



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**TEOR DE RESVERATROL NO GÊNERO *ARACHIS* L. E
ALOTETRAPLOIDES SINTÉTICOS E COMPORTAMENTO DA
RESVERATROL SINTASE EM ESPÉCIES DE *ARACHIS*.**

PAULA ANDRÉA SAMPAIO DE VASCONCELOS CARVALHO

**BOTUCATU-SP
2017**

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

**TEOR DE RESVERATROL NO GÊNERO *ARACHIS* L. E
ALOTETRAPLOIDES SINTÉTICOS E COMPORTAMENTO DA
RESVERATROL SINTASE EM ESPÉCIES DE *ARACHIS*.**

**DOUTORANDA: PAULA ANDRÉA SAMPAIO DE VASCONCELOS
CARVALHO**

ORIENTADOR: DR. MARCOS A. GIMENES

CO- ORIENTADORA: DRA. ANA CRISTINA MIRANDA BRASILEIRO

CO- ORIENTADORA: DRA. TÂNIA DA SILVEIRA AGOSTINI COSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas
(Genética) – Instituto de Biociências,
UNESP, campus de Botucatu, para
obtenção de título de doutor.

Orientador: Dr. Prof. Marcos Aparecido
Gimenes

BOTUCATU-SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Paula Andréa Sampaio de Vasconcelos.

Teor de resveratrol no gênero *Arachis* L. e alotetraploides sintéticos e comportamento da resveratrol sintase em espécies de *Arachis* / Paula Andréa Sampaio de Vasconcelos Carvalho.
- Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcos Aparecido Gimenes
Coorientador: Ana Cristina Miranda Brasileiro
Coorientador: Tânica da Silveira Agostini Costa
Capes: 20203004

1. Amendoim. 2. Expressão gênica. 3. Fitoalexina.
4. Polifenóis.

Palavras-chave: *Arachis*; Expressão gênica; Fitoalexina; Resveratrol.

Dedico aos meus pais e meu esposo,

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, meu esposo, meus pais, irmãs, tia Marcília e avós.

Aos parentes e amigos, em especial ao Braulio Fernandes e Amanda Silva.

Ao Prof. Dr. Marcos Gimenes.

Às orientadoras Ana Brasileiro e Tânia Agostini-Costa.

À pesquisadora Joseane Padilha.

À companheira de laboratório e amiga Dra. Renata Lopes.

Às amigas e inspiradoras profissionais Antonieta Salomão e Rosa Mundim.

À todos os profissionais e estudantes da Embrapa Cenargen.

Aos professores e colegas da UNESP, em especial Marcela Pfaifer e Talita Amador.

À minha banca de defesa, Dr. Márcio Moretzsohn, Dra. Adriana Custódio, Dra. Rosa de Belém e Dr. Valls, por terem enriquecido e colaborado tanto na discussão do assunto e no meu crescimento profissional.

Pouca ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.
(Louis Pasteur)

RESUMO GERAL

O gênero *Arachis* possui 81, espécies distribuídas em nove seções taxonômicas, sendo o amendoim (*A. hypogaea* L.) a principal espécie, devido ao seu alto valor nutricional. O gênero possui também outras espécies de interesse econômico, que têm sido utilizadas em programas de melhoramento do amendoim (espécies da seção *Arachis*) e espécies forrageiras de outras seções do gênero. Com relação às demais espécies, o germoplasma da grande maioria está disponível para a caracterização e pode, sem dúvida, contribuir para seu uso futuro. O gênero *Arachis* é um dos poucos que produzem o resveratrol, uma fitoalexina que, além de ser uma resposta da planta contra estresses, também tem ação antioxidante, sendo indicado para prevenção de cânceres e cardiopatias. A avaliação do potencial de produção de resveratrol foi realizada somente em algumas espécies da seção *Arachis*, faltando avaliação em outras espécies do gênero e nos tetraploides sintéticos que estão sendo utilizados para facilitar a transferência de alelos de espécies silvestres para a cultivada. Assim, o objetivo desse trabalho foi ampliar o conhecimento sobre resveratrol no gênero *Arachis*. Para tanto foram analisados 21 acessos de espécies silvestres de cinco diferentes seções do gênero *Arachis*, oito poliploides sintéticos e três cultivares de amendoim. A produção de resveratrol em um conjunto menor de cinco espécies foi acompanhada também de avaliação da expressão do gene que codifica a enzima resveratrol sintase, RS, para entender a variação observada no teor de resveratrol entre as espécies. Tendo em vista que cada experimento foi realizado em uma época diferente do ano e de modo separado, não foi possível reunir todos os dados e fazer uma comparação entre eles. Em todos os experimentos foram avaliadas folhas submetidas a estresse abiótico por raios ultravioleta (UV), que foi o melhor indutor de síntese em dados de literatura. Os resultados mostraram que 21 acessos de 17 espécies das cinco seções são capazes de produzir resveratrol, sendo o maior teor detectado em *A. lignosa*, da seção *Procumbentes*. Em relação ao potencial de produção dos híbridos, foi verificado que a concentração de resveratrol na maioria dos anfidiplóides sintéticos é significativamente maior em relação aos parentais silvestres diploides. Além disso, a concentração de resveratrol nos híbridos resultantes do cruzamento entre anfidiplóides e *A. hypogaea* foi significativamente maior que nos anfidiplóides, sugerindo que a combinação entre alelos de silvestres e do cultivado tem um efeito positivo no aumento do resveratrol. Em relação às análises moleculares,

notou-se que a expressão do gene é imediata ao término da indução, seguindo de forma decrescente. Por outro lado, as concentrações de resveratrol são crescentes em relação ao passar do tempo de coleta após a indução por UV. Os resultados demonstram o potencial do gênero como fonte de resveratrol, seja via amendoim cultivado, por meio de introgressão de alelos silvestres utilizando-se anfidiplóides, ou pelo uso *per se* dos acessos de espécies silvestres, incluindo de outras seções distantes do amendoim, como é a *Procumbentes*, da qual faz parte *A. lignosa*, que apresentou o maior teor de resveratrol no estudo.

Palavras-chave: Resveratrol, *Arachis*, Fitoalexina, Expressão gênica.

ABSTRACT

The *Arachis* genus comprises 81 species divided into nine taxonomic sections, being peanut (*A. hypogaea* L.) the main species due to its high nutritional value. The genus also has other species of economic interest, which have been used in breeding programs for peanut (species of *Arachis* section) and to forage production. Regarding the other species of *Arachis*, germplasm of most of them is available and their characterization could undoubtedly contribute to their future use. *Arachis* genus is one of the few that produces resveratrol, a phytoalexin that is synthesized by the plant due to a stress and it is also an antioxidant that has been used to prevention of cancers and heart diseases. The resveratrol evaluation in *Arachis* was carried out mainly in *Arachis hypogaea* and in some species of the section *Arachis*, lacking the evaluation in other species of the genus and in the synthetic tetraploids that have been used to facilitate the transfer of alleles from wild species to the cultivated one. Therefore, the objective of this study was to increase the knowledge about resveratrol in the genus *Arachis*. Twenty one accessions of wild species from five different sections of the genus *Arachis*, eight synthetic polyploids and three peanut cultivars were analyzed. The production of resveratrol in a smaller set of five species was also accompanied of evaluation of resveratrol synthase to try to understand the variation observed in the resveratrol content among the species. Since each experiment was performed at a different time of year and separately, it was not possible to gather all the data and make a comparison between them. In all experiments, leaves treated with ultraviolet radiation (UV) were evaluated, which was the best inducer of synthesis in literature data. The results showed that 21 accessions of 17 species of the 5 sections are able to produce resveratrol, being the highest content detected in *A. lignosa* from *Procumbentes* section. It was verified that the concentration of resveratrol in the majority of the synthetic amphidiploids is significantly higher in relation to the diploid wild parents. In addition, the concentration of resveratrol in the hybrids resulting from the crossing between amphidiploids and *A. hypogaea* was significantly higher than in amphidiploids, suggesting that the combination of wild and cultivated alleles has a positive effect on the increase of resveratrol. It was noticed that the expression of the gene is immediate at the end of the induction, following in a decreasing way. On the other hand, the concentrations of resveratrol are increasing in relation to the time of collection after the induction of the material. The results demonstrate the potential of wild species of genus *Arachis* as a

source of resveratrol, either via cultivated peanuts, through introgression of wild alleles using amphidiploids, or through the use of wild species accesses, including from other sections distant from peanut, such as *A. lignosa*.

Key words: Resveratrol, *Arachis*, Phytoalexins, Gene Expression.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	16
LISTA DE TABELAS.....	17
INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2.0 REFERENCIAL TEÓRICO	
2.1. Recursos Genéticos de <i>Arachis</i>	20
2.2. A importância do amendoim	21
2.3. Gênero <i>Arachis</i>	22
2.4. Seções avaliadas (<i>Arachis</i> , <i>Caulorrhizae</i> , <i>Extranervosae</i> , <i>Procumbentes</i> e <i>Triseminatae</i>).....	23
2.5. A origem do amendoim cultivado	25
2.6. Espécies silvestres e o melhoramento do amendoim cultivado.....	26
2.7. Resveratrol	28
2.8. Expressão do gene Resveratrol sintase (RS) e Biossíntese do resveratrol.....	28
2.9. O resveratrol no amendoim	30
2.10. Quantificação do resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	32
3.0. CAPÍTULO 1: Avaliação da produção de resveratrol em espécies de cinco seções do gênero <i>Arachis</i>	33
3.1 RESUMO.....	34
3.2 INTRODUÇÃO.....	35
3.3. OBJETIVOS.....	36
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	
3.4.1 MATERIAL.....	37
3.4.2 MÉTODOS.....	38
3.4.2.1 Indução da síntese de resveratrol por UV.....	38
3.4.2.2 Extração de resveratrol.....	39
3.4.2.3 Preparo das amostras para injeção por HPLC.....	40
3.4.2.4 Análise por HPLC.....	40

3.4.2.5 Análise dos resultados de conteúdo de resveratrol.....	41
3.5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42
3.6 CONCLUSÃO.....	50
4.0 CAPÍTULO 2: Estudo do teor de resveratrol entre híbridos interespecíficos de <i>Arachis</i> e seus parentais.....	51
4.1 RESUMO.....	52
4.2 INTRODUÇÃO.....	53
4.3. OBJETIVOS.....	55
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.4.1 MATERIAL.....	56
4.4.2 MÉTODOS.....	57
4.4.2.1 Indução da síntese de resveratrol por UV.....	57
4.4.2.2 Extração de resveratrol.....	58
4.4.2.3 Preparo das amostras para injeção por HPLC.....	58
4.4.2.4 Análise por HPLC.....	59
4.4.2.5 Análise dos resultados de conteúdo de resveratrol.....	59
4.5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	60
4.6. CONCLUSÃO.....	65
5.0 CAPÍTULO 3: Análise paralela de transcritos de Resveratrol sintase e resveratrol em espécies diploides e tetraploides do gênero <i>Arachis</i>	66
5.1 RESUMO.....	67
5.2 INTRODUÇÃO.....	68
5.3. OBJETIVOS.....	69
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	
5.4.1 MATERIAL.....	70
5.4.2 MÉTODOS.....	70
5.4.2.1 Indução da síntese de resveratrol por UV.....	70
5.4.2.2 Extração de resveratrol.....	71
5.4.2.3 Preparo das amostras para injeção por HPLC.....	72
5.4.2.4 Análise por HPLC.....	72
5.4.2.5 Análise dos resultados de conteúdo de resveratrol.....	73
5.4.2.6 Extração de RNA Total.....	73
5.4.2.7 Tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	74

5.4.2.8 PCR quantitativo com transcrição reversa (RT-qPCR).....	75
5.4.2.9 Cálculo da expressão gênica relativa.....	76
5.5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	78
5.5.1 Avaliação da concentração de resveratrol em diferentes tempos de coleta após indução	78
5.5.2 Avaliação da expressão relativa de Resveratrol sintase em diferentes tempos de coleta após indução	82
5.5.3 Relação entre a produção de resveratrol e nível de expressão de Resveratrol sintase.....	84
5.6 CONCLUSÃO.....	85
6.0. CONCLUSÃO GERAL	86
7.0. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	91
8.0. ANEXOS.....	108

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Via dos fenilpropanóides (via mista). Enzimas: PAL, fenilalanina amonia-liase; C4H, cinamato-4-hydroxilase; 4CL, 4-cumaroil: CoA-liase; CHS, chalcona sintase; STS, estilbeno sintase (Vannozzi <i>et al.</i> , 2012).....	29
Figura 2: Esquema de indução de folhas de espécies do gênero <i>Arachis</i> por UV e armazenamento das amostras para posterior análise de metabólitos.....	39
Figura 3: Concentrações de resveratrol (µg/g de folha) em 17 amostras de 12 espécies de <i>Arachis</i> . As barras indicam a concentração do metabólito em micrograma por grama de folha e as letras indicam diferença significativa entre os genótipos.....	43
Figura 4: Esquema dos processos realizados no experimento utilizando folhas de <i>Arachis hypogaea</i> cv. Runner 886, <i>A. duranensis</i> , <i>A. ipaënsis</i> , <i>A. stenosperma</i> e anfidiploide sintético (K30076 X V14167) para avaliação da produção de resveratrol e expressão de Resveratrol sintase.	71
Figura 5: Análise por HPLC da concentração de resveratrol após indução por UV em folhas de espécies da seção <i>Arachis</i> nos tempos de coleta pós indução: 0,7,15 e 24 horas.	80
Figura 6: Curvas de amplificação obtidas pelas reações de RT-qPCR utilizando <i>primers</i> para o gene de referência da proteína ribossomal 60S, para amostras tratadas e não tratadas com UV de <i>A. hypogaea</i> , anfidiploide sintético, <i>A. duranensis</i> , <i>A. ipaënsis</i> e para <i>A. stenosperma</i>	82
Figura 7: Expressão relativa de Resveratrol sintase (RS) em folhas dos cinco genótipos de <i>Arachis</i> após o tratamento com raios ultravioletas (UV) em relação ao controle. Todas as amostras tiveram um perfil de expressão positivamente regulado. Os valores correspondem as médias de expressão encontradas nos tempos de coleta 0, 7, 15 e 24hs pós indução por UV.....	83
Figura 8 Concentração de resveratrol e expressão relativa de Resveratrol sintase em relação ao controle em diferentes tempos de coleta após indução por UV. A) Resultados referentes à <i>A. hypogaea</i> Runner 886. B) Resultados referentes ao anfidiploide sintético (K30076 X V14167). C) Resultados referentes à <i>A. ipaënsis</i> . D) Resultados referentes à <i>A. duranensis</i> . E) Resultados referentes à <i>A. stenosperma</i>	85

Figura 9	Acúmulo de resveratrol (A) e RS mRNA (B) em folhas de amendoim em resposta ao tratamento de duas horas com UV, avaliada 0, 3 e 12 horas após o tratamento (S. D.: <i>standard deviation</i>). Fonte: Chung <i>et al.</i> , 2003.....	88
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Concentração de resveratrol ($\mu\text{g/g}$) em folhas de espécies da seção <i>Arachis</i> submetidas à radiação ultravioleta (2:30h) e coletadas 15h após o tratamento. Dados disponíveis nos trabalhos de Lopes <i>et al.</i> (2013) e Carvalho (2013).....	31
Tabela 2: Seções, espécies e acessos de germoplasma do gênero <i>Arachis</i> avaliados quanto ao potencial de produção de resveratrol utilizando-se tecido foliar submetido à luz ultravioleta (UV).....	37
Tabela 3: Média das concentrações de resveratrol ($\mu\text{g/g}$) de espécies da seção <i>Arachis</i> por tipos de genoma avaliados. Médias indicadas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem ($\alpha < 0,05$) de acordo com o teste de Scott-Knott.....	44
Tabela 4: Comparação entre concentrações de resveratrol. Fontes: Douillet-Breuil <i>et al.</i> , 1999; Chukwumah <i>et al.</i> , 2007; Lopes <i>et al.</i> , 2013; Carvalho 2017.....	49
Tabela 5: Genótipos avaliados em relação à concentração de resveratrol em folhas induzidas por UV. Foram analisados anfidiplóides sintéticos, espécies silvestres de <i>Arachis</i> utilizadas como parentais e híbridos resultantes dos cruzamentos entre alotetraplóides e cultivares de <i>A. hypogaea</i>	56
Tabela 6: Concentração de resveratrol em $\mu\text{g/g}$ de folha de anfidiplóides sintéticos, em espécies silvestres de <i>Arachis</i> utilizadas como parentais e híbridos resultantes dos cruzamentos entre alotetraplóides e cultivares de <i>A. hypogaea</i>	60
Tabela 7: Produção de resveratrol nos diferentes tipos de genótipos avaliados por nível de significância entre os grupos. A análise foi feita com Teste de Scott-Knott a 5%.	62
Tabela 8: Concentrações de resveratrol em $\mu\text{g/g}$ de folhas de cinco diferentes genótipos coletadas em cinco diferentes tempos pós indução (hpi).....	78
Tabela 9: Produção de resveratrol em $\mu\text{g/g}$ em <i>Arachis hypogaea</i> cultivar Runner 886, anfidiplóide sintético (K30076 X V14167), <i>A. ipaënsis</i> K30076, <i>A. duranensis</i> V14167 e <i>A. stenosperma</i> V10309, mediante estímulo por UV. Os valores correspondem às médias de resveratrol nos tempos 0, 7, 15 e 24hpi. As letras na terceira coluna indicam diferença significativa entre os genótipos. O teste utilizado foi o de Scott-Knott.....	81

Tabela 10:	Expressão relativa de Resveratrol sintase (RS) dos cinco genótipos avaliados em cada tempo de coleta sempre em relação às amostras controle.	84
Tabela 11:	Teores de resveratrol de folhas de espécies de cinco seções do gênero <i>Arachis</i> induzidas por radiação ultravioleta (UV) por 2:30h e controle.....	108
Tabela 12:	Concentração de resveratrol em µg/g de folhas induzidas por UV e controle de anfidiplóides sintéticos, espécies silvestres de <i>Arachis</i> utilizadas como parentais e híbridos resultantes dos cruzamentos entre alotetraplóides e cultivares de <i>A. hypogaea</i>	109
Tabela 13:	Concentração de resveratrol em µg/g de folhas de cinco genótipos de <i>Arachis</i> controle e induzidas por UV coletadas em quatro tempos após indução.....	116

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente o gênero *Arachis* possui 81 espécies descritas que ocorrem naturalmente no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Valls & Simpson, 1994). As espécies do gênero estão classificadas nas seguintes nove seções taxonômicas: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides*, e *Triseminatae* (Krapovickas & Gregory 1994; Valls & Simpson, 2005). A divisão do gênero em nove seções foi feita com base nas diferenças de morfologia, distribuição geográfica e cruzabilidade entre as diferentes espécies (Krapovickas & Gregory, 1994, Valls & Simpson 2005; Valls *et al.*, 2013).

O gênero *Arachis* possuem algumas espécies cultivadas e entre elas destaca-se o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), que tem sido cultivado pelo mundo todo por ser uma boa fonte de lipídeos e proteínas (Campos-Mondragón *et al.*, 2009). O gênero possui outras espécies cultivadas, como *A. pinto* e *A. repens*, da seção *Caulorrhizae*, e *A. glabrata* da seção *Rhizomatosae* (Kerridge *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 2007).

