *BMC Plant Biology*, 10(1), 255.
- Boeger, M. R. T., & Poulson, M. (2006). Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.(Brassicaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 20(2), 329-338.
- Boletim Conab (http://www.conab.gov.br/olalacms/uploads/arquivos/12_05_10_08_49_52_boletim_maio_2012.pdf). Acessado em 2 de dezembro de 2012.
- Braga, M. R., Claudia, M., Young, M., Dietrich, S. M., & Gottlieb, O. R. (1991). Phytoalexin induction in *Rubiaceae*. *Journal of chemical ecology*, 17(6), 1079-1090.
- Braga, M. R., & Dietrich, S. M. (1998). Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical *Rubiaceae*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10(2), 79-84.
- Bravo, J. P., Hoshino, A. A., Angelici, C. D., Lopes, C. R., Gimenes, M. A. (2006). Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, 29(3).
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Michael, E. J., & Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3337-3340.

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4), pp. 1-12.
- Caldwell, M. M., Teramura, A. H., & Tevini, M. (1989). The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(12), 363-367.
- Chang, J. C., Lai, Y. H., Djoko, B., Wu, P. L., Liu, C.-D., Liu, Y. W., & Chiou, R. Y. Y. (2006). Biosynthesis Enhancement and Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Arachidin-1, Arachidin-3, and Isopentadienylresveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10281-10287.
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113-116.
- Chung, I.-M., Park, M. R., Chun, J. C., & Yun, S. J. (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, 164(1), 103-109.
- Chung, I. M., Park, M. R., Rehman, S., & Yun, S. J. (2001). Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Molecules and cells*, 12(3), 353-359.
- Chung SY, Maleki S, Champagne ET, Buhr KL, Gorbet DW. (2002) High-oleic peanuts are not different from normal peanuts in allergenic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50(4):878-82.
- Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. (2006) Fundamentos de Cromatografia, Editora UNICAMP: Campinas.
- Cuc, L. M., Mace, E. S., Crouch, J. H., Quang, V. D., Long, T. D., & Varshney, R. K. (2008). Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biology*, 8(1), 55.
- Condori, J., Medrano, G., Sivakumar, G., Nair, V., Cramer, C., & Medina-Bolivar, F. (2009). Functional characterization of a stilbene synthase gene using a transient expression system in planta. *Plant Cell Reports*, 28(4), 589-599.
- Cunha, F., Nobile, P., Hoshino, A., Moretzsohn, M., Lopes, C., & Gimenes, M. (2008). Genetic relationships among *Arachis hypogaea* L. (AABB) and diploid *Arachis* species with AA and BB genomes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(1), 15-20.

- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139(1), 5-17.
- Dai, R., Ge, H., Howard, S., & Qiu, W. (2012). Transcriptional expression of Stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in *Norton* and *Cabernet Sauvignon* grapevine. *Plant Science*. 197(1), 70-76.
- Delaunois, B., Cordelier, S., Conreux, A., Clément, C., & Jeandet, P. (2009). Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), 2-12.
- Gomes, L. R., Santos, R. C., Anunciação Filho, C. J., Albuquerque, P. M. F. (2007). Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de genótipos de amendoim de porte ereto. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 42(7), 985-989.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., Helleman, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4), 227-230.
- Dorner, J. W., Cole, R. J., Sanders, T. H., & Blankenship, P. D. (1989). Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. *Mycopathologia*, 105(2), 117-128.
- Duenas, M., Estrella, I., & Hernandez, T. (2004). Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *European Food Research and Technology*, 219(2), 116-123.
- Dwivedi, S. L., Pande, S., Rao, J. N., & Nigam, S. N. (2002). Components of resistance to late leaf spot and rust among interspecific derivatives and their significance in a foliar disease resistance breeding in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 125(1), 81-88.
- Edwards, C., & Strange, R. N. (1991). Separation and identification of phytoalexins from leaves of groundnut (*Arachis hypogaea*) and development of a method for their determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 547, 185-193.
- Hougaard, B. K., Madsen, L. H., Sandal, N., de Carvalho Moretzsohn, M., Fredslund, J., Schauser, L., Stougaard, J. (2008). Legume Anchor Markers Link Syntenic Regions Between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. *Genetics*, 179(4), 2299-2312.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6(4), 279-284.

- Fagundes, M. H. (2002). Sementes de Amendoim: alguns comentários. *Sementes de amendoim: alguns comentários*.
- Fávero, A. P., Moraes, S. A. d., Garcia, A. A. F., Valls, J. F. M., & Vello, N. A. (2009). Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. *Scientia Agricola*, 66, 110-117.
- Fávero, A. P., Simpson, C. E., Valls, J. F. M., & Vello, N. A. (2006). Study of the Evolution of Cultivated Peanut through Crossability Studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. *Crop Sci.*, 46(4), 1546-1552.
- Fernández, A., & Krapovickas, A. (1994). Cromosomas y evolucion en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8, 187 - 200.
- Filip, V., Plockova, M., Šmidrkal, J., Špičková, Z., Melzoch, K., Schmidt, Š. (2003). Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*, 83(4), 585-593.
- Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8), 663-673.
- Foncéka, D., Hodo-Abalo, T., Rivallan, R., Faye, I., Sall, M. N., Ndoeye, O., & Rami, J. F. (2009). Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: a way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. *BMC Plant Biology*, 9(1), 103.
- Freire, R. M. M. Santos, R. C. dos; Farias, S. R. de.(1999). Protein and oil of the Brazilian BRS 151 L 7. *International Arachis News Latter*,19, 66-67.
- Freitas, F. D. O., Peñaloza, A. D. P., & Valls, J. F. M. (2003). O amendoim contador de história. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 2003. Documentos, 107.
- Freitas, S. M., Martins, S. S., Nomi, A. K, Campos, A. F. (2005). Evolução Do Mercado Brasileiro De Amendoim. In: Santos, R.C. (1). Campina Grande: Embrapa Algodão. 15.
- Friend, S. A., Quandt, D., Tallury, S. P., Stalker, H. T., & Hilu, K. W. (2010). Species, genomes, and section relationships in the genus *Arachis* (Fabaceae): a molecular phylogeny. *Plant Systematics and Evolution*, 290(1-4), 185-199.
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I. A., Spanos, M. (2006). *trans*-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, 17(9), 700-706.
- Giannuzzo, A., Grosso, N., Guzmán, C. (2000). Studies of Lipids and Proteins in a Wild Species of the *Arachis* (Fabaceae) Gender. *Molecules*, 5(3), 545-546.
- Gimenes, M. A., Lopes, C. R., Galgaro, M. L., Valls, J. F., & Kochert, G. (2002). RFLP analysis of genetic variation in species of section *Arachis*, genus *Arachis* (Leguminosae). *Euphytica*, 123(3), 421-429.

- Gimenes, M., Hoshino, A., Barbosa, A., Palmieri, D., & Lopes, C. (2007). Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biology*, 7(1), 9.
- Godoy, I. J., Moraes, S. A., Zanotto, M. D., Santos, R. C. (1999). Melhoramento de amendoim. In Borém, A (ed.) *Melhoramento de espécies cultivadas*, Viçosa, UFV,(51).
- Grabiele, M., Chalup, L., Robledo, G., & Seijo, G. (2012). Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 298(6), 1151-1165. doi: 10.1007/s00606-012-0627-3
- Gregory, W., Krapovickas, A., Gregory, M. (1980). Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. *Advances in Legume Science*, 469 - 481.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., & Van Wuytswinkel, O. (2008). Towards a Systematic Validation of References in Real-Time RT-PCR. *The Plant Cell Online*, 20(7), 1734-1735.
- Halls, C., & Yu, O. (2008). Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 77-81.
- Hague, D. R. (1975). Studies of storage proteins of higher plants I. *Concanavalin A* from three species of the genus *Canavalia*. *Plant Physiology*, 55(4), 636-642.
- Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schröder, G., & Stöcker, R. (1990). Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant molecular biology*, 15(2), 325-335.
- Halward, T. M., Stalker, H. T., Larue, E. A., & Kochert, G. (1991). Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome*, 34(6), 1013-1020.
- Harborne, J., Boulter, D., Turner, B. (1971). Chemotaxonomy of the Leguminosae.
- He, G., & Prakash, C. S. (1997). Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 97(2), 143-149.
- Hipskind, J. D., & Paiva, N. L. (2000). Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(5), 551-562.
- Hopkins, M. S., Casa, A. M., Wang, T., Mitchell, S. E., Dean, R. E., Kochert, G. D., & Kresovich, S. (1999). Discovery and Characterization of Polymorphic Simple Sequence Repeats (SSRs) in Peanut. *Crop Sci.*, 39(4), 1243-1247.
- Instituto de economia agrícola, 2012 <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12242>). Acessado em 02 de dezembro de 2012.