As espécies silvestres do gênero *Arachis* podem ser utilizadas nos melhoramento das espécies cultivadas e podem ser utilizadas per se. Por exemplo, *Arachis hypogaea* faz parte da seção *Arachis*, uma das nove seções taxonômicas do gênero *Arachis*, que são na maioria silvestres e diploides (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005). As espécies silvestres possuem características não encontradas no *pool* gênico primário do amendoim, como, por exemplo, resistência a doenças fúngicas (Pande & Rao, 2001; Fávero *et al.*, 2009). As espécies silvestres podem também ser utilizadas no melhoramento do amendoim para a qualidade nutricional e, por isso, têm sido caracterizadas para quantidade de óleo e teores de proteínas (Giannuzzo *et al.*, 2000). Lopes *et al.* (2013) avaliaram dez espécies silvestres da seção *Arachis* com relação à produção de resveratrol, que é um composto nutracêutico, com comprovada ação na prevenção de câncer e de cardiopatias (Baur & Sinclair, 2006). O resveratrol é também uma fitoalexina envolvida na resposta da planta a estresses bióticos e abióticos no amendoim (Chung *et al.*, 2003; Sobolev *et al.*, 2007; Zorzete *et al.*, 2011).

Espécies de outras seções do gênero, que não da Seção *Arachis*, tem sido avaliadas utilizando-se diferentes marcadores, como os citogenéticos (Ortiz *et al.*, 2017; Seijo *et al.*, 2014), morfológicos (Leal-Bertioli *et al.*, 2017B) e moleculares (Chopra *et al.*, 2016; Nguenpjob *et al.*, 2015; Seijo *et al.*, 2014). Essas caracterizações tem contribuído de diversas maneiras para a conservação, como, por exemplo, avaliando a variabilidade genética, os sistemas de cruzamentos, importantes durante os processos de multiplicação e regeneração dos acessos, identificação de duplicatas, etc. Entretanto,

pouco tem sido feito para valoração desse germoplasma para uso per se, principalmente nas espécies de seções distantes da seção *Arachis*, e que não podem ser utilizadas no melhoramento do amendoim cultivado.

A investigação do potencial de produção de resveratrol em espécies de diferentes seções de *Arachis* é importante para valorização desse recurso genético, podendo implicar no uso desse em programas de melhoramento genético, ou uso per se como fonte de matéria prima para extração do composto.

A investigação de resveratrol em *Arachis* passa ainda pelo melhor entendimento da variação desse composto em espécies e seus híbridos tetraploides, que tem sido gerados para facilitar a transferência de genes de espécies diploides silvestres para o amendoim cultivado, que é um tetraploide.

Outro ponto importante no processo de uso das espécies de *Arachis* para produção de resveratrol é entender os porquês das variações observadas entre elas. Para tanto, a melhor maneira é avaliação da resveratrol sintase, enzima chave na síntese de resveratrol, e cuja variação na expressão entre os genótipos avaliados certamente contribuíra para entender melhor a variação no teor de resveratrol entre os vários genótipos de *Arachis*.

O presente trabalho teve como objetivo analisar o teor de resveratrol em germoplasma de *Arachis*, incluindo espécies de diferentes seções do gênero *Arachis*, alotetraploides sintéticos, linhagens de introgressão e seus genitores e cultivares de amendoim utilizadas nos cruzamentos. Além disso, pretende-se observar em paralelo a expressão do gene da Resveratrol Sintase (RS) e a concentração de resveratrol em cinco genótipos de *Arachis* em diferentes tempos de coleta após indução da síntese de resveratrol por luz ultravioleta.

2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Recursos Genéticos de *Arachis*

A rica diversidade vegetal global foi amplamente classificada em duas categorias: espécies silvestres e espécies cultivadas. Singh, em 1975, coloca que cerca de vinte “regiões de diversidade” foram catalogadas como centro de origem das espécies cultivadas (Zukozskij, 1971), e 37 para espécies silvestres (Good, 1953). A preservação dessas áreas foi defendida no início do século vinte por Nikolai Ivanovich Vavilov, em seu trabalho sobre centros de origem de domesticação de plantas (Baudoin, 2009). O pesquisador acreditava que as áreas de surgimento de espécies domesticadas também eram ricas em espécies silvestres relacionadas, e essas deveriam ser preservadas por conter características que poderiam posteriormente ser interessantes e utilizadas (Baudoin, 2009).

Em contrapartida com o conceito de preservação, com o passar dos anos foi observado a perda da diversidade fitogenética de maneira exponencial. Em 1990, já se fazia a previsão de que cerca de um milhão de espécies seriam extintas até o ano de 2050 (McNeely *et al.*, 1990). Para evitar tal degradação, a primeira estratégia internacional relacionada à conservação de recursos genéticos foi a criação do *Internacional Board for Plant Genetic Resources*, pela FAO em 1974. Em seguida, várias foram as reuniões de líderes governamentais a fim de preservar a biodiversidade local. Nesse sentido, em 1992, foi realizada a Convenção da Diversidade Biológica, estabelecendo três objetivos básicos: a conservação da diversidade biológica; o uso sustentável de seus componentes; e a divisão justa e equitativa dos benefícios advindos do uso dos recursos biológicos (Veiga *et al.*, 2015).

Atualmente, os sistemas de conservação de recursos genéticos no Brasil se destacam por promover o processo de conservação apoiado em um banco genético representado pela coleção de base de germoplasma de semente conservado a longo prazo, além do banco ativo de germoplasma para cada espécie, no qual são desenvolvidas ações específicas de caracterização, avaliação, multiplicação, regeneração e conservação a curto e médio prazos. Atrrelado a essas ações, existem pesquisas responsáveis pelo uso desses recursos genéticos, isso porque a diversidade é conservada principalmente para o melhoramento de culturas (Veiga *et al.*, 2015).

Cirino 2015 coloca que os recursos genéticos são essenciais para o sucesso de programas de melhoramento, pois disponibilizam a variedade genética para efetuar novas combinações gênicas e por meio da seleção, desenvolver cultivares para atender as necessidades do produtor. Desse modo, os recursos genéticos são fundamentais para enfrentar o desafio de aumentar em 30% a produção de alimentos até 2050, para atender a demanda da população mundial projetada para nove bilhões de habitantes, sem expandir as fronteiras agrícolas, uma vez que a disponibilidade de novas áreas é limitada pelo aumento de áreas urbanas e áreas de preservação.

O gênero *Arachis* apresenta distribuição natural no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Valls & Simpson, 1994). Além do amendoim cultivado (*A. hypogaea*) que se destaca no mercado alimentar, outras espécies do gênero também apresentam importância econômica. O interesse pelos recursos genéticos de *Arachis* fundamenta-se no impacto econômico e no ecológico potencial de exploração da variabilidade genética de cada uma de suas espécies cultivadas, aproveitando sua eventual compatibilidade reprodutiva, mesmo que haja necessidade de manipulação de níveis de ploidia (Valls, 2013).

2.2. A importância do amendoim

O amendoim apresenta em sua constituição nutricional uma média de 38% de proteína, 47% de lipídios, vários sais minerais como o fósforo (263,60mg/100g) e potássio (328,00mg/100g) (Asibuo *et al.*, 2010) e vitaminas E, K e do complexo B (Savage & Keenan, 1994). Países sem recursos acabam recorrendo ao amendoim como uma rica fonte de nutrientes menos onerosa, mais acessível e facilmente aceitável, sendo utilizada em programas de combate à desnutrição em formato de pasta de amendoim por meio da OMS (Peanut Butter for the Hungry 2013, WHO 2014).

O consumo do amendoim ocorre desde tempos pré-históricos, onde várias populações indígenas o cultivavam como fonte de nutrientes em sua dieta diária (Freitas *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2005). Esse consumo perdura até os dias atuais, sendo o amendoim uma das oleaginosas mais consumidas em todo o mundo (*Global Statistical Review* 2015). Os principais produtores de amendoim são China (40% da produção), Índia (18%) e EUA (7%) e também os principais consumidores. Na América do Sul, Argentina e Brasil produzem 2,5% e 0,87% da produção mundial (Santos *et al.*, 2013).

A produção mundial de amendoim teve aumento de 15% entre os anos de 2005 a 2015, subindo para 19% quando analisados somente países em desenvolvimento

(*Global Statistical Review* 2015). Em 2017 a produção brasileira de amendoim apresentou um crescimento de 18,8% com relação ao ano anterior, alcançando 371,489 mil toneladas, de acordo com Levantamento Sistemático de Produção Agrícola (LSPA, 2015). O Estado de São Paulo é o principal produtor e contribui com 89% da produção nacional, os outros estados produtores são Minas Gerais; Paraná e Rio Grande do Sul (LSPA, 2015).

2.3. Gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* tem como possível origem a Serra de Amambai, no limite de Mato Grosso do Sul com o Paraguai, onde ocorre *A. guaranitica*, possivelmente a espécie de *Arachis* mais antiga (Krapovickas & Gregory, 1994). O gênero se estendeu por cerca de 4.000 km podendo atualmente ser encontrado em habitats como savanas, regiões semiáridas, área limítrofe de floresta tropical e áreas úmidas (Krapovickas & Gregory, 1994).

Existe uma característica típica de todas espécies de *Arachis*: o potencial de desenvolver o “peg”, termo em inglês que nomeia uma estrutura de alongação do ovário que se dá após a ocorrência da fecundação (Pellegrini, 2013). Ele se alonga em direção ao solo por geotropismo positivo, onde ocorre o desenvolvimento dos frutos e sementes. A ocorrência de sementes de forma geocárpica é outra singularidade do gênero (Krapovickas & Gregory 1994).

Atualmente o gênero *Arachis* possui 81 espécies descritas que ocorrem naturalmente no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Valls & Simpson, 2013). As espécies do gênero estão classificadas nas seguintes nove seções taxonômicas: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides*, e *Triseminatae* (Krapovickas & Gregory 1994; Valls & Simpson, 2005). A divisão do gênero em nove seções foi feita com base nas diferenças de morfologia, distribuição geográfica e cruzabilidade entre as diferentes espécies (Krapovickas & Gregory, 1994, Valls & Simpson 2005; Valls *et al.*, 2013).

As seções *Caulorrhizae*, *Triseminatae*, *Heteranthae* e *Extranervosae* ocorrem apenas no Brasil (Stalker & Simpson, 1995), que é considerado a fonte da maior diversidade genética do gênero devido à ocorrência natural de espécies de todas as seções, sendo 48 delas endêmicas (Krapovickas & Gregory 1994).

2.4. Seções avaliadas (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Procumbentes* e *Triseminatae*)

Seção *Arachis*

A seção *Arachis* é uma das nove seções do gênero *Arachis* e contém o maior número de espécies entre as seções, totalizando 33 e entre elas o amendoim cultivado, *A. hypogaea* (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005).

As espécies da seção *Arachis* se caracterizam por serem anuais ou perenes, sem rizomas ou estolões, raiz pivotante e eixo central ereto, com ramos procumbentes estendidos, as estípulas têm margens abertas e as folhas são tetrafolioladas, as flores são papilionadas e estão distribuídas ao longo dos ramos, com o estandarte sempre expandido, alaranjado ou amarelado (Krapovickas & Gregory, 1994). O *peg* é vertical ou inclinado, mas nunca horizontal e o fruto subterrâneo é geralmente biarticulado com dois segmentos de fruto com uma semente cada (nas espécies silvestres) ou com um segmento de fruto plurisseminado (em *A. hypogaea*) (Krapovickas & Gregory, 1994).

A distribuição geográfica da seção *Arachis* tem uma forma peculiar, abrangendo as bacias hidrográficas dos rios Paraguai e Uruguai e terminando no rio La Plata (Krapovickas & Gregory, 1994). No extremo norte da área de ocorrência encontra-se a Chapada dos Parecis, que separa a bacia do Rio Paraguai da Amazônia e que parece ter sido um obstáculo que, pela sua altura, não permitiu que a seção se estendesse ainda mais para o norte (Krapovickas & Gregory, 1994). Sobre o centro da região, prevalecem as espécies perenes, onde quase todas são encontradas ao longo dos cursos d'água e algumas delas são adaptadas às inundações periódicas, bem como espécies anuais que vivem no Pantanal Mato Grosso, onde são permanentemente expostas a inundações maiores (Krapovickas & Gregory, 1994). Isolada no extremo do continente americano, encontram-se acessos de *A. stenosperma*, uma espécie anual que cresce nas areias da costa Atlântica, evidentemente levada pela ação humana (Krapovickas & Gregory, 1994). Desse modo, devido as diversas regiões geográficas onde podem ser encontradas e ao grande número de espécies, a seção *Arachis* pode ser considerada a maior e mais heterogênea do gênero (Krapovickas & Gregory, 1994).

As espécies da seção *Arachis* possuem diferentes tipos de genomas. Espécies que apresentam o par de cromossomos “A” são classificadas como de genoma A e as sem o par “A” foram classificadas em genomas B (Smartt *et al.*, 1978), D (Stalker, 1991) e mais recentemente em F, K, e G por meio de evidências de citogenética

molecular (Seijo *et al.*, 2004, 2007; Grabiele *et al.*, 2012; Silvestri *et al.*, 2015). As espécies silvestres são diploides ($2n=20$ ou $2n=18$). *Arachis monticola* é a exceção por ser a única espécie silvestre tetraploide e juntamente com o amendoim cultivado ter constituição genética $2n=40$ cromossomos, apresentando dois conjuntos gênicos A e B (Fernández & Krapovickas, 1994).

Seção *Caulorrhizae*

A seção *Caulorrhizae* tem distribuição geográfica na área de fronteira entre os estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás, chegando até a costa Atlântica (Krapovickas & Gregory, 1994).

Arachis pintoii e *A. repens* constituem as duas espécies da seção e se destacam como forrageiras e ornamentais (Castro *et al.*, 2007). Além disso, *A. pintoii* mantém uma área foliar satisfatória o que a torna amplamente utilizada em pastagens cultivadas para sistemas intensivos (Kerridge *et al.*, 1994).

Seção *Extranervosae*

A seção *Extranervosae* é composta de dez espécies (Krapovickas & Gregory, 1994) e é considerada uma das seções mais primitivas do gênero (Valls & Simpson, 1994).

As espécies da seção *Extranervosae* são encontradas na área que inclui os estados de Goiás, Tocantins, o centro do Mato Grosso e o norte do Triângulo Mineiro, em Minas Gerais, sendo que poucas espécies se estendem além dos limites desses estados, como *A. prostrata*, que foi coletada no oeste da Bahia, e *A. Burchellii*, que também ocorre no sul do Maranhão, sudeste do Pará e nos entornos de Teresina, no Piauí (Krapovickas & Gregory, 1994).

A maioria das espécies dessa seção cresce em um tipo muito especial de solo, frequentemente encontrado no cerrado, constituído por uma fina camada de terra sobre um substrato pedregoso (Krapovickas & Gregory, 1994). Uma de suas espécies é *A. villosulicarpa*, que já foi caracterizada como tendo altos teores de óleo nas sementes e com conteúdo de triptofano que pode ser maior do que em cultivares de *A. hypogaea* (Amaya *et al.*, 1977). Além do alto valor nutricional, foi a única espécie entre 85 genótipos analisados que teve um acesso que apresentou resistência aos fungos *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum* (Abdou *et al.*, 1974).

Seção *Procumbentes*

A seção *Procumbentes* é composta por nove espécies que estão distribuídas geograficamente ao longo do Rio Paraguai, desde Concepción em direção ao norte, cercando o pantanal no Mato Grosso e depois se expande para o oeste até Santa Cruz de la Sierra, na Bolívia (Krapovickas & Gregory, 1994). As espécies geralmente vivem em solos que são periodicamente inundados (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005).

Em relação ao valor nutricional, no estudo de Huang *et al.* (2012) em que foram avaliados teores de óleo de 72 acessos pertencentes a 19 espécies silvestres de cinco diferentes seções de *Arachis* e três cultivares de *A. hypogaea*, os acessos de *A. appressipila*, *A. chiquitana* e *A. rigonii*, da seção *Procumbentes* analisados tiveram os maiores teores de óleo.

O acesso de *A. chiquitana* (ICG 11560) se destacou por apresentar taxas reduzidas de colonização de *Aspergillus flavus* quando comparado a 35 acessos pertencentes a 24 espécies de seis seções do gênero *Arachis* (Thakur *et al.*, 2000).

Seção *Triseminatae*

A seção *Triseminatae* tem como única espécie *A. triseminata* e juntamente com as seções *Extranervosae*, *Caulorrhizae* e *Heteranthae*, ocorrem somente no Brasil (Krapovickas & Gregory, 1994; Stalker & Simpson, 1995).

Arachis triseminata cresce no estado da Bahia, no sul de Pernambuco e no norte de Minas Gerais, aos arredores do Rio São Francisco. Ocorre na caatinga e crescendo em solo argiloso, sendo caracterizadas como densas e capazes de fornecer uma alimentação muito palatável para o gado (Krapovickas & Gregory, 1994).

Arachis triseminata apresenta isolamento genético porque não é possível a obtenção de híbridos a partir de cruzamentos interespecíficos (Krapovickas & Gregory, 1994).

Em relação ao potencial de resistência a patógenos, Thakur *et al.* (2000) observaram que dois acessos de *A. triseminata* (ICG 8131 e ICG 14875) apresentaram baixas taxas de colonização por *Aspergillus flavus*.

2.5. A origem do amendoim cultivado

Arachis hypogaea se originou por meio de um evento de hibridação de duas espécies diploides silvestres, *A. duranensis* (doadora do genoma A) e *A. ipaënsis* (doador do genoma B), seguido por uma duplicação cromossômica espontânea restaurado a fertilidade, estabelecendo a fórmula genômica AABB e, originado a

espécie alotetraplóide *A. hypogaea* (Halward *et al.*, 1991; Kochert *et al.*, 1996; Fávero *et al.*, 2006; Seijo *et al.*, 2004; 2007; Bertoli *et al.*, 2016). Por isso é caracterizada como um alotetraploide ($2n=4x=40$), ou seja, dois conjuntos completos de cromossomos de diferentes genomas (A e B) estão presentes no mesmo núcleo (Seijo *et al.*, 2004; 2007).

O amendoim tornou-se isolado reprodutivamente de seus parentes silvestres diploides e esse isolamento levou a uma limitada variabilidade genética no amendoim cultivado como observado em estudos com marcadores moleculares (Kochert *et al.*, 1996; Milla *et al.*, 2005; Moretzsohn *et al.*, 2005). A única espécie silvestre tetraploide capaz de cruzar naturalmente com o amendoim é *A. monticola*, considerado o antepassado imediato de *A. hypogaea* (Krapovickas & Gregory, 1994) apresentando alta similaridade genética (Moretzsohn *et al.*, 2013)

2.6. Espécies silvestres e o melhoramento do amendoim cultivado

De acordo com Stalker & Moss (1987), o *pool* gênico primário de *A. hypogaea* consiste nas variedades de *A. hypogaea* e sua forma silvestre *A. monticola*; o *pool* gênico secundário consiste nas espécies diploides da seção *Arachis*, que são compatíveis com *A. hypogaea*, mas precisam passar por manipulação de ploidia para que possam cruzar com o amendoim; e o *pool* gênico terciário consiste nas espécies das seções *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Trierectoides*, *Triseminatae* e *Rhizomatosae*, que podem ser cruzadas com espécies cultivadas usando técnicas de biotecnologia.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia têm caracterizado e avaliado acessos de todo gênero *Arachis*, com o intuito de valorizar esse germoplasma e identificar acessos para serem utilizadas em programas de melhoramento genético.