- Ingham, J. L. (1976). 3, 5, 4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, 15(11), 1791-1793.
- Inoue, H., Jiang, X. F., Katayama, T., Osada, S., Umesono, K., Namura, S. (2003). Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor α in mice. *Neuroscience letters*, 352(3), 203-206.
- Iskandar, H. M., Simpson, R. S., Casu, R. E., Bonnett, G. D., Maclean, D. J., & Manners, J. M. (2004). Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4), 325-337.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218-220.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., & Meunier, P. (1995). Production of the Phytoalexin Resveratrol by Grapes as a Response to *Botrytis* Attack Under Natural Conditions. *Journal of Phytopathology*, 143(3), 135-139.
- Kimata, Y., & Theil, E. C. (1994). Posttranscriptional regulation of ferritin during nodule development in soybean. *Plant physiology*, 104(1), 263-270.
- Kochert, G., Stalker, H., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C., & Moore, K. (1996). RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *Am J Bot*, 83, 1282 - 1291.
- Krapovickas, A., Gregory, W.C. (1994). Taxonomia Del gênero *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8, 1-186.
- Lanz, T., Schröder, G., & Schröder, J. (1990). Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea* L. *Planta*, 181(2), 169-175.
- Lavia, G.I. (1999). Caracterización cromosómica del germoplasma de maní. *PhD Thesis*, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Leal-Bertioli, S., Jose, A., Alves-Freitas, D., Moretzsohn, M., Guimaraes, P., Nielen, S., Bertioli, D. (2009). Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *BMC Plant Biology*, 9(1), 112.
- Lee, S. S., Lee, S. M., Kim, M., Chun, J., Cheong, Y. K., & Lee, J. (2004). Analysis of trans-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea. *Food research international*, 37(3), 247-251.

- Liang, X., Chen, X., Hong, Y., Liu, H., Zhou, G., Li, S., & Guo, B. (2009). Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. *BMC Plant Biology*, 9(1), 35.
- Libault, M., Thibivilliers, S., Bilgin, D. D., Radwan, O., Benitez, M., Clough, S. J., & Stacey, G. (2008). Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *The Plant Genome*, 1(1), 44-54.
- Life Technologies, A. B. (s/d). Real-Time Polymerase Chain Reaction. Acessado em Setembro de 2012, <http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-polymerase-chain-reaction/index.html?ICID=EDI-Lrn1>.
- Liu, C. D., Wen, Y. Y., Chiou, J. M., Wang, K. H., & Robin, Y. Y. C. (2003). Comparative characterization of peanuts grown by aquatic floating cultivation and field cultivation for seed and resveratrol production. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6), 1582-1585.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lois, R., & Buchanan, B. B. (1994). Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. *Planta*, 194(4), 504-509.
- Lopes, R. (2011). Determinação de resveratrol em folhas de amendoim silvestre (*Arachis* sp.). 104 f., il. *Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)*—Universidade de Brasília, Brasília.
- Lu, Z. X., Gaudet, D. A., Frick, M., Puchalski, B., Genswein, B., & Laroche, A. (2005). Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 38(4), 420-431.
- Luo, M., Dang, P., Bausher, M. G., Holbrook, C. C., Lee, R. D., Lynch, R. E., & Guo, B. Z. (2005). Identification of Transcripts Involved in Resistance Responses to Leaf Spot Disease Caused by *Cercosporidium personatum* in Peanut (*Arachis hypogaea*). *Phytopathology*, 95(4), 381-387. doi: 10.1094/phyto-95-0381
- Mattivi, F., Nicolini, G. (1993) Influenza della tecnica di vinificazione sul contenuto di resveratrolo dei vini. *L'Enotechnico*, 29, 81-88.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A., & Henikoff, S. (2000). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*, 123(2), 439-442.