A técnica de obtenção de híbridos mais promissora consiste no cruzamento entre uma espécie de genoma A com uma de genoma B, gerando um híbrido estéril. Esse híbrido é tetraploidizado com o uso da colchicina, tornando-se um anfiplóide fértil que pode ser cruzado com *A. hypogaea* e retrocruzado várias vezes até que todos os caracteres de interesse em *A. hypogaea* sejam recuperados (Santos *et al.*, 2013). O desenvolvimento de anfidiplóides é comprovadamente a melhor maneira de introgridir genes de espécies silvestres no amendoim cultivado devido a essa metodologia proporcionar a recombinação de caracteres de dois genomas diferentes (Singh *et al.*, 1991).

Estudos anteriores demonstraram a importância do uso de espécies silvestres da seção *Arachis*. Por exemplo, acessos de diferentes espécies, quando comparadas com o amendoim cultivado, têm se mostrado mais resistentes à mancha castanha (*Passalora arachidicola*) (Fávero, 2004), a mancha preta (*Cercosporidium personatum*) e ferrugem (*Puccinia arachidis*) (Pande & Rao, 2001; Fávero *et al.*, 2009). Também, apresentam níveis de resistência ao vírus (*Groundnut rosette assistor virus* - GRAV) (Subrahmanyam *et al.*, 2001) e podem ser mais resistentes à estresses abióticos (Nautyval *et al.*, 2008).

As cultivares COAN e Nematam, que são resistentes aos nematoides das galhas *Meloidogyne arenaria* e *M. javanica*, são exemplos de sucesso de uso de espécies silvestres no melhoramento de amendoim. Essas duas cultivares possuem alelos introduzidos de *A. cardenasii*, *A. diogoi* e *A. batizocoi*, espécies silvestres de *Arachis* (Simpson & Starr, 2001; Church *et al.* 2005).

O pool gênico terciário do amendoim, ou seja, espécies silvestres de outras seções que não a *Arachis*, também têm sido estudadas e caracterizadas para resistência a doenças. Um exemplo é o estudo de Nautyval *et al.* (2008) no qual foi observado que acessos de *A. paraguariensis* (seção *Erectoides*) foram resistente à estresse térmico entre os 36 acessos de 12 espécies silvestres pertencentes a seis diferentes seções do gênero *Arachis*.

Sharma *et al.* (2013) colocam em sua revisão sobre melhoramento genético de leguminosas, que o sucesso de um programa de pré-melhoramento depende da identificação de um doador promissor com boa expressão de determinada característica. Por isso, a importância da caracterização das espécies diploides utilizadas em programas de melhoramento genético.

Assim, a identificação de acessos que possuam características de interesse para o melhoramento do amendoim é imprescindível para maior sucesso dos programas de melhoramento. Por isso a caracterização e seleção de acessos diferentes é fundamental, pois entre acessos da mesma espécie há variabilidade para características de interesse agrônomo, como por exemplo, valor nutricional (Grosso *et al.*, 2000) e resistência à ferrugem e mancha preta (Pande & Rao, 2001; Mallikarjuna & Sastri, 2002). Nesse sentido, é fundamental a caracterização do germoplasma do gênero *Arachis* bem como o estudo de como essas características se apresentam em anfidiplóides e cruzamentos.

2.7. Resveratrol

Resveratrol é um polifenol da classe dos estilbenos (3,5, 4'-triidroxiestilbeno) que consiste em dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de metileno e pode se apresentar nas formas *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* a mais comum e de maior atividade biológica (Lamuela-Raventos, *et al.*, 1995).

Com atividade antifúngica e antibacteriana o resveratrol é uma fitoalexina que a planta produz mediante estresses bióticos ou abióticos (Ingham, 1976; Rudolf & Resurreccion, 2005; Zorzete *et al.*, 2011). Esse composto é produzido naturalmente por 72 espécies de diferentes plantas, especialmente videiras, pinheiros, e leguminosas (Soleas *et al.*, 1997).

O resveratrol possui também atividade antioxidante e antiinflamatória (Frémont, 2000), por isso são atribuídos a ele os efeitos cardioprotetores do vinho (Siemann & Creasy, 1992) que explicaria o "paradoxo francês" (Renaud & Lorgeuil, 1992; Renaud, & Gueguen, 1998), isto é, a baixa frequência de doenças cardiovasculares em franceses apesar da dieta rica em gordura saturada. Várias pesquisas subsequentes mostraram que o resveratrol pode prevenir ou retardar a progressão de várias doenças (Bo *et al.*, 2013; Orsu *et al.*, 2013; Penalva *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016).

Visando benefícios à saúde, a indústria alimentícia tenta agregar valor aos seus produtos pela adição ou aumento do teor desta substância. Em função dessa demanda, vários trabalhos têm sido realizados para identificar fontes de resveratrol. Por exemplo, 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 à base de uva, principalmente sucos e vinhos (Mattivi & Nicolini, 1993). Sobolev & Cole (1999) observaram que amendoins torrados tinham o menor teor de resveratrol 0,055 µg/g, manteiga de amendoim apresentou 0,32 µg/g e o amendoim cozido, 5,13 µg/g.

2.8. Expressão do gene Resveratrol sintase (RS) e Biossíntese 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 (RS), o qual promove o acúmulo de mRNA e consequentemente da enzima resveratrol sintase (Lanz *et al.*, 1990) (também chamada estilbeno sintase- STS). 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 possui um papel regulatório na síntese do resveratrol.

Quando investigada a variação da expressão de RS bem como o acúmulo de resveratrol em resposta a estresses em *A. hypogaea*, os resultados indicam que os níveis de expressão 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). Estudos também apontam que a transferência do gene RS 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).

Em análise anterior, Carvalho (2013) ao analisar *A. hypogaea*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e anfidiplóide sintético (*A. ipaënsis* K30076 X *A. duranensis* V14167) apontou diferentes concentrações do metabólito nos genótipos avaliados, observando elevada expressão de RS nem sempre correspondia com elevadas concentrações de resveratrol e o inverso também ocorria. Por isso, a necessidade de um estudo que avalie diferentes tempos de coleta, a fim de identificar o tempo em que o potencial de produção de resveratrol chega ao seu máximo.

O acúmulo de mRNA de RS é responsável direto pelo aumento da enzima resveratrol sintase (também chamada estilbeno sintase- STS) (Lanz *et al.*, 1990), que por sua vez, catalisa a condensação entre uma molécula de 4-coumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA, formando o resveratrol (figura 1) (Soleas *et al.*, 1997).

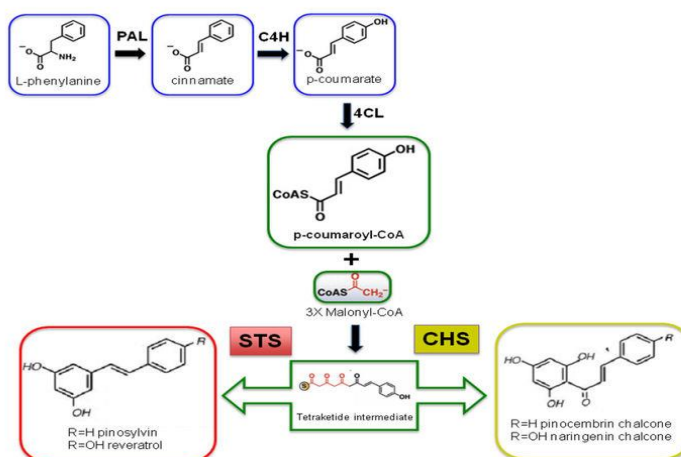


Figura 1: Via dos fenilpropanóides (via mista). Enzimas: PAL, fenilalanina amoniolase; C4H, cinamato-4-hidroxilase; 4CL, 4-coumaroil: CoA-liase; CHS, chalcona sintase; STS, estilbeno sintase (Vannozzi *et al.*, 2012).

2.9. O resveratrol no amendoim

O resveratrol em amendoim foi primeiramente identificado em hipocótilos infectados por fungos (Ingham, 1976). A partir de então, várias pesquisas apontaram a presença natural de resveratrol em diferentes tecidos de amendoim não infectadas, porém em concentrações extremamente baixas (Dorner *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2004; Potrebko & Resurreccion, 2009).

Tang *et al.* (2010) observaram que o estresse em amendoim foi fundamental no aumento da biossíntese simultânea de resveratrol e outros estilbenos. O nível de resveratrol em folhas e raízes de amendoim infectadas com leveduras foi em torno de 2,8 µg/g (Chung *et al.*, 2003). Yang *et al.* (2010) encontraram em culturas celulares de *A. hypogaea* infectadas por fungos, concentrações de resveratrol de aproximadamente 9 µg/g. Sobolev *et al.* (2007), utilizando sementes de diferentes cultivares de *A. hypogaea*, submetidas a diferentes tipos de estresses, associaram a resistência à infecção por fungos a 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*.

Além de estresses bióticos, estresses abióticos também são eficientes na indução da síntese de resveratrol. Potrebko & Resurreccion (2009) analisaram sementes de *A. hypogaea* submetidas à combinação de tratamentos com ultrassom (US), seguido por exposição à 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 dessa fitoalexina. Chung *et al.* (2003) verificaram aumento substancial no conteúdo de resveratrol em folhas, raízes, cascas e sementes de amendoim, em resposta a ferimentos artificiais, luz ultravioleta e hormônios, sendo que folhas submetidas a UV foi o material que apresentou maiores concentrações de resveratrol. Isso porque a radiação UV-C induz nas células efeitos semelhantes à apoptose, como a fragmentação nuclear e a danos no DNA (Danon & Gallois, 1998), em função da intensidade programada da corrente.

A análise da produção de resveratrol em amendoim em diferentes tempos de coleta após a indução por UV mostra que existe um pico na produção do metabólito (entre os tempos de 0-12 horas pós indução- hpi) seguido de queda (entre os tempos 12-64 hpi) (Tang *et al.*, 2010). Chung *et al.* (2003) observaram que a produção de

resveratrol e de transcritos do gene RS é crescente em amostras coletadas em diferentes tempos após a indução por UV (0,3 e 12 horas pós indução- hpi).

Tabela 1: Concentração de resveratrol ($\mu\text{g/g}$) em folhas de espécies da seção *Arachis* submetidas à radiação ultravioleta (2:30h) e coletadas 15h após o tratamento. Dados disponíveis nos trabalhos de Lopes *et al.* (2013) e Carvalho (2013).

Espécies avaliadas por Lopes <i>et al.</i> (2013)	Concentração de resveratrol ($\mu\text{g/g}$)	Espécies avaliadas por Carvalho, 2013.	Concentração de resveratrol ($\mu\text{g/g}$)
<i>Arachis batizocoi</i> K 9484	524,54	<i>Arachis stenosperma</i> V10229	422,18
<i>Arachis cardenasii</i> GKP 10017	752,24	<i>Arachis stenosperma</i> V10309	512,56
<i>Arachis cruziana</i> Wi 1302-3	564,67	<i>Arachis stenosperma</i> VAcLf 15076	412,25
<i>Arachis gregoryii</i> V 6389	370,14	<i>Arachis stenosperma</i> SvW 3712	336,14
<i>Arachis duranensis</i> K 7988	639,93	<i>Arachis duranensis</i> V14167	371,97
<i>Arachis ipaënsis</i> KG 30076	314,07	<i>Arachis ipaënsis</i> KG 30076	225,85
<i>Arachis kempff-mercadoi</i> V 13250	299,49	<i>Arachis valida</i> V13514	170,76
<i>Arachis kuhlmannii</i> V 9214	808,75	<i>Arachis williamsii</i> Wi1118	120,24
<i>Arachis magna</i> KG 30097	484,77	<i>Arachis hypogaea</i> cv. Caiapó Tatu	206,49
<i>Arachis simpsonii</i> V13710	318,37	<i>Arachis hypogaea</i> cv. Runner IAC 886	62,1
<i>Arachis hypogaea</i> CV IAC Caiapó	704,10	<i>Arachis hypogaea</i> cv. IAC Caiapó	185,99
		<i>Arachis hypogaea</i> CV BR-1	477,31

Coletores: V= J. F. M. Valls; Wi= D. E. Williams; K= A. Krapovickas; G= W. C. Gregory; P= J. R. Pietrarelli; Sv= G. P. Silva.

Espécies silvestres da seção *Arachis* também apresentaram potencial de sintetizar resveratrol mediante estímulo por UV em folhas (Tabela 1) (Lopes *et al.*, 2013; Carvalho, 2013). A análise do potencial em produzir resveratrol de espécies silvestres geralmente é realizada usando o tecido foliar porque essas espécies produzem poucas sementes. Além disso, o tecido foliar é o mais agredido por patógenos em cultivos de amendoim por ser o mais exposto.

2.10. Quantificação do resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

A atividade farmacológica do resveratrol estimulou o desenvolvimento de métodos analíticos para sua detecção e quantificação principalmente em extrato de plantas (Gerogiannaki-Christopolou *et al.*, 2006). A literatura aponta a metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência- CLAE como ideal para detecção de resveratrol em sementes, folhas e raízes de amendoim (Chung *et al.*, 2003; Rudolf & Resurreccion, 2005; Potrebko & Resurreccion, 2009; Lopes , 2011).

A CLAE é uma técnica cromatográfica que tem um líquido como fase móvel e fases estacionárias que podem ser líquidas ou 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 um cromatograma utilizado para identificar e quantificar os componentes da amostra analisada (Collins *et al.*, 2006). Atualmente uma ramificação da metodologia por CLAE, é a metodologia por HPLC. Nesta ocorre a análise da fase líquida de uma amostra, identificando os seus componentes por meio de uma curva padrão.

CAPÍTULO 1:
Avaliação da produção de resveratrol em espécies de cinco seções taxonômicas do
gênero *Arachis*

RESUMO

O gênero *Arachis* contém 81 espécies divididas em nove seções, sendo algumas dessas utilizadas na produção de forragem sob pastejo, plantas ornamentais e principalmente na indústria alimentícia. As demais espécies desse gênero também podem ser utilizadas *per se* ou no melhoramento das espécies cultivadas e por isso têm sido caracterizadas para resistência a estresse bióticos e abióticos, quantidade de óleos, teores de proteínas e capacidade de produção do potente antioxidante resveratrol. O resveratrol apresenta ação anti-inflamatória e cardioprotetora. Neste estudo, foram investigadas as concentrações de resveratrol em 17 genótipos de espécies distribuídas cinco seções (Seção *Arachis*: *A. glandulifera*, *A. hoehnei*, *A. krapovickasii*, *A. magna*, *A. monticola*, *A. palustris*, *A. praecox*, *A. hypogaea*; seção *Procumbentes*: *A. lignosa*; seção *Triseminatae*: *A. triseminata*; seção *Caulorrhizae*: *A. pintoii*; seção *Extranervosae*: *A. villosulicarpa*) e duas cultivares de *Arachis hypogaea* (IAC Caiapó e Runner IAC 886). Folhas foram destacadas de 15 plantas de cada acesso e submetidas à luz ultravioleta (UV) por 2h e 30min. Quinze horas após o tratamento foi realizada a extração do metabólito. O experimento de indução foi realizado três vezes consecutivas, cada uma delas com três repetições analíticas. Os resultados demonstraram que as amostras não tratadas não sintetizavam resveratrol. Por outro lado foi encontrado resveratrol em todas as espécies tratadas das cinco seções analisadas. As maiores concentrações de resveratrol foram encontrada em *A. lignosa* (843,87µg/g) da seção *Procumbentes* e a espécie com menores concentrações foi *A. monticola* (67,02µg/g) da seção *Arachis*. Diferentes acessos e cultivares da mesma espécie (*A. magna* e *A. hypogaea*) demonstraram concentrações de resveratrol que variaram significativamente. Os dados indicam que resveratrol é presente em todo o gênero *Arachis* e que existe variabilidade em acessos de uma mesma espécie. A presença de resveratrol em espécies de diferentes seções agrega valor nutricional a esses recursos genéticos, que mesmo distantes de *A. hypogaea* podem utilização *per se*.

Palavras chave: Seções, *Arachis*, resveratrol

INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* inclui 81 espécies, amplamente distribuídas por toda a América do Sul, sendo 48 delas endêmicas do Brasil (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005; Valls *et al.*, 2013). As diferentes espécies do gênero apresentam extensa variabilidade morfológica e genética (Krapovickas & Gregory, 1994).

Além de *A. hypogaea*, que faz parte da seção *Arachis*, espécies de outras seções passaram a ser comercialmente importantes devido a seu uso na produção de forragem sob pastejo como *A. pinto* (seção *Caulorrhizae*) e *A. glabrata* (seção *Rhizomatosae*) (Cook *et al.*, 1990) ou ainda, serem cultivadas como plantas ornamentais (Stalker & Simpson, 1995). As espécies silvestres também são importantes como *pools* genéticos das espécies cultivadas. Quando caracterizadas, as silvestres podem ser fontes de genes de interesse para o melhoramento, como resistência a diferentes estresses bióticos (Pande & Rao, 2001) e abióticos (Nautiyal *et al.*, 2008), pois são adaptadas a distintos habitats (Krapovickas & Gregory, 1994). A caracterização da variabilidade intraespecífica é um passo importante para valoração do germoplasma e, consequentemente, para seu uso.

As espécies silvestres podem também ser utilizadas no melhoramento do amendoim para a qualidade nutricional e por isso também têm sido caracterizadas para quantidade de óleos (Huang *et al.*, 2012) e teores de proteínas (Giannuzzo *et al.*, 2000). Além disso, Lopes *et al.* (2013) identificaram a produção do antioxidante resveratrol em outras nove espécies da seção *Arachis*, incluindo espécies de genomas A, AB e K. Porém até o presente momento, nada se pesquisou sobre a presença de resveratrol em outras seções do gênero.

O resveratrol apresenta ações anti-inflamatórias (Bo *et al.*, 2013; Orsu *et al.*, 2013; Penalva *et al.*, 2015) e cardioprotetoras (Meng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016) e antioxidante (Frankel *et al.*, 1993).

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de resveratrol em espécies silvestres de cinco diferentes seções do gênero *Arachis* e também avaliar a variação entre acessos de uma mesma espécie.

3.3.OBJETIVO GERAL

Avaliar a variabilidade entre e dentro de espécies de cinco seções do gênero *Arachis* para a produção de resveratrol.

Objetivos específicos

- Avaliar a produção de resveratrol em espécies de cinco seções do gênero *Arachis* (*Arachis*, *Extranervosae*, *Procumbentes*, *Triseminatae*, *Caulorrhizae*), após tratamento com luz ultravioleta (UV) por meio de HPLC;
- Avaliar a variação na produção de resveratrol entre acessos de uma mesma espécie (*A. magna* e *A. hoehnei*) após tratamento com UV;
- Avaliar a variação na produção de resveratrol entre cultivares de *A. hypogaea* (IAC Caiapó e Runner IAC 886) após tratamento com UV.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 MATERIAL

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. O estudo utilizou 17 acessos, representantes de 12 espécies de cinco seções do gênero *Arachis* (Tabela 2). As sementes foram obtidas no Banco Ativo de Germoplasma de espécies silvestres de *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, 15 plantas de cada genótipo foram cultivadas durante o período de março a junho de 2013, em casa de vegetação com condições monitoradas de controle de pragas, humidade, controle químico e adubação.

Tabela 2: Seções, espécies e acessos de germoplasma do gênero *Arachis* avaliados quanto ao potencial de produção de resveratrol utilizando-se tecido foliar submetido à luz ultravioleta (UV).

Seção	Espécie (Nº- de acessos disponíveis)	Cód. na coleção original	Origem
<i>Arachis</i>	<i>A. glandulifera</i> Stalker (2)	VSPmSv 13738	BRA-MT
	<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory (7)	VPoBi9140	BRA-MS
		VPoBi9094	BRA-MS
	<i>A. krapovickasii</i> C. E. Simpson, D. E. Williams, Valls & I. G. Vargas (1)	WiSVg1291	BOL-Chiquitos
	<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson (16)	VSPmSv 13765	BRA-MT
		V14724	BRA-MT
		V14727	BRA-MT
	<i>A. monticola</i> Krapov. & Rigoni (5)	VOsV14750	BRA-MT
		VOa 14165	ARG-Jujuy
		V14156	BRA-TO
		VOsV 14682	BRA-MT
	<i>A. praecox</i> Krapov., W.C. Gregory, & Valls (4)	cv IAC Caiapó CV Runner IAC 886	
	<i>A. hypogaea</i> L. (1278)		
<i>Procumbentes</i>	<i>A. lignosa</i> Krapov. & W.C. Gregory (5)	V13570	BRA-MS
<i>Triseminatae</i>	<i>A. triseminata</i> Krapov. & W.C. Gregory (1)	GK 12881	BRA-BA
<i>Caulorrhizae</i>	<i>A. pintoii</i> Krapov. & W.C. Gregory (184)	GK 12787	BRA-BA
<i>Extranervosae</i>	<i>A. villosulicarpa</i> Hoehne (10)	V 8816	BRA-MT

Coletores: Bi = L.B. Bianchetti; G=W.C. Gregory; K=A. Krapovickas; Oa= O. Ahumada; Pm=R.N. Pittman; Po= A. Pott; S=C.E. Simpson; Sv=G.P. Silva; V=J.F.M. Valls; Vg= I.G. Vargas; Wi= D.E. Williams.

3.4.2 MÉTODOS

3.4.2.1 Indução da síntese de resveratrol por UV

As análises foram realizados no mês de junho de 2013, utilizando-se tecido foliar de plantas com idade de dois meses.

O tipo de indução (UV) e o tempo de indução (2h30 min) foram embasadas em dados prévios sobre indução de resveratrol em *A. hypogaea* (Lanz *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 2003; Rudolf & Resurreccion, 2005; Tang *et al.*, 2010; Hasan *et al.*, 2013) e ainda em estudo já publicado com espécies silvestres da seção *Arachis* (Lopes *et al.*, 2013; Carvalho, 2013).

Depois de coletadas, as folhas que foram destacadas das 15 plantas de cada genótipo, foram armazenadas em sacos plásticos e no laboratório foram dispostas em duas bandejas 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 das bandejas foi colocada a 50 cm abaixo da luz ultravioleta (UV-C) (Fluxo Laminar: Trox Modelo FLV série: 235-81, com Lâmpada Philips TUV 30W/ 630 TB *LONGLIFE*) 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 15 horas em temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida as folhas de cada espécie foram divididas em alíquotas de 1g em três tubos de 50 mL e protegidas da luz com papel alumínio (Figura 2).

Todas as amostras foram induzidas simultaneamente e 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. O tempo total para realização de todo o experimento foi de 19 horas, considerando desde a indução das folhas (que sempre ocorreu as 14hs), o preparo das amostras nas bandejas, a indução por UV (duas horas e meia), o tempo pós indução de 15 horas, o armazenamento das folhas induzidas em tubos falcon e depois a estocagem no freezer -80°C.

O experimento foi repetido por três vezes consecutivas no intervalo de sete dias, representando as triplicatas biológicas.

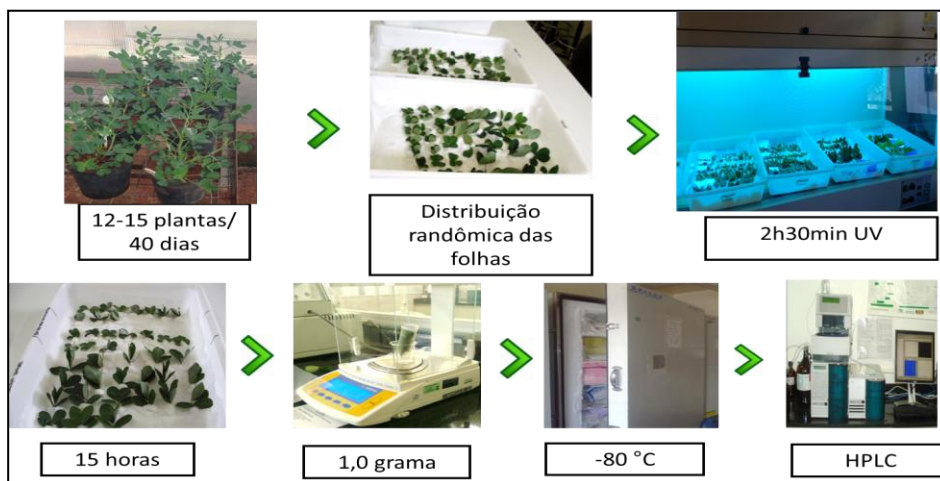


Figura 2: Esquema de indução de folhas de espécies do gênero *Arachis* por UV e armazenamento das amostras para posterior análise de metabólitos.

3.4.2.2 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. Cada amostra (1 g de folha) foi maceradas com auxílio de bastão de vidro e nitrogênio líquido e em seguida foi adicionado 0,840 mL de fenolftaleína (>98%, 2927-2835 µg/mL, Sigma-Aldrich) como padrão interno e 10 mL de álcool Etílico 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, foram adicionados 5 mL de álcool etílico 80% , misturado com auxílio de vórtex por dois minutos e centrifugado novamente. Esse procedimento foi repetido três vezes.

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, utilizando-se 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 CLAE (HPLC- *High Performance Liquide Chromatography*).

3.4.2.3 Preparo das amostras para injeção por HPLC

Antes da injeção por HPLC, o resíduo seco foi reconstituído com 6,8 mL de álcool etílico Álcool Etílico 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 (CLAE, 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).

3.4.2.4 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 fenoltaleína (>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).

3.4.2.5 Análise dos resultados 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%.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que todas as espécies induzidas produziram o metabólito e as amostras controle tiveram níveis tão baixos a ponto de não terem picos detectados no aparelho (Anexo 1). Tal resultado mostra como a indução por UV foi determinante na produção de resveratrol.

Os valores encontrados nas triplicatas biológicas do experimento de indução de resveratrol por UV mostram que não houve diferença significativa entre elas (Anexo 1). Diversos fatores influenciam a síntese de resveratrol pela planta como demonstrado em vários estudos (Jeandet *et al.*, 1991, Chung *et al.*, 2001, Chung *et al.*, 2003). Portanto, nossos resultados demonstram que os experimentos foram realizados em condições estáveis.

Os 17 genótipos avaliados apresentaram diferentes concentrações de resveratrol mediante o mesmo estímulo (Figura 3). Os genótipos apresentaram concentrações que, quando considerados os valores de significância de concentrações, puderam ser divididos em cinco grupos: grupo A, composto por *A. lignosa* e *A. triseminata*; grupo B, composto por *A. palustris*, *A. praecox*, *A. glandulifera*; grupo C, composto por *A. hypogaea* CV Runner IAC 886 e *A. krapovickasii*; grupo D, composto por *A. magna* (V 14750), *A. pinto*, *A. magna* (V14727), *A. hypogaea* cv. IAC Caiapó e *A. villosulcarpa*; grupo E, composto por *A. magna* (V14724), *A. magna* (V 13765), *A. hoehnei* (V 9140), *A. hoehnei* (V 9094) e *A. monticola*.

A presença de resveratrol em espécies de outras seções do gênero já era esperada visto que existem evidências de grupos taxonômicos correlatos têm muitos compostos bioquímicos em comum. Por exemplo, Wink (2003) avaliou os perfis de metabólitos secundários de três grandes famílias de plantas (*Fabaceae*, *Solanaceae* e *Lamiaceae*) e observou que ocorrem casos nos quais quase todos os membros de um clado monofilético possuem composições químicas muito semelhantes. Em se tratando de resveratrol, sua presença foi confirmada em dez espécies do gênero *Vaccinium* (Rimando *et al.*, 2004).

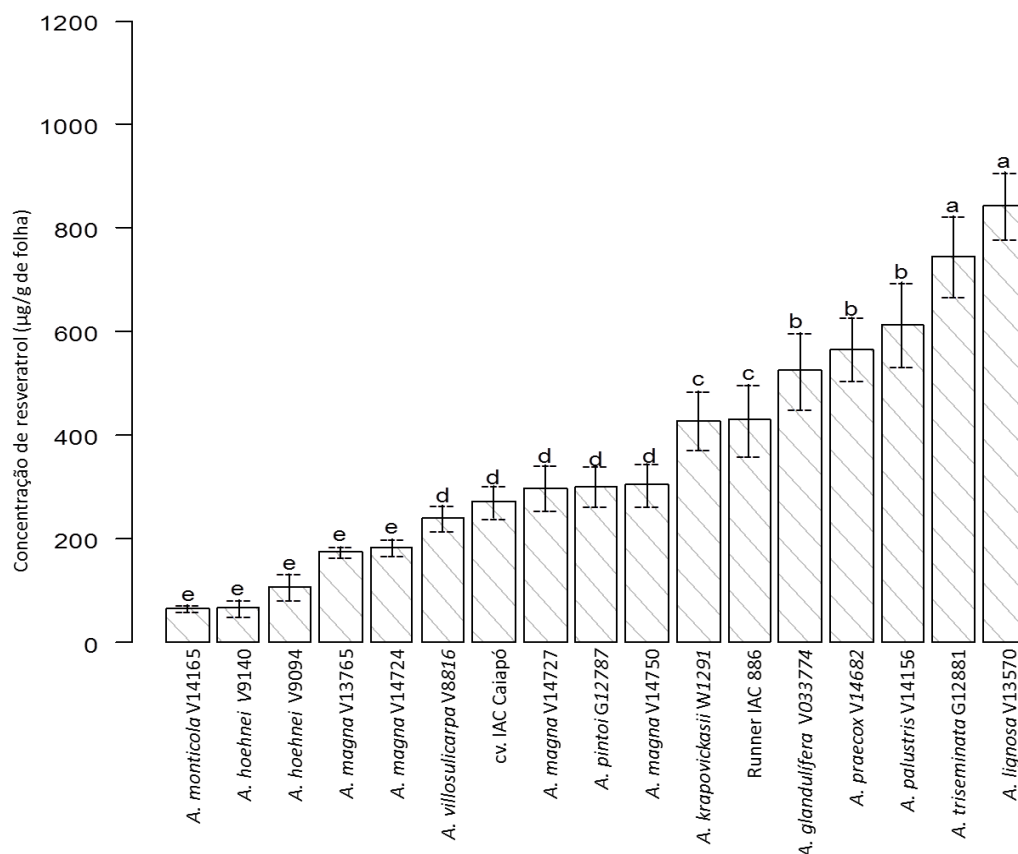


Figura 3: Concentrações de resveratrol (µg/g de folha) em 17 amostras de 12 espécies de *Arachis*. As barras indicam a concentração do metabólito em micrograma por grama de folha e as letras indicam diferença significativa entre os genótipos. Para cálculo de significância foi utilizado o teste *Anova*.

Como pode ser observado na Figura 3, não houve agrupamento de genótipos diploides e tetraploides, isto é, as concentrações de resveratrol variaram sem nenhuma relação com seus níveis de ploidia. A análise metabolômica entre os diploides e tetraploides sintéticos de *Arabidopsis thaliana* e *Pyrus communis* variedade *sativa* mostrou que um pequeno número de metabólitos diferem em suas quantidades entre diploides e tetraploides, para ambas as espécies (Tsukaya *et al.*, 2015). No estudo de Caruso *et al.* (2013) foi observado que a poliploidização de uma espécie silvestre de batata (*Solanum bulbocastanum*) não implicou em mudanças no perfil metabólico foliar, sendo que os genótipos tetraploides apresentaram teores de metabólitos semelhantes ou inferiores em comparação com o progenitor diploide. Por outro lado, o contrário também já foi mostrado, onde poliploides apresentaram rendimento de biomassa e compostos bioativos superiores em relação aos diploides (Xu *et al.*, 2014). Por isso, um

conjunto maior de poliploides (auto e aloploiploides) deve ser analisado para que seja realizada uma melhor avaliação sobre o impacto da poliploidização na variação do teor de resveratrol.

Seção *Arachis*

Ampla variação foi observada quanto à produção de resveratrol entre as oito espécies da seção *Arachis* avaliadas (Tabela 3). Nessa nova análise, *A. magna* V13765 e *A. magna* V14724 passaram a fazer parte do mesmo grupo de significância de *A. magna* V14727 e Caiapó. Os demais acessos permaneceram sem alterações em relação aos grupos de significância.

Tabela 3: Média das concentrações de resveratrol ($\mu\text{g/g}$) de espécies da seção *Arachis* por tipos de genoma avaliados. Médias indicadas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem ($\alpha < 0,05$) de acordo com o teste de Scott-Knott.

Espécie	Genoma	Concentração de Resveratrol
<i>A. palustris</i> V14156	G	614,87 ^A
<i>A. praecox</i> V14682	G	567,25 ^A
<i>A. glandulifera</i> V13738	D	525,18 ^A
<i>A. hypogaea</i> Runner IAC 886	AB	430,7 ^B
<i>A. krapovickasii</i> W1291	K	429,94 ^B
<i>A. magna</i> V14750	B	305,08 ^C
<i>A. magna</i> V14727	B	299,63 ^C
<i>A. hypogaea</i> IAC Caiapó	AB	273,18 ^C
<i>A. magna</i> V13765	B	176,71 ^C
<i>A. magna</i> V14724	B	184,99 ^C
<i>A. hoehnei</i> V9140	A	108,51 ^D
<i>A. hoehnei</i> V9094	A	68,1 ^D
<i>A. monticola</i> V14165	AB	67,02 ^D

Os dados da Tabela 3 sugerem não haver relação entre tipo de genoma e teor de resveratrol, pois nossos dados e os de Lopes *et al.* (2013) e Carvalho (2013) demonstram que, no geral, espécies de mesmo genoma não se agrupam em relação ao teor de resveratrol. Apesar disso, sabe-se que o tipo de genoma é fundamental para obtenção de

híbridos férteis que podem ser cruzados com o amendoim, por isso a importância da análise de vários genomas.

Variações não significativas de concentração de resveratrol entre acessos de *A. hypogaea*, *A. magna* e *A. hoehnei* foram detectadas e no caso dos acessos das duas primeiras espécies, apresentaram concentrações mais similares a de espécies de outras seções (Figura 3). Carvalho (2013) também observou diferença significativa entre quatro diferentes cultivares de *A. hypogaea* (Runner, IAC Caiapó, BR-1 e IAC Tatu) e quatro acessos de *A. stenosperma* (*A. stenosperma* V10229, *A. stenosperma* V10309, *A. stenosperma* V15076 e *A. stenosperma* S3712). Em relação aos acessos de *A. magna* e *A. hoehnei* não houve variação significativa na produção de resveratrol. Portanto, os dados indicam que existe variação entre acessos e por isso a investigação de um maior número de acessos/cultivares se faz necessário para que sejam identificados aqueles que produzam mais resveratrol. Realizando assim a caracterização química desses acessos, contribuindo para descrição e caracterização desses recursos genéticos.

As espécies tetraploides da seção *Arachis* apresentaram concentrações de resveratrol que foram significativamente diferentes. A cultivar de *A. hypogaea* Runner (430,7 µg/g) teve média de concentração de resveratrol maior significativamente que a cultivar IAC Caiapó (273,18 µg/g) e *A. monticola* (67,01µg/g) teve a menor concentração observada (Figura 3). *Arachis monticola* é a única espécie silvestre tetraploide da seção *Arachis* e é considerada bastante próxima de *A. hypogaea*, também apresentando a fórmula genômica AABB (Krapovickas & Gregory 1994) e capacidade de cruzamento com *A. hypogaea* (Raman, 1958; Pattee *et al.*, 1998) e por isso é apontado como o antepassado selvagem imediato de *A. hypogaea* (Seijo *et al.*, 2004, 2007). Uma vez que *A. monticola* apresentou umas das menores concentrações, os resultados sugerem que o nível de ploidia não teve impacto no aumento da concentração de resveratrol no amendoim, e pela variação observada entre os tetraploides (*A. monticola* e cultivares de *A. hypogaea*), a seleção para maiores níveis de resveratrol pode ter acontecido após a origem de *A. hypogaea*, quando houve seleção para maiores níveis de resistência a estresses bióticos, o que certamente teve impacto nos níveis de resveratrol, pois esse composto é uma fitoalexina.

No presente estudo, foi analisado apenas um acesso de *A. monticola*, o que não permite inferência sobre o comportamento geral da espécie. Apesar disso, o menor teor de resveratrol coincide com a baixa resistência de *A. monticola* à mancha preta e

ferrugem (Pande & Rao, 2001). *Arachis monticola* também foi a espécie mais suscetível a ácaros no estudo de Johnson *et al.* (1977). Em relação à *Meloidogyne javanica*, todos os cinco acessos de *A. monticola* estudados foram altamente suscetíveis, de modo que o número de galhas e ovos sobre as plantas foram maiores do que nas cultivares de amendoim (Sharma *et al.*, 1999).

Foi observada diferença significativa entre as duas cultivares de *A. hypogaea* analisadas (cultivar IAC Caiapó: 273,17 µg/g de resveratrol; Runner IAC 886: 430,69 µg/g). Zorzete *et al.* (2011) compararam a presença de resveratrol após infecção por fungos em IAC Caiapó e Runner e em diferentes idades das plantas e encontraram disparidades entre as concentrações em cada cultivar, sendo que Runner IAC 886 teve níveis médios de resveratrol, chegando a 90 µg/g, enquanto em IAC Caiapó a média dos níveis atingiu 34,4 µg/g, concentrações bem menores que as observadas em nosso estudo. Uma explicação pode ser o fato de que a metodologia mais eficiente para indução da produção de resveratrol em amendoim é por UV, como demonstrado por Chung *et al.* (2003), inclusive quando comparada com a infecção por fungos. IAC Caiapó já havia sido analisada também por Lopes *et al.* (2013) e o valor observado foi de 668,7 µg/g, um valor acima do que obtivemos. As variações nas concentrações de resveratrol para mesma cultivar podem ser justificadas por diferenças nas idades da planta e época em que o experimento foi realizado, pois por ser um metabolito secundário, muitos são os fatores que podem influenciar sua síntese (Liu *et al.*, 1998; Kliebenstein *et al.*, 2005; Achakzai *et al.*, 2009) provocando a variação observada.