- Melchior, F., & Kindl, H. (1991). Coordinate-and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. *Optima*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 288(2), 552-557.
- Menezes, H. (2009) Innate and specific immunity in plants. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, 195 (30).
- Milla, S. R., Isleib, T. G., & Stalker, H. T. (2005). Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. *Genome*, 48(1), 1-11.
- Miner RT-qPCR Programa de análises. Disponível em <http://www.miner.ewindup.info/>. Acesso outubro- dezembro de 2012.
- Moore, R. C., & Purugganan, M. D. (2005). The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Current opinion in plant biology*, 8(2), 122-128.
- Moretzsohn, M., Hopkins, M., Mitchell, S., Kresovich, S., Valls, J., & Ferreira, M. (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, 4(1), 11.
- Moretzsohn, M. C., Barbosa, A. V., Alves-Freitas, D. M., Teixeira, C., Leal-Bertioli, S. C., Guimarães, P. M., Gimenes, M. A. (2009). A linkage map for the B-genome of *Arachis* (*Fabaceae*) and its synteny to the A-genome. *BMC Plant Biology*, 9(1), 40.
- Morgante, C., Guimaraes, P., Martins, A., Araujo, A., Leal-Bertioli, S., Bertioli, D., & Brasileiro, A. (2011). Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. *BMC Research Notes*, 4(1), 339.
- Nepote, V., Grosso, N. R., & Guzman, C. A. (2004). Radical scavenging activity of extracts of argentine peanut skins (*Arachis Hypogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. In *Anales de la Asociación Química Argentina. Asociación Química Argentina*. 92 (4), 41-49.
- Nautiyal, P. C., Rajgopal, K., Zala, P. V., Pujari, D. S., Basu, M., Dhadhal, B. A., & Nandre, B. M. (2008). Evaluation of wild *Arachis* species for abiotic stress tolerance: I. Thermal stress and leaf water relations. *Euphytica*, 159(1), 43-57.
- Nogueira, R. J. M. C., & Santos, R. D. (2000). Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4(1), 41-45.
- Novais, C. M., Pires-Alves, M., Silva, F. F. (2004). PCR em tempo real. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 33, 10-13.

- Oliveira, J. T. A. D., Cavada, B. S., Martins, J. L., Jarenkow, J. A., Vasconcelos, I. M., & Moreira, R. D. A. (1990). Lectinas de sementes como marcadores taxonômicos da tribo Diocleae. *Acta Botanica Brasilica*, 4(2), 159-163.
- Pacheco, G., Gagliardi, R. F., Carneiro, L. A., Valls, J. F. M., & Mansur, E. (2008). Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. and WC Gregory from roots and calluses derived from leaflets of in vitro plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(1), 14-17.
- Pande, S., & Rao, J. N. (2001). Resistance of Wild *Arachis* Species to Late Leaf Spot and Rust in Greenhouse Trials. *Plant Disease*, 85(8), 851-855.
- Payton, P., Kottapalli, K. R., Rowland, D., Faircloth, W., Guo, B., Burow, M., Gallo, M. (2009). Gene expression profiling in peanut using high density oligonucleotide microarrays. *BMC genomics*, 10(1), 265.
- Paxton, J. D. (1991). Biosynthesis and accumulation of legume phytoalexins. *Mycotoxins and phytoalexins*, 485-499.
- Peirson, S. N., & Butler, J. N. (2007). Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Springer Protocols*, 362, 349-362.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30(9).
- Pontin, M. A., Piccoli, P. N., Francisco, R., Bottini, R., Martinez-Zapater, J. M., & Lijavetzky, D. (2010). Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC plant biology*, 10(1), 224.
- Porter, D. M. Drought stress. In: Kokalis-Burelle, N., Porter, D. M., Rodriguez-Kábana, R., Smith, D. M., Subrahmanyam, P. (Eds) Compendium of peanut diseases. (1997) 72. Ed. New York: The American Phytopathological Society. 60.
- Proite, K., Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. C., Da Silva, F. R., Martins, N. F., & Guimarães, P. M. (2007). ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology*, 7(1), 7.
- Potrebko, I., & Resurreccion, A. V. A. (2009). Effect of Ultraviolet Doses in Combined Ultraviolet-Ultrasound Treatments on trans-Resveratrol and trans-Piceid Contents in Sliced Peanut Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7750-7756.
- R programa de linguagem estatística, livre para download no sitio <http://www.r-project.org/>
- Raina, S. N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K. P., & Devarumath, R. M. (2001). RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity,

- varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44(5), 763-772.
- Rajeevan, M. S., Ranamukhaarachchi, D. G., Vernon, S. D., Unger, E. R. (2001). Use of Real-Time Quantitative PCR to Validate the Results of cDNA Array and Differential Display PCR Technologies. *Methods*, 25(4), 443-451.
- Reddy, A. S., Reddy, L. J., Mallikarjuna, N., Abdurahman, M. D., Reddy, Y. V., Bramel, P. J., & Reddy, D. V. R. (2000). Identification of resistance to Peanut bud necrosis virus (PBNV) in wild *Arachis* germplasm. *Annals of Applied Biology*, 137(2), 135-139.
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Renaud, S., & Gueguen, R. (1998). The French paradox and wine drinking (Vol. 208). *John Wiley & Sons, Chichester*.
- Resurreccion, A. V. A., Francisco, M. L. D., (2009). Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. *Food Chemistry*, 117(2), 356-363.
- Richard, J. L. (1987). Coronary risk factors. The French paradox. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, 80, 17.
- Robledo, G., Lavia, G. I., & Seijo, G. (2009). Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(7), 1295-1307.
- Robledo, G., & Seijo, G. (2010). Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 121(6), 1033-1046.
- Rudolf, J. L., Resurreccion, A. V. A., Saalia, F. K., Phillips, R. D. (2005). Development of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for analyzing *trans*-resveratrol in peanut kernels. *Food chemistry*, 89(4), 623-638.
- Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. A. (2009). Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts. *Food Chemistry*, 117(4), 674-680.
- Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. A. (2010). Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chem*, 122, 795-803

- Sanders, T. H., McMichael, R. W., & Hendrix, K. W. (2000). Occurrence of Resveratrol in Edible Peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1243-1246.
- Savage, G. P., Keenan, J. I. (1994). The composition and nutritive value of groundnut kernels. In *The Groundnut Crop*, Springer Netherlands, 173-213.
- Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernandez, A., Krapovickas, A., Ducasse, D. A., Bertoli, D. J., & Moscone, E. A. (2007). Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, *Leguminosae*) and its close relatives revealed by double GISH. *Am J Bot*, 94(12), 1963-1971.
- Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernandez, A., Krapovickas, A., Ducasse, D., & Moscone, E. (2004). Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (*Leguminosae*). *Am J Bot*, 91(9), 1294 - 1303.
- Siemann, E. H., & Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), 49-52.
- Silva, K. L., & Cechinel, F. V. . (2002) Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quím. Nova* , 25, 449-454.
- Silveira, É. D., Alves-Ferreira, M., Guimarães, L. A., da Silva, F. R., & Carneiro, V. T. (2009). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biology*, 9(1), 84.
- Sinha, K., Chaudhary, G., & Kumar Gupta, Y. (2002). Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life sciences*, 71(6), 655-665.
- Singh, A. K., Smartt, J., Simpson, C. E., & Raina, S. N. (1998). Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45(2), 119-126.
- Singh, K. P., Singh, A., Raina, S. N., Singh, A. K., & Ogihara, Y. (2002). Ribosomal DNA repeat unit polymorphism and heritability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) accessions and related wild species. *Euphytica*, 123(2), 211-220.
- Sobolev, V. S., Cole, R. J., Dorner, J. W., Yagen, B. (1995). Isolation, purification, and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. *Journal of AOAC International*, 78(5), 1177-1182.
- Sobolev, V. S., Cole, R. J. (1999). trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1435-1439.