Os dois diferentes acessos avaliados de *A. hoehnei* apresentaram comportamento similar quanto à produção de resveratrol e não houve diferença significativa (*A. hoehnei* V9094, 68,1 µg/g e *A. hoehnei* V9140 com 108,51µg/g) (tabela 3). A distribuição geográfica dos dois acessos de *A. hoehnei* analisados são similares, localizadas em Corumbá no estado do Mato Grosso do Sul (Krapovickas & Gregory, 1994), o que pode ser indicativo de proximidade genética refletida em uma resposta semelhante quanto à produção da fitoalexina. Sharma *et al.* (1999) ao avaliarem resistência de várias espécies de *Arachis* em relação a *Meloidogyne javanica* observaram que *A. hoehnei* ICG 8190 estava entre os acessos mais suscetíveis, apresentando danos em 50% da região das raízes.

Arachis magna teve quatro acessos avaliados quanto à concentração de resveratrol, cujos teores variaram de 176,71 a 305,08 µg/g (acessos V13765 e V14750,

respectivamente). Quando analisadas somente espécies da seção *Arachis* os quatro acessos estudados encontram-se em mesmo grupo de significância (tabela 3). Lopes *et al.* (2013) avaliaram a concentração de resveratrol em folhas de *A. magna* KG30097, sob o mesmo tratamento do presente trabalho, e encontraram concentração de 489,2 µg/g. Tendo em vista a variação observada entre os quatro acessos de *A. magna*, o valor de resveratrol maior observado por Lopes *et al.* (2013) pode ser devido ao fato de alta variabilidade intraespecífica e o acesso KG 30097 ter maior potencial de produção de resveratrol.

Além das espécies de genoma A e B, foram analisadas nesse estudos espécies de genomas K e D. *Arachis krapovickasii*, portadora do genoma K (Robledo & Seijo, 2010), apresentou 429,94µg/g de resveratrol, que o colocou no segundo maior grupo de significância da produção do metabólito. No trabalho de Ramos (2007), esse mesmo acesso se destacou como resistente à lagarta do cartucho. Lopes *et al.* (2013) analisaram *Arachis cruziana* WI 1302-3 e *A. batizocoi* K9484, espécies também do genoma K apresentando 564,67 µg/g e 524,54µg/g de resveratrol, respectivamente. As variações de concentração de resveratrol entre espécies de mesmo genótipo mostra a necessidade de investigação de um maior número de espécies para o potencial de produção de resveratrol.

Arachis palustris apresentou a maior concentração de resveratrol (614,8711µg/g) e está no mesmo grupo de significância de *A. praecox* (567,25 µg/g), também do genoma G (Silvestri *et al.*, 2014), e *A. glandulifera* (525,18 µg/g) (genoma D, Stalker, 1991) (Figura 3). Isso demonstra que espécies com genótipos diferentes aos presentes em *A. hypogaea*, também apresentam potencial elevado de produção de resveratrol.

As espécies de genoma K e D, apesar de mais distantes de *A. hypogaea*, podem também ser utilizadas como fontes de alelos, e isso provavelmente deve ocorrer via genoma B, pois análises moleculares indicam afinidades entre os genomas D, B e G (Tallury *et al.* 2005; Bechara *et al.* 2010).

Seções *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Triseminatae* e *Procumbentes*

Arachis pintoii (*Caulorrhizae*) apresentou 302,05 µg/g de resveratrol, sendo classificada no quarto grupo de significância (grupo D) (Figura 3) Essa espécie já é amplamente cultivada como forrageira em canteiros ornamentais, para contenção de solos e como pasto (Lascano & Thomas, 1988; Kartika *et al.*, 2016). Identificar resveratrol em *A. pintoii* e encontrar acessos com potencial de maior produção da

fitoalexina em estudo abre espaço para valorizar ainda mais essa espécie, pois sendo já cultivado em larga escala poderia ser uma fonte abundante de matéria prima para extração de resveratrol. Existem muitos acessos disponíveis de *A. pintoii* além da outra espécie da seção, *A. repens* (Krapovickas & Gregory, 1994) e a caracterização molecular dos mesmos tem demonstrado grande variabilidade genética medida por diferentes marcadores moleculares (Gimenes *et al.*, 2000; Palmieri *et al.*, 2005). Portanto, possivelmente acessos com maiores teores podem ser encontrados.

Arachis villosulicarpa demonstrou que também tem potencial para a produção de resveratrol. Apesar dos níveis baixos do metabólito (241,53µg/g), encontra-se no mesmo grupo de significância que a cultivar IAC Caiapó (grupo D) (Figura 3). *Arachis villosulicarpa* pertence à seção *Extranervosae* (Krapovickas & Gregory, 1994) e tem como lugar de cultivo exclusivo algumas comunidades indígenas do noroeste do Mato Grosso e em duas aldeias do Parque Indígena do Xingu, no nordeste do mesmo estado (Freitas *et al.* 2003). A seção *Extranervosae* é distante da seção *Arachis* baseando-se em evidências fisiológicas (Huang *et al.*, 2012) e moleculares (Koppolu *et al.*, 2010). Essa distância é refletida na cruzabilidade entre espécies da seção *Arachis* e seção *Extranervosae* que resultaram em híbridos de frutos maduros que contém somente resquícios de sementes (Gregory & Gregory, 1979), o que limita o uso dessa espécie no pré-melhoramento de *A. hypogaea*.

Em *A. triseminata* foi encontrada a segunda maior concentração de resveratrol (745,41µg/g), estando no grupo A de significância. Esse fato agrega valor à espécie que já apresenta potencial forrageiro reconhecido no exterior, mas ainda negligenciado no Brasil (Valls & Santana, 2011). *Arachis triseminata* é a única espécie da seção *Triseminatae*, cuja distribuição se restringe ao estado da Bahia, sul do estado de Pernambuco e ao norte do estado de Minas Gerais (Krapovickas & Gregory, 1994). Evidências morfológicas (Krapovickas & Gregory, 1994) e moleculares (Friend *et al.*, 2010) também demonstraram que essa seção é distante da seção *Arachis*, por isso sua baixa participação em programas de pré-melhoramento.

O acesso V13570 de *A. lignosa* (*Procumbentes*) foi o que mais produziu resveratrol nas condições avaliadas (843,86 µg/g de folha). Esse valor é o maior mesmo quando comparamos outros trabalhos que analisaram o potencial de produção de resveratrol mediante estímulo por UV em cultivares de amendoim (Tabela 4) (Chukwumah *et al.*, 2007), espécies silvestres de *Arachis* (Lopes, *et al.*, 2013) e em uva

(Douillet-Breuil *et al.*, 1999). Esse resultado que agrega valor a essa espécie que não é cultivada em larga escala, valorizando o estudo e cultivo desse recurso genético.

Tabela 4: Comparação entre concentrações de resveratrol. Fontes: Douillet-Breuil *et al.*, 1999; Chukwumah *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2013; Carvalho 2017.

Referência	Espécie	Tecido/ indução	Concentração de resveratrol (µg/g)
Douillet-Breuil <i>et al.</i> , 1999	<i>V. rupestris</i>	Folha, UV	750µg/g
Chukwumah <i>et al.</i> , 2007	<i>A. hypogaea</i>	semente, sem indução	784µg/g
Lopes <i>et al.</i> , 2013	<i>Arachis kuhlmannii</i> V 9214	Folha, UV	808,75µg/g
Carvalho, 2017	<i>A. lignosa</i>	Folha, UV	843,87µg/g

3.6. CONCLUSÃO

Os resultados discutidos permitem as seguintes conclusões:

- Espécies de diferentes seções do gênero *Arachis* são capazes de produzir resveratrol, em diferentes concentrações;
- Existe variação de concentrações de resveratrol entre acessos de uma mesma espécie do gênero *Arachis*;
- Existe variação de concentração de resveratrol entre cultivares de amendoim;
- A espécie com maior concentração de resveratrol do gênero *Arachis*, até o momento identificada, é uma silvestre da seção *Procumbentes*, *Arachis lignosa*.
- A espécie com maior concentração de resveratrol da Seção *Arachis* foi *A. palustris*.

CAPÍTULO 2:
Estudo do teor de resveratrol de híbridos interespecíficos de *Arachis* e seus parentais.

RESUMO

O amendoim cultivado (*A. hypogaea*) é um tetraploide que se originou de um evento de hibridização entre dois diploides silvestres. Com base nisso, os programas de pré-melhoramento de amendoim têm utilizado alotetraploides sintéticos, resultantes do cruzamento entre espécies silvestres diploides da seção *Arachis*, que quando cruzados com o amendoim resultam em híbridos férteis, permitindo a utilização da ampla variabilidade genética contida nas espécies silvestres. A caracterização desses anfidiplóides é fundamental para o uso no melhoramento do amendoim e por isso eles têm sido caracterizados morfológica, citológica, molecular, fitopatologicamente e quimicamente. O objetivo foi caracterizar a concentração de resveratrol, um potente antioxidante e fitoalexina, em tetraploides sintéticos e seus parentais. Foram analisados cinco alotetraploides, seis espécies diploides, três cultivares de *A. hypogaea* e três híbridos resultantes dos cruzamentos de dois alotetraploides com três cultivares de *A. hypogaea*. Folhas obtidas de plantas cultivadas por seis meses em casa de vegetação foram destacadas e submetidas à indução de resveratrol com luz UV. O experimento foi conduzido em três repetições biológicas e três repetições analíticas. Resveratrol foi encontrado em todos os genótipos analisados tratados com UV, porém em concentrações variáveis (39,28µg/g a 742,95µg/g). A concentração de resveratrol nos diploides silvestres variou de 39,3 a 438,85 µg/g e nos alotetraploides sintéticos de 88,8 a 557,8µg/g. As maiores concentrações foram observadas nos híbridos provenientes dos cruzamentos entre alotetraploides com cultivares de *A. hypogaea*, sendo encontradas concentrações de 412,5 µg a 742,95µg de resveratrol por grama de folha, que em função da presença de alelos de diferentes espécies, deve ter uma maior diversidade gênica. Portanto, os dados sugerem haver uma relação entre maior nível de ploidia e maior nível de resveratrol e também um efeito positivo em função da combinação de alelos de diferentes espécies.

Palavras chave: Amendoim, fitoalexina, resveratrol.

INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é um tetraploide originado por hibridização das espécies silvestres diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Kochert *et al.*, 1996; Fávero *et al.*, 2009), as quais fazem parte da seção *Arachis*, uma das nove seções do gênero *Arachis* (Krapovickas & Gregory 1994, Valls *et al.*, 2013).

Com exceção de *A. monticola*, que também é um tetraploide (Fernández & Krapovickas, 1994), as demais espécies da seção *Arachis* são diploides (Smartt *et al.*, 1978; Peñaloza & Valls 2005). Essas espécies silvestres fazem parte do *pool* gênico secundário de *A. hypogaea* (Stalker & Moss, 1987) e por isso têm sido caracterizadas e avaliadas para várias características de interesse agrônomo, como resistência a estresses bióticos (Stalker, 1984; Varman *et al.*, 2000; Pande & Rao, 2001) e estresses abióticos (Nautiyal *et al.*, 2008). A identificação de acessos com características de interesse é importante na seleção de genótipos para serem usados em programas de melhoramento.

A utilização de espécies silvestres em programas de melhoramento de amendoim, em função da diferença de ploidia, depende da obtenção de poliploides sintéticos. Esses tetraploides, quando cruzados com *A. hypogaea*, resultam em híbridos férteis, permitindo assim a introgressão de alelos das espécies silvestres no genoma de *A. hypogaea* via recombinação. A obtenção desses híbridos é realizada principalmente cruzando-se uma espécie de genoma A com uma de genoma B, que resulta em um híbrido estéril, que quando tetraploidizado com o uso de colchicina torna-se um anfidiplóide fértil (Simpson, 1991; 2001).

O amendoim e suas espécies relacionadas estão entre as poucas espécies que produzem resveratrol (Lanz *et al.*, 1990; Sobolev & Cole, 1999; Arora *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2015, Carvalho, 2013; Lopes *et al.*, 2013). O resveratrol é um potente antioxidante (Frankel *et al.*, 1993) que pode contribuir no controle de doenças cardiovasculares (Meng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016), na recuperação de lesões hepáticas (Li *et al.*, 2014) e em alguns tipos de câncer (Fraser *et al.*, 2014; Mikami *et al.*, 2016; Caddeo *et al.*, 2016; Niedzwiecki *et al.*, 2016). Além disso, é uma fitoalexina associada à resistência a vírus em *A. hypogaea* (Sobolev *et al.*, 2007) e tem presença confirmada em algumas espécies silvestres de *Arachis* (Lopes *et al.*, 2013; Carvalho 2013). Somando o benefício nutracêutico com o de resistência,

espécies silvestres de *Arachis* com elevada concentração de resveratrol poderiam ser utilizadas em programas de melhoramento.

Anfidiploides de *Arachis* têm sido caracterizados morfológicamente (Paula, 2015; Leal-Bertioli *et al.*, 2012, 2017), molecularmente (Garcia *et al.*, 1995; Burow *et al.*, 2001), fitopatologicamente (Fávero *et al.*, 2015; Michelotto *et al.*, 2016, 2017) e quimicamente (Isleib *et al.*, 2004). Seria interessante que o estudo do conteúdo químico de híbridos buscasse também avaliar concentrações de metabólitos importantes como o resveratrol. A avaliação do teor de resveratrol anfidiploides e seus genitores permitiria a identificação daqueles com maior potencial para uso em programas de pré-melhoramento.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as concentrações de resveratrol em cinco alotetraploides sintéticos, seus parentais silvestres diploides, três cultivares de *A. hypogaea* e os híbridos resultantes dos cruzamentos de dois h alotetraploides com *A. hypogaea*.

4.3. OBJETIVO GERAL

Avaliar as concentrações de resveratrol em anfidiplóides sintéticos, em espécies silvestres de *Arachis* utilizadas como parentais, cultivares de *A. hypogaea* e em híbridos resultantes dos cruzamentos entre dois alotetraplóides com cultivares de *A. hypogaea*.

Objetivos específicos

- Avaliar a produção de resveratrol em seis espécies silvestres do gênero *Arachis*, seção *Arachis*;
- Avaliar a produção de resveratrol em cinco anfidiplóides sintéticos;
- Avaliar a concentração de resveratrol em três cultivares de *A. hypogaea*;
- Avaliar a concentração de resveratrol em três híbridos resultantes dos cruzamentos entre anfidiplóides sintéticos e *A. hypogaea*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 MATERIAL

Ao total, 17 genótipos foram analisados (tabela 5).

Tabela 5: Genótipos avaliados em relação à concentração de resveratrol em folhas induzidas por UV.

Espécie / híbridos	Acesso	Nível de ploidia e Fórmula gênica
<i>A. stenosperma</i>	V10309	Diploide, AA
<i>A. villosa</i>	V12812	Diploide, AA
<i>A. ipaënsis</i>	K30076	Diploide, BB
<i>A. batizocoi</i>	K9484	Diploide, KK
<i>A. gregoryi</i>	V6389	Diploide, BB
<i>A. duranensis</i>	V14167	Diploide, AA
(<i>A. ipaënsis</i> X <i>A. villosa</i>) ^{4X}	K30076 X V12812	Tetraploide, AABB
(<i>A. gregoryi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}	V6389 X V10309	Tetraploide, AABB
(<i>A. batizocoi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}	K9484 X V10309	Tetraploide, AAKK
(<i>A. batizocoi</i> X <i>A. duranensis</i>) ^{4X}	K9484 X SeSn2848	Tetraploide, AAKK
(<i>A. batizocoi</i> X <i>A. duranensis</i>) ^{4X}	K9484 X V14167	Tetraploide, AAKK
<i>A. hypogaea</i>	cv. IAC 505	Tetraploide, AABB
<i>A. hypogaea</i>	Runner IAC 886	Tetraploide, AABB
<i>A. hypogaea</i>	IAC Caiapó	Tetraploide, AABB
Runner 886 X [Runner 886 X (<i>A. batizocoi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] [*]		Tetraploide, AABK
Runner 886 X [Runner 886 X (<i>A. batizocoi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] [*]		Tetraploide, AABB
IAC 505 X [(<i>A. gregoryi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] ^{**}		
IAC 505 X [(<i>A. gregoryi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] ^{**}		Tetraploide, AABB
IAC Caiapó X [IAC Caiapó X (<i>A. batizocoi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] [*]		Tetraploide, AABK

* Retrocruzamentos (RC₁). ** 1º- geração (F₁).

Em relação ao nível de plidia, seis são espécies silvestres diploides, cinco tetraploides sintéticos, três cultivares de *A. hypogaea*, e três híbridos resultantes dos

cruzamentos entre *A. hypogaea* e anfidiplóides sintéticos. As espécies analisadas são possuidoras de genoma A (*A. villosa*, *A. stenosperma*, *A. duranensis*), de genoma B (*A. ipaënsis* e *A. gregoryi*) e de genoma K (*A. batizocoi*). As cultivares de *A. hypogaea* analisadas: IAC Caiapó, Runner IAC 886 e IAC 505. Todos os híbridos analisados foram desenvolvidos por Santos (2013).

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. As plantas foram cultivadas durante o período de março a setembro de 2013.

4.4.2 MÉTODOS

4.4.2.1 Indução da síntese de resveratrol por UV

Os experimentos foram realizados utilizando-se tecido foliar. Os tempos de indução, de coleta pós-indução e o tratamento utilizado foram selecionados baseando-se em dados da literatura (Chung *et al.*, 2003; Zorzete *et al.*, 2011).

As folhas de cada um dos genótipos analisados foram coletadas em casa de vegetação durante o mês de setembro de 2013. As coletas seguidas de indução e análise foram realizadas com intervalo de sete dias, consistindo nas repetições biológicas do experimento (triplicatas biológicas). Depois de coletadas, as folhas foram armazenadas em sacos plásticos e, no laboratório, foram dispostas em bandejas revestidas com uma camada de algodão umedecida com 500 ml de água, sob a qual foi colocada uma camada de folhas de papel germitest. Parte das bandejas foram colocadas a 50 cm abaixo da luz ultravioleta (UV-C) (Fluxo Laminar: Trox Modelo FLV série: 235-81, com Lâmpada Philips TUV 30W/ 630 TB *LONGLIFE*) luz por duas horas e trinta minutos, enquanto as demais (grupo controle) ficaram em uma sala ao lado, livre da radiação. Após o período indicado, todas as bandejas foram reunidas em uma mesma sala onde permaneceram por 15 horas a temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida as folhas de cada espécie foram divididas em alíquotas de 1g em três tubos de 50 mL e protegidas da luz com papel alumínio. Cada tubo foi analisado representando as triplicatas técnicas do experimento.

A cada experimento, todas as folhas de todos os genótipos foram induzidas simultaneamente. 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 conseqüentemente nos resultados.

4.4.2.2 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 (1 g de folha) foram maceradas com auxílio de bastão de vidro e nitrogênio líquido em tubos de 50 mL, nos quais tinham sido armazenadas. Após a maceração foram adicionados 0,840 mL de fenoltaleína (>98%, 2927-2835 µg/mL, Sigma-Aldrich) como padrão interno e 10 mL de álcool etílico 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 um novo tubo. Ao tubo contendo restos sólidos de folhas foram adicionados 5 mL de álcool 80%, misturado com auxílio de vórtex por 2 minutos e então, centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e a ele foram adicionados 5 mL de Álcool Etílico 80%, sendo repetido o procedimento anterior.

A limpeza da amostra foi realizada adicionando-se 20 mL de hexano (Merck) a cada frasco, que foram agitados manualmente de modo que as duas fases se misturassem de forma eficiente. Em seguida cada 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 duas vezes utilizando-se 10 mL de hexano. Em seguida o hexano 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 em CLAE (HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*).

4.4.2.3 Preparo das amostras para injeção por HPLC

Antes da injeção por HPLC, o resíduo seco foi reconstituído com 6,8 mL de Álcool Etílico 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 (CLAE, 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).

4.4.2.4 Análise por HPLC

A coluna utilizada foi a C18 Zorbax XDB Agilent (250 x 4,6 mm, 5µm), sem coluna de guarda e como fase móvel foi empregada acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico 0,02% (J.T.Baker). As condições de análise foram: acetonitrila durante 10 minutos a 13 %; 6 a 9 minutos a 15 %; 17 minutos a 17 %; 28 à 33 minutos a 28 %; 40 minutos a 50 %; 45 minutos a 60%; 46 à 48 minutos a 80 %; 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 de cada 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).

4.4.2.5 Análise dos resultados de conteúdo de resveratrol

Foi utilizado um modelo linear misto para comparar a produção de resveratrol entre as amostras. As médias foram comparadas por meio de Análise de Variância, atribuindo-se 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%.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os genótipos avaliados foram capazes de produzir resveratrol mediante estímulo com UV (tabela 6). Já nas amostras controle não foi encontrada nenhuma concentração de resveratrol.

Tabela 6: Concentração de resveratrol em µg/g de folha de anfidiplóides sintéticos, em espécies silvestres de *Arachis* utilizadas como parentais, cultivares de *A. hypogaea* e híbridos resultantes dos cruzamentos entre alotetraplóides.

Espécie / híbridos	Acesso	Resv. [µg/g]	Desv. Pad.
<i>A. stenosperma</i>	V10309	39,28	6,49
<i>A. villosa</i>	V12812	65,41	25,3
<i>A. ipaënsis</i>	K30076	93,1	40,46
<i>A. batizocoi</i>	K9484	198,28	143,34
<i>A. gregoryi</i>	V6389	392,81	24,37
<i>A. duranensis</i>	V14167	438,84	95,26
(<i>A. ipaënsis</i> X <i>A. villosa</i>) ^{4X}	K30076 X V12812	88,86	33,25
(<i>A. gregoryi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}	V6389 X V10309	261,62	50,79
(<i>A. batizocoi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}	K9484 X V10309	290,04	71,39
(<i>A. batizocoi</i> X <i>A. duranensis</i>) ^{4X}	K9484 X SV2848	513,28	108,67
(<i>A. batizocoi</i> X <i>A. duranensis</i>) ^{4X}	K9484 X SeSn14167	626,98	125,25
<i>A. hypogaea</i>	cv. IAC 505	246,55	65
<i>A. hypogaea</i>	cv. Runner IAC 886	275,22	67,67
<i>A. hypogaea</i>	cv. IAC Caiapó	558,49	61,07
Runner 886 X [Runner 886 X (<i>A. batizocoi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] [*]		351,72	125,6
IAC 505 X [(<i>A. gregoryi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] ^{**}		526,83	78,29
IAC Caiapó X [IAC Caiapó X (<i>A. batizocoi</i> X <i>A. stenosperma</i>) ^{4X}] [*]		742,95	89,7

* RC1 ** F1

O teor de resveratrol encontrado nas seis espécies silvestres diploides analisadas variou de 39,29 µg/g no acesso V10309 de *A. stenosperma* a 438,85 µg/g no acesso V14167 de *A. duranensis* (tabela 6).

Foram observadas variações no teor de resveratrol de quatro genótipos que também foram avaliados por Lopes *et al.* (2013) em folhas de espécies após tratamento com UV. No estudo de 2013, *A. gregoryi* V6389 e a cultivar IAC Caiapó apresentaram concentrações de resveratrol de 370,01 µg/g e 668,7 µg/g, respectivamente, resultados muito similares aos encontrados no presente estudo (*A. gregoryi* V6389: 392,81 µg/g; cultivar IAC Caiapó: 558,49 µg/g). O mesmo estudo também avaliou *A. batizocoi* K9484 e *A. ipaënsis* K30076, que apresentaram concentrações maiores (524,5 e 314,0 µg/g, respectivamente) do que os encontrados aqui (198,28 µg/g e 93,1 µg/g, respectivamente). Essa variação ampla entre os dois experimentos pode ser explicada pelo fato do resveratrol ser uma fitoalexina que responde a vários estímulos, como, por exemplo, no caso diferenças na época do ano no qual as plantas foram cultivadas e a idade das plantas utilizadas para coleta de folhas.

Arachis stenosperma V10309 e *A. duranensis* V14167 em estudo anterior apresentaram concentrações de resveratrol de 512,56 e 371,97 µg/g respectivamente (Carvalho, 2013). Comparando-se com o presente estudo, é possível observar similaridade em relação a *A. duranensis*, porém grande diferença em relação a *A. stenosperma* (aqui *A. duranensis* V14167 com 438,84 µg/g e *A. stenosperma* V10309 com 39 µg/g).

As diferenças de concentrações de resveratrol em relação a outros estudos podem ser justificadas pelo fato de se tratar de um metabólito secundário, que por sua vez tem alterações na produção devido a variações de temperatura ambiente (Wang & Zheng, 2001), da idade da planta (Jeandet *et al.*, 1991; Chung *et al.*, 2001), da disponibilidade de água no solo (Esteban *et al.*, 2001), da estação do cultivo da planta (Chen *et al.*, 2002), entre outros. Em nosso experimento, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação na tentativa de controlar fatores como ataque de pragas.

A variação no teor de resveratrol entre os alotetraploides sintéticos foi de 88,86 µg/g para *A. ipaënsis* K30076 x *A. villosa* V12812 a 626,98 µg/g para *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167. O híbrido *A. ipaënsis* x *A. villosa*, com 88,86 µg/g, teve parentais que apresentaram a segunda e terceira menores concentrações de resveratrol (65,41 µg/g e 93,1 µg/g em *A. villosa* V12812 e *A. ipaënsis* K30076 respectivamente), correspondendo com o anfidiplóide sintético que eles são parentais. Já o anfidiplóide que apresentou maior concentração teve como parental *A. batizocoi* K9484 (198,28 µg/g) e *A. duranensis* V14167 (438,84 µg/g), que apresentou a maior

concentração entre os acessos de espécies diploides analisadas (tabela 6). Tendo em vista que todos os alotetraploides foram obtidos a partir do cruzamento de duas espécies, observamos que os híbridos mais produtivos resultaram dos cruzamentos entre parentais com maiores teores de resveratrol. Assim, podemos inferir que as composições alélicas podem estar relacionadas com o potencial de produção de resveratrol.

Os resultados demonstram que a poliploidia teve um efeito positivo no teor de resveratrol, pois as espécies diploides apresentam em média menos resveratrol (Tabela 6). Quando as médias de resveratrol são avaliadas levando-se em conta a ploidia (Tabela 6), poliploides apresentam concentrações significativamente maiores do que diploides. O efeito da poliploidização tem sido estudado em *Arachis* comparando-se diploides e anfidiplóides sintéticos. Por exemplo, a morfologia foliar se apresentou semelhante quando comparados anfidiplóides sintéticos e parentais de *Arachis* no estudo de Kumari *et al.* (2014), no qual também foi observado um aumento de resistência a doenças foliares nos anfidiplóides sintéticos em relação aos parentais. Mallikarjuna *et al.* (2012) estudando mancha preta em amendoim cultivado, em espécies silvestres de *Arachis* e em híbridos provenientes dos cruzamentos entre os diploides, observaram que híbridos se destacavam quanto à resistência em relação aos demais genótipos, inclusive em relação aos diploides silvestres. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Leal-Bertioli *et al.* (2017), onde espécies silvestres, anfidiplóides sintéticos e híbridos provenientes do cruzamento com *A. hypogaea* demonstraram maior resistência à doenças fúngicas em relação à cultivares de *A. hypogaea*. Portanto, como nos estudos prévios citados, os resultados indicam a poliploidização pode ter interferido no aumento do potencial de produção de resveratrol.

Tabela 7: Produção de resveratrol nos diferentes tipos de genótipos avaliados por nível de significância entre os grupos. A análise foi feita com Teste de Scott-Knott a 5%.

Genótipos	Resveratrol (µg/g)	SK (%)
Híbridos Anfidiplóides x <i>A. hypogaea</i>	540,50	a
Anfidiplóides sintéticos	356,16	b
Cultivares de <i>A. hypogaea</i>	355,82	b
Diploides silvestres	192,80	c

Das três cultivares de *A. hypogaea* avaliadas, IAC Caiapó foi a que apresentou a maior concentração, com 558,48µg/g, seguida pela cultivar Runner 886b com 275,22 µg/g e a cultivar 505 com 246,55 µg/g. Sanders *et al.* (2000) encontraram diferenças significativas de resveratrol em quatro cultivares de *A. hypogaea* ao analisarem sementes sem nenhum tipo de tratamento. Variações significativas de resveratrol, medido por HPLC, em sementes de 20 cultivares de amendoim também foram observadas por Wang & Pittman (2009). Variações de concentração de resveratrol também foram encontradas em raízes de cultivares de amendoim (Chen *et al.*, 2002). Além disso, Caiapó, a cultivar com maior concentração de resveratrol, se destacou na produção do metabólito em estudo anterior quando comparado com a cultivar Runner IAC 886 (Zorzete *et al.*, 2011) e se destacou como menos suscetível à infecção por *Enneothrips* (Moraes *et al.*, 2005). Tendo em vista que o resveratrol é uma fitoalexina, cultivares com maiores concentrações desse metabólito podem apresentar melhores respostas contra estresses e, conseqüentemente, mais resistentes.

Apesar de no presente estudo os tetraploides sintéticos não apresentarem diferenças significativas de resveratrol em relação ao natural *A. hypogaea* (tabela 7), um estudo que comparou a resistência à mancha preta (causada por *Phaeoisariopsis personata*) apontou que alopoliploides sintéticos desenvolvidos a partir do cruzamento entre espécies silvestres de *Arachis*, podem se mostrar mais resistentes do que *A. hypogaea* (Mallikarjuna *et al.*, 2012). O mesmo também foi observado em relação à resistência a mancha preta, mancha castanha, tripes e ferrugem, que foi maior em alopoliploides sintéticos do que em cultivares de *A. hypogaea* (Michelotto *et al.*, 2015, 2016, 2017).

Os híbridos resultantes dos cruzamentos entre *A. hypogaea* e alotetraploides apresentaram diferenças significativas em relação às demais amostras analisadas, possuindo as maiores médias de resveratrol (tabela 7). O híbrido Runner IAC 886 X [Runner IAC 886 X (*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309)^{4X}] foi o que apresentou menor concentração (245,55µg/g) e o híbrido IAC Caiapó X [IAC Caiapó X (*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309)^{4X}], o maior (558,49 µg/g), e IAC 505 X (*A. gregoryi* V6389 X *A. stenosperma* V10308)^{4X} apresentou concentração de 526,83 µg/g. Os cruzamentos com o alotetraploide *A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309 tiveram como diferença apenas as cultivares de amendoim utilizadas, ou seja, Runner 886, com concentração de resveratrol de 275,22 µg/g, e IAC Caiapó, que foi a

cultivar com maiores concentrações de resveratrol (558,49µg/g). Os dados sugerem que o genótipo de *A. hypogaea* pode influenciar no teor de resveratrol nos híbridos e que o cruzamento com híbridos de espécies silvestres podem aumentar significativamente a concentração de resveratrol no amendoim (tabela 7). O uso de cruzamentos de *A. hypogaea* com alotetraploides de *Arachis* já foram relatados inclusive para aumentar a concentração de flavonoides responsáveis pela mortalidade larval de *Spodoptera litura* (Mallikarjuna *et al.*, 2004), comprovando a eficácia do uso de espécies silvestres para o melhoramento do amendoim cultivado.

A diferença entre os dois tipos de poliploides analisados (anfidiplóides e híbridos resultantes do cruzamento entre anfidiplóides e *A. hypogaea*) sugere que a combinação entre alelos de silvestres e do cultivado tem um efeito positivo no aumento do resveratrol. Do ponto de vista prático, os dados sugerem que a mensuração do potencial uso de uma espécie diploide e de um anfidiplóide deve levar em consideração os resultados obtidos com os híbridos provenientes do cruzamento destes e não apenas os resultados obtidos a partir da avaliação individual.

4.6. CONCLUSÃO

Os resultados discutidos permitem as seguintes conclusões:

- Todos os genótipos avaliados que foram tratados por UV foram capazes de produzir resveratrol;
- A concentração de resveratrol na maioria dos anfidiplóides sintéticos é significativamente maior em relação aos parentais silvestres diploides utilizadas;
- A concentração de resveratrol nos híbridos resultantes do cruzamento entre anfidiplóides e *A. hypogaea* foi significativamente maior que nos anfidiplóides, sugerindo que a combinação entre alelos de silvestres e do cultivado tem um efeito positivo no aumento do resveratrol.
- O genótipo de *A. hypogaea* pode influenciar no teor de resveratrol dos híbridos resultantes do cruzamento entre anfidiplóides e *A. hypogaea*.

CAPÍTULO 3:
**Análise paralela de transcritos de Resveratrol sintase e resveratrol em espécies
diploides e tetraploides do gênero *Arachis*.**

RESUMO

O resveratrol é uma fitoalexina, produzida por um número restrito de plantas, que também apresenta atividade antioxidante, o que o torna com grande potencial de uso em tratamentos contra câncer e doenças cardiovasculares. A biossíntese do resveratrol é desencadeada por um sinal químico, gerado em função de algum tipo de estresse sofrido pela planta, que induz o aumento da expressão do gene Resveratrol sintase (RS), o qual promove o acúmulo de mRNA e consequentemente da enzima resveratrol sintase, que atua na síntese do resveratrol. O amendoim cultivado é uma das espécies capazes de produzir resveratrol. Além disso, espécies silvestres do gênero também se mostraram capazes de produzir resveratrol mediante estímulo por raios ultravioleta (UV). O presente trabalho tem como objetivo avaliar comportamento de transcritos de RS e a produção resveratrol em cinco diferentes genótipos, incluindo espécies silvestres de *Arachis* e uma cultivar de amendoim. Folhas foram destacadas e submetidas à luz ultravioleta (UV) por 2h e 30min. Foram realizadas coletas nos seguintes tempos após indução por UV: 0 hora (0hpi); 7 horas (7hpi); 15 horas (15hpi); e 24 horas (24hpi). A produção de resveratrol foi crescente entre os quatro tempos de coleta, tendo concentração mínima em 0hpi de 9,31µg/g em Runner 886 e máxima no tempo 24hpi com concentração de 419,08 µg/g em *A. duranensis* V14167. O comportamento crescente na produção de resveratrol só teve como exceção a cultivar Runner 886, em que houve uma pequena redução entre os tempos 15hpi e 24hpi (valores não significativos). A expressão relativa de RS foi positiva significativamente para todas as amostras e teve comportamento decrescente entre os quatro tempos de coleta avaliados, com exceção de Runner 886, que apresentou pequeno aumento entre 0 e 7hpi. A expressão mínima foi de 14,43 no tempo 24hpi para o anfidiplóide sintético (K30076 X V14167) e a máxima foi de 3.828,14 no tempo de 0hpi para *A. stenosperma*. Os dados sugerem que a expressão do gene é imediata e atinge seu máximo logo após o estímulo. Em consequente, a resposta metabólica é mais espaçada em relação ao término do estímulo, atingindo seu pico em 24hpi. O conhecimento melhorado da produção de resveratrol deve facilitar a utilização desses recursos genéticos para o uso em programas de melhoramento para o desenvolvimento de uma variedade com alto valor nutricional e resistência a doenças.

Palavras-chave: Resveratrol, Resveratrol sintase, Expressão gênica relativa, *Arachis*.

INTRODUÇÃO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) e espécies silvestres de *Arachis* são capazes de produzir resveratrol (Chung *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2011, Carvalho, 2013), uma fitoalexina produzida mediante estresse biótico e abiótico (Chung *et al.*, 2003; Sobolev *et al.*, 2007; Zorzete *et al.*, 2011), que apresenta atividade antioxidante (Frémont, 2000). Estudos demonstram potencial uso do resveratrol em tratamentos contra doenças cardíacas (Meng *et al.*, 2014; Huang, *et al.*, 2017) e câncer (Kim, *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016).

A fitoalexina resveratrol é sintetizada em uma via biossintética cujo ultimo passo é catalisado pela enzima resveratrol sintase (Lanz *et al.*, 1990). Essa enzima foi primeiramente extraída e purificada a partir de culturas de suspensão celular estressadas de amendoim (Schöppner & Kindl, 1984), sendo observada posteriormente em vários outros tecidos (Chung *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2010).

A expressão de RS foi estudada em *A. hypogaea* por meio da análise de vários tecidos (Ingham *et al.*, 1976; Dorner *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003) e diferentes induções (Chung *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2010), que demonstraram que as concentrações de transcritos variam em função do tecido e tempo após indução. O acúmulo de resveratrol em *A. hypogaea* foi correlacionado ao aumento do mRNA de RS indicando controle transcricional desse gene (Chung *et al.*, 2003). Carvalho (2013) demonstrou que o acúmulo de transcritos de RS variou entre diferentes espécies da seção *Arachis* e que o aumento do valor de transcrito nem sempre corresponde a um aumento na produção do metabólito. Esses dados sugerem que cada espécie pode apresentar seu singular tempo ótimo de expressão do gene e produção de resveratrol.

5.3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento de transcritos de Resveratrol sintase em relação a produção resveratrol em genótipos diploides e tetraploides de *Arachis* a fim de caracterizar o comportamento do gene RS.

Objetivos específicos

- Avaliar a produção de resveratrol por meio de HPLC em *A. stenosperma*, *A. ipaënsis*, *A. duranensis*, *A. hypogaea* e um anfidiplóide sintético (K30076 X V14167), em cinco diferentes tempos de coleta após tratamento com UV;
- Avaliar a expressão do gene RS por meio de RT-qPCR em *A. stenosperma*, *A. ipaënsis*, *A. duranensis*, *A. hypogaea* e um anfidiplóide sintético (K30076 X V14167) após tratamento com UV em cinco diferentes tempos de coleta;
- Comparar os dados de HPLC e RT-qPCR e observar o comportamento do gene em relação ao resveratrol em cada espécie em cada tempo de coleta.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 MATERIAL

Foram cultivados, induzidos e analisados cinco genótipos do gênero *Arachis*: *A. hypogaea* (cultivar IAC Runner 886, genoma AABB), *A. ipaënsis* (acesso KGPScS 30076, genoma BB) *A. duranensis* (acesso VNvEv 14167, genoma AA), *A. stenosperma* (acesso V10309, 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). As sementes foram obtidas no Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil.