- Sobolev, V. S., Guo, B. Z., Holbrook, C. C., & Lynch, R. E. (2007). Interrelationship of Phytoalexin Production and Disease Resistance in Selected Peanut Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2195-2200.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?. *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91-113.
- Subrahmanyam, P., Moss J, P., McDonald, D., Subra Rao P, V., & Rao V, R. (1985). Resistance to leaf spot caused by *Cercosporidium personatum* in wild *Arachis* species. *Plant Disease*, 69(11), 951-954.
- Subrahmanyam, P., Rao, V. R., McDonald, D., Moss, J. P., & Gibbons, R. W. (1989). Origins of resistances to rust and late leaf spot in peanut (*Arachis hypogaea*, Fabaceae). *Economic Botany*, 43(4), 444-455.
- Subramanian, V., Gurtu, S., Rao, R. N., & Nigam, S. N. (2000). Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome*, 43(4), 656-660.
- Subrahmanyam, P., Anaidu, R., Reddy, L. J., Kumar, P. L., & Ferguson, M. E. (2001). Resistance to groundnut rosette disease in wild *Arachis* species. *Annals of applied biology*, 139(1), 45-50.
- Sydor, T., Schaffer, S., Boles, E. (2010). Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium. *Applied and environmental microbiology*, 76(10), 3361-3363.
- Tallury, S. P., Hilu, K. W., Milla, S. R., Friend, S. A., Alsaghir, M., Stalker, H. T., & Quandt, D. (2005). Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis* (Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 111(7), 1229-1237.
- Tang, K., Zhan, J.-C., Yang, H.-R., & Huang, W.-D. (2010). Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 167(2), 95-102.
- Tokusoglu O, Unal MK, Yemis F. (2005). Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem.* 53(12):5003-9.
- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schröder, J., & Schröder, G. (1994). Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *Journal of molecular evolution*, 38(6), 610-618.

- USDA-FAS. (2011). Major Oilseeds: World Supply and Distribution (Commodity View). Acesso em dezembro de 2012, disponível em USDA - United States Department of Agriculture/FAS - Foreign Agricultural Service: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=700&hidReportRetrievalTemplateID=5>.
- Valls, J. F. M., & Simpson, C. E. (1994). Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. Biology and agronomy of forage *Arachis*, 1-18.
- Vannozzi, A., Dry, I., Fasoli, M., Zenoni, S., & Lucchin, M. (2012). Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biology*, 12(1), 130.
- Verdi, L. G., Brighente, I. M. C., & Pizzolatti, M. G. (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova*, 28(1), 85-94.
- Vieira, R. F., Grayer, R. J., Patonb, A., & Simon, J. E. (2002). Uso de marcadores químicos no estudo da diversidade genética de *Ocimum gratissimum* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 126-129.
- Wang, Y. J., He, F., & Li, X. L. (2003). The neuroprotection of resveratrol in the experimental cerebral ischemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83(7), 534.
- Wang, K. H., Lai, Y. H., Chang, J. C., Ko, T. F., Shyu, S. L., & Robin, Y. Y. C. (2005). Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(2), 242-246.
- Wang, Y., & Yu, O. (2011). Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells. *Journal of biotechnology*. 91, 949-956.
- Wendel, J. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, 42(1), 225-249.
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E., & Kindl, H. (1994). Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant molecular biology*, 26(2), 667-677.
- Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 333-341.
- Yang, M. H., Kuo, C. H., Hsieh, W. C., & Ku, K. L. (2010). Investigation of microbial elicitation of trans-resveratrol and trans-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17), 9537-9541.

- Yvonne, C., Lloyd, W., Bernhard, V., & Martha, V. (2012). Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/APCI mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132(1), 525-531.
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 12(8), 1047-1064.
- Zorzete, P., Reis, T. A., Felício, J. D., Baquião, A. C., Makimoto, P., & Corrêa, B. (2011). Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. *Food Chemistry*, 129(3), 957-964.