As plantas foram cultivadas no período de agosto a outubro de 2014 em casa de vegetação. Folhas foram coletadas, induzidas por UV e congeladas nos meses de outubro e novembro de 2014. As análises moleculares com o material congelado foram realizadas durante os anos de 2015 e 2016 na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

5.4.2. MÉTODOS

5.4.2.1 Indução da síntese de resveratrol por UV

Folhas de 15 plantas de cada um dos genótipos analisados foram coletadas em casa de vegetação durante os meses de outubro e novembro de 2014. O experimento foi repetido três vezes com intervalo de sete dias. Para amostras controle, foram coletadas de cada genótipo oito gramas de folhas, armazenadas em freezer -80 °C para posterior análise. As folhas a serem tratadas com UV, cerca de 32 g de cada amostra, foram coletadas em casa de vegetação, armazenadas em sacos e no laboratório foram dispostas em quatro bandejas revestidas com uma camada de algodão umedecida com 500 ml de água, sob a qual foi colocada uma camada de folhas de papel germitest. As bandejas foram colocadas a 50 cm abaixo da luz ultravioleta (UV-C) (Fluxo Laminar: Trox Modelo FLV série: 235-81, com Lâmpada Philips TUV 30W/ 630 TB *LONGLIFE*) por duas horas e trinta minutos. Após a indução por UV, foram realizadas coletas das folhas nos seguintes tempos: 0 hora (0hpi); 7 horas (7hpi); 15 horas (15hpi) e 24 horas (24hpi) (Figura 4). A cada coleta após a indução com UV, 6g de folhas de cada genótipo foram acondicionadas em tubos de 50 ml protegidos da luz com papel alumínio para análise da concentração de resveratrol e expressão do gene RS. Estas foram congeladas em

nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80° C até o momento das análises laboratoriais.

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.

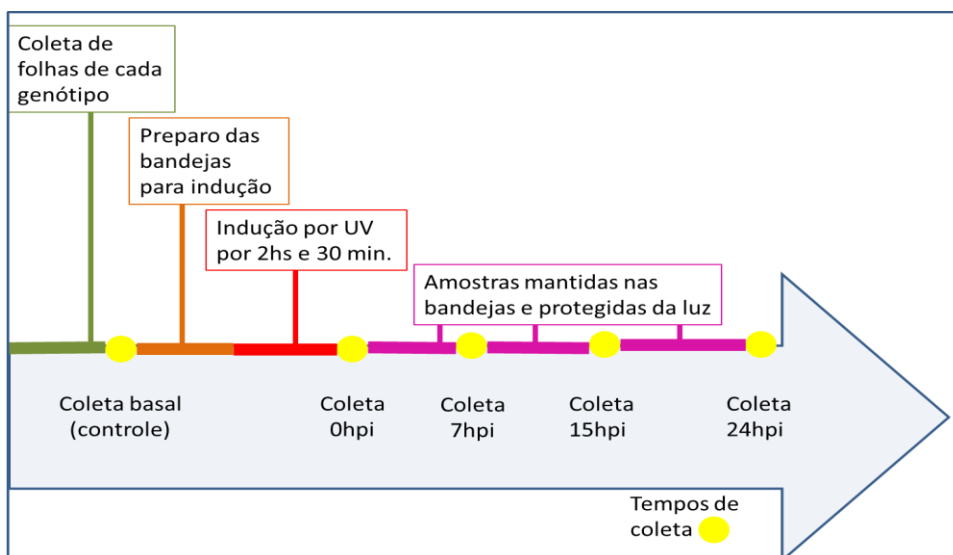


Figura 4: Esquema dos processos realizados no experimento utilizando folhas de *Arachis hypogaea* cv. Runner 886, *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, *A. stenosperma* e anfidiplóide sintético (K30076 X V14167) para avaliação da produção de resveratrol e expressão de Resveratrol sintase.

5.4.2.2 Extração de resveratrol

O protocolo para extração de resveratrol foi baseado em Potrebko & Resurreccion (2009), com as modificações de Lopes (2011). As amostras de cada tubo (1 g de folha) foram maceradas com auxílio de bastão de vidro e nitrogênio líquido e em seguida foram adicionados 0,840 mL de fenolftaleína (>98%, 2927-2835 µg/mL, Sigma-Aldrich), como padrão interno, e 10 mL de álcool Etílico 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, foram adicionados 5 mL de álcool etílico Álcool Etílico 80%, misturado com auxílio de vórtex por dois minutos e centrifugado novamente. Esse procedimento foi repetido três vezes.

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

completamente. 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 descartada cuidadosamente com auxílio de uma pipeta de Pasteur. O procedimento de limpeza do extrato foi repetido mais uma vez, utilizando-se 10 mL de hexano. Em seguida o solvente foi evaporado em chapa quente (60 °C) e jato de gás nitrogênio (1h:30 min). Os frascos (encobertos em papel alumínio) contendo o resíduo seco foram tampados e estocados por 24 h a -20°C para posterior análise por CLAE (HPLC- *High Performance Liquide Chromatography*).

5.4.2.3 Preparo das amostras para injeção por HPLC

Antes da injeção por HPLC, o resíduo seco foi reconstituído com 6,8 mL de álcool etílico Álcool Etílico 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 (CLAE, 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).

5.4.2.4 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 extrato injetado no aparelho 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 fenoltaleína (>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).

5.4.2.5 **Análise dos resultados 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%.

5.4.2.6 **Extração de RNA Total**

O protocolo de extração de RNA foi baseado em Chang *et al.* (1993). Foram extraídos RNAs totais de folhas de *Arachis* congeladas a -80°C. O material vegetal (1g) foi triturado com nitrogênio líquido e logo em seguida foram adicionados 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. 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 e o procedimento descrito logo acima foi repetido mais uma vez.

Depois da remoção dos restos celulares e precipitação das proteínas desnaturadas por centrifugação, foi 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 ressuscitado 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.

O RNA total foi purificado utilizando-se o Kit Invisorb® Spin Plant RNA Mini (Invitek). Foram adicionados 900 μ L da solução de lise DCT em cada tudo, e em seguida esses foram agitando manualmente por 1 minuto e centrifugados a 13.200 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente para obtenção de *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 μ L de etanol absoluto e seguida 750 μ L dessa solução foi transferida para um filtro RTA *spin*, o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto. Após o descarte do filtrado, o filtro RTA *spin* foi retornado ao tubo receptor RTA e a etapa acima descrita foi repetida mais uma vez. Foram então adicionados 500 μ L do tampão de lavagem R1, que foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 segundos e descartou-se o filtrado. Em seguida, adicionou-se 700 μ L do tampão de lavagem R2 ao filtro RTA *spin* que foi centrifugado 10.000 rpm por 30 segundos, descartando-se o filtrado. Esta etapa de lavagem com o tampão R2 foi repetida mais uma vez para eliminar qualquer traço de etanol. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos para eliminação de qualquer impureza. O filtro RTA *spin* foi transferido para o tubo de eluição livre de RNase, onde foram adicionados 30-60 μ L (dependendo do volume de RNA inicial usado) do tampão de eluição R. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto.

Foi realizada uma nova avaliação tanto em relação à quantidade (espectrofotômetro Nanodrop) quanto à qualidade (eletroforese em gel de agarose) do RNA extraído.

5.4.2.7 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 μ g de RNA aos quais foram adicionado 2 μ L 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. A cada tubo foi adicionado 1 µL de Anchored Oligo (dT) (50mM) (*Invitrogen*TM) e 1 µL de dNTP (10mM), e em seguida esses foram incubados a 65°C por 5 minutos e depois em 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* (Morgante *et al.*, 2011). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 13,5 µl contendo tampão 1x, MgCl₂ 1,44mM, dNTP 2,44mM, BSA 0,5mg/ml, 0,15µM de cada *primer*, 1,5U da enzima *Taq* DNA Polimerase Recombinante (*Invitrogen*TM®) e 1µl de cDNA. Esta reação foi realizada em um 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 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. Essa análise permite a identificação de eventuais contaminações com DNA gnômico nas amostras de cDNA, o que pode comprometer a análise pela técnica de RT-qPCR gerando falsos positivos.

5.4.2.8 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 2 µL do cDNA (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 valores de expressão relativa, isto é, quantas vezes o gene foi mais expresso nas amostras tratadas do que nas amostras controle, foram normalizados com os genes de referência Ribossomal sequência 60S (F:TGG AGTGAGAGTGCATTTG/

R:TCTTTTGACGACCAGGGAAC) e Gene codificante de proteína ubiquitina UBI2 (F: AAGCCGA AGAAGATCAAGCAC/ R:GGTTAGCCATGAAGGTTCCAG) baseando-se nos estudos de Morgante *et al.* (2011) e Luo *et al.* (2005), respectivamente. A presença dos genes de referência na reação serve para anular efeitos aleatórios que possam implicar em variação gênica ocorrida não pelo tratamento (Morgante *et al.*, 2011), normalizando os níveis de mRNA entre as amostras testadas.

O par de *primers* utilizado para identificação da sequência de RS utilizado foi desenvolvido pelo grupo de *Arachis* da Embrapa Cenargen, cuja eficácia foi comprovado no estudo de Carvalho (2013) e corroborado pelo programa Real Time PCR Miner 2.2 (Zhao & Fernald, 2005).

Para cada amostra foram realizadas três repetições analíticas independentes isto é, cada amostra de cDNA foi analisada três vezes pelo aparelho. 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 os tratamentos (tratado e não tratado).

5.4.2.9 Cálculo da expressão gênica relativa

Os valores de quantificação relativa obtidos por RT-qPCR são referentes à expressão relativa ao controle, ou seja, em relação ao controle o gene RS é “n” vezes mais expresso no tempo de coleta 0hpi, por exemplo. Os resultados foram dados pela razão entre a expressão do gene-alvo (alelos de RS) 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 (Bustin *et al.*, 2009).

A análise estatística para aferir a expressão relativa de RS em cada genótipo foram realizados pelo software REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Avaliação da concentração de resveratrol em diferentes tempos de coleta após indução

As concentrações de resveratrol de cada genótipo avaliado em cada tempo de coleta após indução por UV são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8: Concentrações de resveratrol em $\mu\text{g/g}$ de folhas de cinco genótipos coletadas em cinco tempos pós indução (hpi).

Genótipo	Tempo de coleta pós indução (hpi)	Resveratrol $\mu\text{g/g}$ de folha	Nível de significância
<i>A. hypogaea</i> IAC Runner 886	Controle	-	-
	0hpi	9,31	C
	7hpi	139,52	B
	15hpi	346,34	A
	24hpi ^a	325,37	A
Anfidiploide sintético 30076 X 14167	Controle	-	-
	0hpi	19,34	B
	7hpi	193,73	A
	15hpi	213,65	A
	24hpi ^a	267,68	A
<i>A. ipaënsis</i> K30076	Controle	-	-
	0hpi	21,15	D
	7hpi	179,52	C
	15hpi	255,26	B
	24hpi	341,62	A
<i>A. duranensis</i> V14167	Controle	-	-
	0hpi	20,32	C
	7hpi	182,13	B
	15hpi	396,36	A
	24hpi	419,08	A
<i>A. stenosperma</i> S10309	Controle	-	-
	0hpi	11,54	C
	7hpi	187,86	B
	15hpi	287,87	A
	24hpi	340,86	A

As amostras controle, coletadas antes da indução por UV, não apresentaram concentrações detectáveis de resveratrol com a metodologia utilizada, corroborando a necessidade de indução para que as folhas de espécies de *Arachis* produzam resveratrol, como já demonstrado por Lopes *et al.* (2013) e Carvalho (2013). Esse fato também confirma que as condições de cultivo das plantas foram ideais a ponto de não expô-las a nenhum grande estresse capaz de induzir a produção de resveratrol.

Amostras coletadas no tempo 0 hora pós indução (0hpi) apresentaram concentrações que variaram de 9,3 µg/g a 21,15 µg/g em Runner 886 e *A. ipaënsis*, respectivamente, com média de 16,33 µg/g. No tempo 7hpi a variação foi de 139,52 µg/g em Runner 886 a 193,73 µg/g no anfidiplóide sintético (K30076 X V14167), sendo o valor médio de produção entre todas as espécies de 176,55. No tempo seguinte de coleta (15hpi) as concentrações variaram de 213,65 µg/g no anfidiplóide sintético a 396,36 µg/g em *A. duranensis*, sendo a média geral de 299,9 µg/g. Em 24hpi foram observadas as maiores concentrações de resveratrol, variando de 267,68 µg/g no anfidiplóide sintético a 419,08 µg/g em *A. duranensis*, sendo a média de produção de resveratrol entre todas as espécies de 338,93 µg/g. A cultivar Runner 886, *A. duranensis* e *A. stenosperma*, quando analisadas individualmente, apresentaram diferenças significativas entre os tempos 0, 7 e 15hpi (tabela 8), mas não entre os tempos 15 e 24hpi. O anfidiplóide sintético (K30076 X V14167) apresentou diferença significativa apenas no tempo de 0hpi e as diferenças entre as concentrações obtidas nos tempos 7, 15 e 24hpi não foram significativas. *Arachis ipaënsis*, por sua vez, apresentou médias mais variáveis, sendo os valores encontrados nos tempos de coleta 0, 7, 15 e 24hpi todos com diferença significativa. Apesar da variação de valores entre as amostras em um mesmo tempo de coleta e das diferenças não significativas entre alguns tempos (tabela 8), no geral, houve uma tendência crescente na produção de resveratrol entre os tempos 0 a 24hpi para todos os genótipos analisados (Figura 5). Chang *et al.* (2006) observaram em *A. hypogaea* o aumento da produção de resveratrol nos tempos de incubação de 0 a 20hs, seguida por queda até 28hs (último tempo de coleta do estudo) em fatias de sementes submetidas a incubação aeróbica. No estudo de Rudolf & Resurreccion (2005) foram realizadas as comparações da produção de resveratrol em sementes de amendoim nos tempos de coleta 0, 24, 36 e 48hs após indução por UV e por ultrassom, sendo o tempo de 36hs o de maior concentração de resveratrol nas amostras induzidas por UV e os tempos 36 e 48hs os maiores (sem diferença

significativa) nas amostras submetidas ao ultrassom. Tang *et al.* (2010) avaliaram a produção de resveratrol em diferentes tempos de coleta após estresse em folha de amendoim e observaram que o máximo de produção ocorreu em 12hs após a indução, seguida de queda até o tempo 24hs. A comparação dos valores de resveratrol obtidos nesse estudo e em estudos prévios não é possível porque muitas variáveis podem interferir na biossíntese do metabólito. Entretanto, todos observaram um aumento na concentração após a indução e os valores máximos foram atingidos entre 12 e 36 horas após a indução. A observação do máximo de produção de resveratrol depois de 12hpi ocorreu também no presente trabalho, inclusive para as espécies silvestres as quais nunca tinham sido analisadas em quatro tempos de coleta após indução e somente havia dados de potencial de produção de resveratrol em 15hpi (Lopes *et al.*, 2013; Carvalho, 2013). Isso sugere que as espécies silvestres e o anfidiplóide têm comportamento similar ao amendoim cultivado diante do estímulo por UV e que o máximo de produção de resveratrol pode ainda ser atingido nas espécies silvestres entre 24 e 36h, assim como observado por Rudolf & Resurreccion (2005). A avaliação dos níveis de RS, que será realizada mais adiante, poderá fornecer informações que podem ajudar a responder essa pergunta.

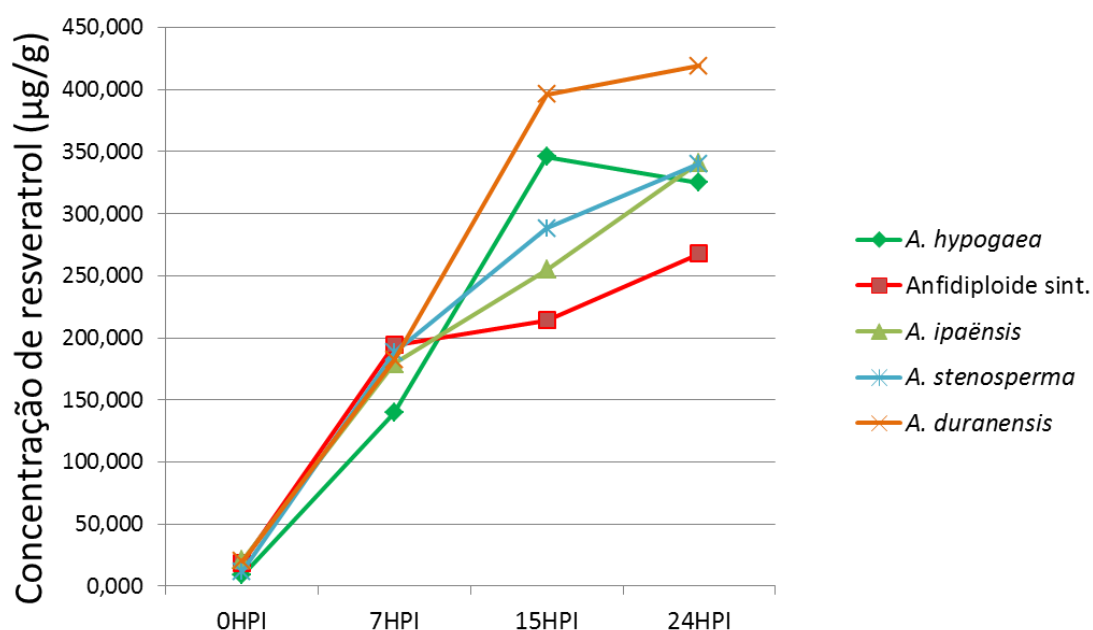


Figura 5: Análise por HPLC da concentração de resveratrol após indução por UV em folhas de espécies da seção *Arachis* nos tempos de coleta pós indução: 0, 7, 15 e 24 horas.

Tabela 9: Produção de resveratrol em µg/g em *Arachis hypogaea* cultivar Runner 886, anfidiplóide sintético (K30076 X V14167), *A. ipaënsis* K30076, *A. duranensis* V14167 e *A. stenosperma* V10309, mediante estímulo por UV. Os valores correspondem às médias de resveratrol nos tempos 0, 7, 15 e 24hpi. As letras na terceira coluna indicam diferença significativa entre os genótipos. O teste utilizado foi o de Scott-Knott.

Genótipos	Concentração de resveratrol (µg/g)	SK (5%)
<i>A. hypogaea</i> Runner 886	205,14	B
Anfidiplóide sintético K30076 X V14167	173,6	B
<i>A. ipaënsis</i> K30076	199,39	B
<i>A. duranensis</i> V14167	254,47	A
<i>A. stenosperma</i> V10309	207,04	B

O valor médio (considerando todos os tempos de coleta) de resveratrol em Runner 886 (tabela 9) foi maior do que os do anfidiplóide sintético (K30076 X V14167), porém não houve diferença significativa entre os dois em todos os tempos. Os tetraplóides tiveram concentração média de resveratrol sem diferença significativa de *A. ipaënsis* e de *A. stenosperma*, porém com médias significativamente menores em relação a *A. duranensis* (tabela 9). Em 2013, Carvalho observou a mesma relação ao avaliar Runner 886, anfidiplóide sintético (K30076 X V14167) e os parentais *A. ipaënsis* e *A. duranensis*. Esse dois tetraplóides possuem uma constituição genômica muito similar, uma vez que apresentam genomas muito similares e isso deve ser a causa de não ter sido observado diferença significativa. No capítulo 2, também não foram observadas diferenças significativas entre os tetraplóides sintéticos e o cultivares de *A. hypogaea* (tabela 7), apesar de outras espécies que não *A. duranensis* e *A. ipaënsis* juntas, terem sido utilizadas na obtenção dos híbridos. Por outro lado, o cruzamento com *A. hypogaea* aumentou significativamente a produção de resveratrol (tabela 7). Uma possível explicação é o aumento da heterozigosidade nessas amostras, pois cada um recebeu um conjunto cromossômico A e B de duas espécies diferentes, entretanto outros estudos são necessários. Do ponto visto prático, os dados sugerem que sejam levados em consideração os resultados dos retrocruzamentos com o amendoim na seleção dos tetraplóides mais promissores.

Os resultados observados para *A. duranensis* e *A. stenosperma* foram diferentes dos observados por Carvalho (2013) que analisou também essas duas espécies. *Arachis*

duranensis foi a que mais produziu resveratrol (tabela 9). No estudo de Carvalho (2013), *A. duranensis* apresentou concentrações de 371,97 µg/g de resveratrol em amostras coletadas a 15hpi, valor que não difere significativamente do encontrado no presente estudo para o mesmo tempo de coleta. *Arachis stenosperma* foi o segundo maior produtor de resveratrol (tabela 9) com média de 207,04 µg/g. No estudo de Carvalho (2013) a concentração de resveratrol de *A. stenosperma* V10309 é de 512,56 µg/g em 15hpi, bem maior do que o valor de 287,87 µg/g encontradas no presente estudo. Tendo em vista que o resveratrol é uma fitoalexina e sua produção pode ser influenciada por vários fatores como idade da planta e condições climáticas de cultivo, pode ser que a variação entre as condições de cultivo dos dois experimentos acabou influenciando na produção de resveratrol.

5.5.2 Avaliação da expressão relativa de Resveratrol sintase (RS) em diferentes tempos de coleta após indução

As expressões dos dois genes de referência (proteínas ribossomal 60S e ubiquitina UBI2) não variaram conforme o tratamento, tempo de coleta ou genótipo. Na figura 6, é possível observar as curvas uniformes obtidas com o gene proteína ribossomal 60S. Portanto, as variações observadas entre os tempos e diferentes amostras são certamente devido às variações na expressão relativa de RS.

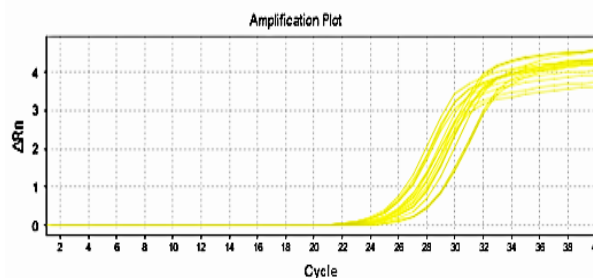


Figura 6: Curvas de amplificação obtidas pelas reações de RT-qPCR utilizando *primers* para o gene de referência da proteína ribossomal 60S, para amostras tratadas e não tratadas com UV de *A. hypogaea*, anfidiploide sintético, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e para *A. stenosperma*.

Como pode ser observado na figura 7, houve aumento significativo da expressão do gene de RS para todos os genótipos avaliados em relação à amostra controle, que não foi induzida por UV. Apesar de o anfidiploide sintético (K30076 X V14167) conter informação genética muito a similar a de Runner 886, os valores médios de expressão (considerando a média de todos os tempos de coleta) foram significativamente

diferentes. As espécies silvestres, por outro lado, não tiveram diferença significativa de expressão média de RS, apresentando comportamentos semelhantes. Uma vez que as espécies silvestres são mais resistentes a determinados tipos de estresses do que o amendoim cultivado (Pande & Rao, 2001; Subrahmanyam *et al.*, 2001; Fávero *et al.*, 2004; 2009; Nautyval *et al.*, 2008), e sendo a resveratrol uma fitoalexina, a maior expressão desse gene nas silvestres pode sim estar relacionado a maiores níveis de resistência.

A análise de RS em amendoim já tinha sido realizada anteriormente utilizando-se vários tecidos e diferentes tipos de indução (Chung *et al.*, 2001, Lanz *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 2003), onde foi observado também o aumento da expressão desse gene. Entretanto, as análises anteriores foram realizadas por *Northern Blot*, que é uma técnica pouco utilizada devido à necessidade de uma grande quantidade de RNA, por necessitar marcação radioativa e por ser pouco sensível. No presente estudo foi demonstrado a eficácia da análise de RS em várias espécies de *Arachis* com o mesmo par de *primers*, utilizando-se a técnica de RT-qPCR. Essa tecnologia é muito mais sensível e necessita de uma quantidade menor de RNA, viabilizando estudos em outras espécies de *Arachis* e em outros tecidos, como os de sementes, que para algumas espécies é difícil se obter grandes quantidades.

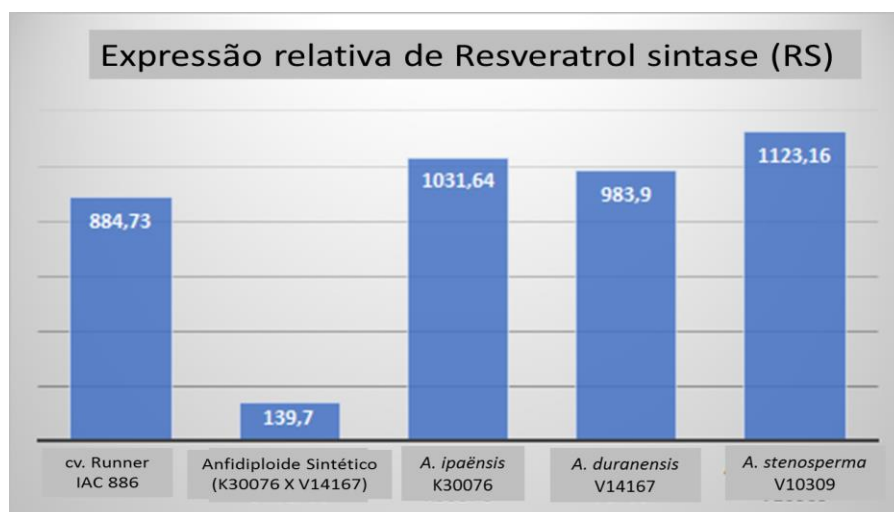


Figura 7: Expressão relativa de Resveratrol sintase (RS) em folhas dos cinco genótipos de *Arachis* após o tratamento com raios ultravioletas (UV) em relação ao controle. Todas as amostras tiveram um perfil de expressão positivamente regulado. Os valores correspondem as médias de expressão encontradas nos tempos de coleta 0, 7, 15 e 24hs pós indução por UV.

Além da expressão média, também foi possível obter as expressões em cada tempo de coleta após a indução. Foi observado que em todos os materiais que houve aumento da expressão de RS em relação ao controle (tabela 9). No geral, os níveis de expressão foram maiores nos menores tempos de coleta após a indução, seguidos de queda com o passar do tempo. A exceção foi o amendoim cultivado Runner 886, que teve nível máximo de expressão relativa de 2.182,24 vezes mais transcritos a 7hpi.

Tabela 10: Expressão relativa de Resveratrol sintase (RS) dos cinco genótipos avaliados em cada tempo de coleta sempre em relação às amostras controle.

Tempo de coleta	Expressão relativa de resveratrol sintase de amostras induzidas em relação ao controle				
	<i>A. hypogaea</i> Runner 886	Anfidiploide sintético K30076 X V14167	<i>A. ipaënsis</i> K 30076	<i>A. duranensis</i> V 14167	<i>A. stenosperma</i> V10309
0hpi*	1.146,38	497,97	2.894,64	3306,83	3.828,14
7hpi	2.182,24	35,33	745,59	514,22	453,59
15hpi	159,08	11,10	110,81	72,77	74,35
24hpi	51,24	14,43	375,51	42,10	136,54

*A sigla “hpi” indica “horas após indução”.

A expressão relativa de RS em Runner 886 é crescente de 0 a 7hpi, momento onde é atingido o máximo de transcritos (2.182,24). Nos tempos 15hpi e 24hpi ocorre o declínio da expressão do gene até chegar em 51,24 vezes mais expresso. Chung *et al.* (2003) observaram o acúmulo de mRNA de RS no amendoim cultivado em três diferentes tempos de coleta (0, 3, 12 hpi), sendo que a 12hpi (último tempo de coleta) foi observada uma maior concentração do transcrito. Tang *et al.* (2010) analisaram folhas de amendoim induzidas por UV e coletadas de 0 a 60hpi e o tempo de pico da expressão de RS também foi a 12hpi (Tabela 10). As causas das variações podem ser várias, como por exemplo, diferenças na intensidade da indução e tipo de material analisado e as diferentes cultivares avaliadas em cada estudo, pois já foi comprovado que existe variação entre a produção de resveratrol em diferentes cultivares de amendoim (Lopes *et al.*, 2013, Carvalho, 2013).

5.5.3 Relação entre a produção de resveratrol e nível de expressão de RS

Na figura 8 são apresentados os resultados de produção de resveratrol e os níveis de expressão relativa de RS em cada genótipo para os quatro tempos de coleta. Pode-se

observar que existe uma tendência geral de que a produção de resveratrol seja crescente, enquanto a expressão de RS é decrescente.

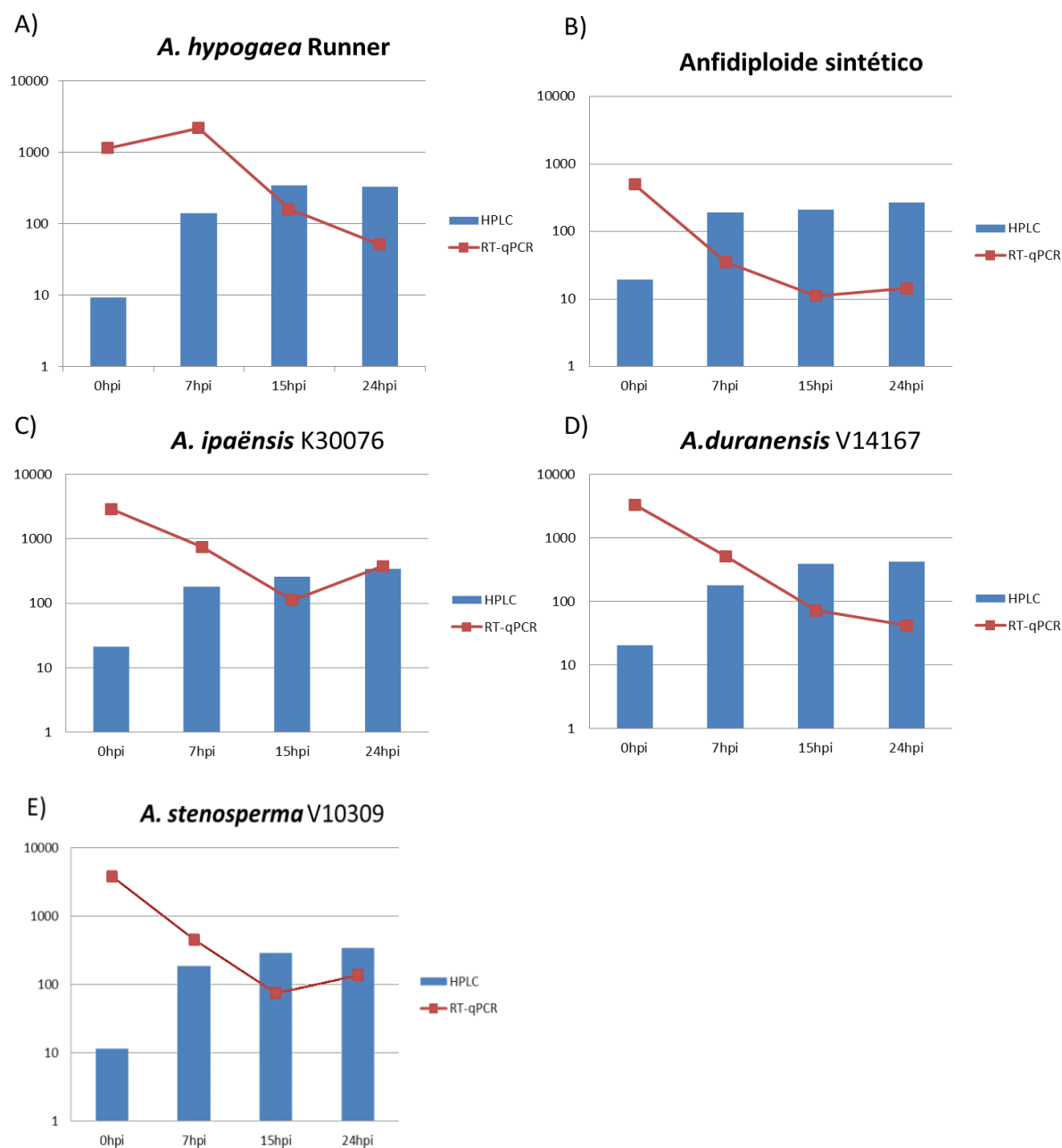


Figura 8: Concentração de resveratrol e expressão relativa de Resveratrol sintase em relação ao controle em diferentes tempos de coleta após indução por UV. A) Resultados referentes à *A. hypogaea* Runner. B) Resultados referentes ao anfidiplóide sintético (K30076 X V14167). C) Resultados referentes à *A. ipaënsis*. D) Resultados referentes à *A. duranensis*. E) Resultados referentes à *A. stenosporma*.

Quando avaliamos os diploides silvestres, observamos que estes apresentaram um comportamento similar tanto para produção de resveratrol (que foi crescente ao decorrer dos tempos de coleta) quanto para a síntese de Resveratrol sintase (que foi decrescente) até o tempo 15hpi (Figura 8). No tempo 24hpi as silvestres mantiveram no geral níveis similares de resveratrol aos encontrados em 15hpi, mas difeririam com relação à quantidade de transcritos de RS, que aumentaram em *A. ipaënsis* e *A. stenosperma* e diminuíram em *A. duranensis*.

Arachis ipaënsis e *A. stenosperma* apresentaram uma tendência inversamente proporcional entre os tempos 0 a 15hpi e entre 15 e 24hpi uma relação proporcional entre ambos, onde tanto os níveis de transcrito como o de produção de resveratrol crescem. Não existem dados sobre RS em *A. stenosperma*, mas *A. ipaënsis* já foi analisada por Carvalho (2013), que observou nessa espécie o maior valor de expressão gênica relativa e baixas concentrações de resveratrol (dados coletados em 15hpi) e sugeriu que esse fato poderia ter sido devido a uma resposta mais tardia ao estímulo com o UV e que por isso teores maiores provavelmente ocorreriam após 15h da indução. Os dados obtidos nesse estudo não demonstram uma resposta tardia em relação às outras espécies analisadas, uma vez que os níveis de RS no geral caem após a indução, mas confirmaram a hipótese do aumento na concentração de resveratrol após 15 horas. *Arachis ipaënsis* e *A. stenosperma* tiveram um aumento na concentração de RS após 15 horas da indução, que não foi refletida em aumento significativo no teor de resveratrol (Figuras 8 C e E) e não observado nas demais espécies. Considerando o padrão de expressão obtido, isto é, a maior concentração de transcritos no menor tempo após a indução e redução gradativa nos demais tempos em todas as amostras até 15hpi, os dados após 15hpi apontam que houve algum tipo de indução extra, que não estava programada. As fitoalexinas são reativas a estresses bióticos (Dorner *et al.*, 1998), como estresse hídrico, o que pode ter acontecido nessas amostras em função da metodologia utilizada.

Arachis duranensis apresentou valores de resveratrol crescente e de RS decrescente em todos os tempos analisados, ao contrario das demais espécies silvestres (Figura 8 D). Nos resultados de Carvalho (2013), *A. duranensis* revelou a 15hpi, único tempo de coleta feito no estudo, grande concentração de resveratrol, porém níveis medianos de transcritos de *resveratrol sintase*, em relação às outras amostras analisadas. Foi sugerido nesse trabalho em função dos resultados, que a resposta ao UV, refletida

na concentração de transcritos de RS tinha acontecido mais precocemente que nos outros materiais analisados e por isso a tendência em tempos de coletas posteriores seria a queda tanto da concentração de resveratrol quanto de RS. Os dados obtidos nesse trabalho demonstram que a RS realmente decresceu após 15 h, mas isso não foi refletido na concentração de resveratrol, que foi maior em 24h.

Os valores de produção de resveratrol em função dos níveis de expressão relativa de RS em Runner 886 (Figura 8A) foram semelhantes ao das espécies silvestres, com exceção no tempo 7hpi, no qual houve um aumento ao invés de redução na concentração de RS, como observado nos demais materiais. Chung *et al.* (2003) e Tang *et al.* (2010), quando compararam a produção de resveratrol e nível de transcrito, observam que os valores atingem máximo e mínimo de forma conjunta, com baixas concentrações de resveratrol e expressão de RS em 0hpi e picos de ambos em 15hpi. Esses autores apontam como causa do fato citado, o controle transcricional da expressão de RS. Os resultados desse estudo sugerem também um mecanismo transcricional, mas inverso ao observado pelos autores. Uma vez que resultados similares foram obtidos também nas espécies silvestres e no anfidiplóide, os dados indicam que a tendência entre resveratrol e RS em *Arachis* é relação inversa. Esse resultado tem um impacto importante no uso futuro da RS como um marcador na seleção de tempos de coleta em outras espécies do gênero. A diferença observada pode ser devida a menor sensibilidade da técnica de detecção de transcritos de RS utilizada em trabalhos prévios, nos quais foi utilizada uma sonda, que possui similaridade a um gene de resveratrol sintase de amendoim, apesar de saber que no amendoim existe uma família gênica (Lanz *et al.*, 1990) e que apesar de similares podem responder a estímulos diferentes e em diferentes estágio da vida da planta, como foi observado em uva (Vannozzi *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014)

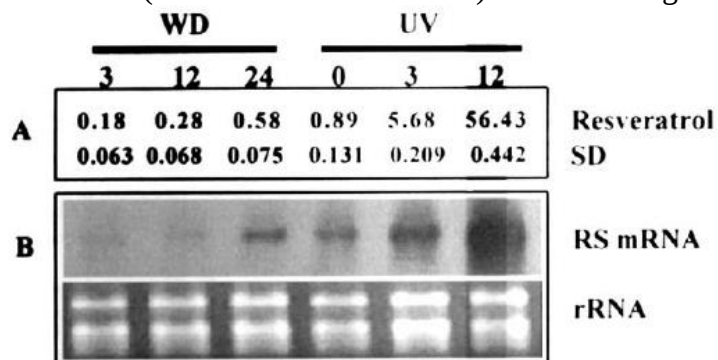
O anfidiplóide sintético (K30076 X V14167) também mostrou uma relação inversamente proporcional entre os valores de expressão e concentração de resveratrol (Figura 8 B), mas as concentrações de RS e resveratrol foram menores que as observadas nos demais materiais analisados. Carvalho (2013) ao relacionar níveis de transcritos de RS e concentração de resveratrol apenas em 15hpi observa que Runner 886 e o anfidiplóide sintético (K30076 X V14167) apresentam relações proporcionais semelhantes entre os dois valores analisados. No presente estudo, quando comparamos

os valores de Runner 886 e do anfidiploide sintético observamos que o comportamento desses genótipos não se assemelha tanto.

Os diferentes resultados encontrados em cada espécie e no anfidiploide para o mesmo tratamento e tempo de coleta podem ser em função de 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* (Veiga *et al.*, 2001) 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).

Os resultados do presente trabalho vão em contrapartida do demonstrado por Chung e colaboradores (2003) (Figura 9). Estes últimos têm como resultado que a produção de resveratrol (analisado por cromatografia) é crescente proporcionalmente com o número de transcritos. Os valores do presente estudo podem ser mais confiáveis tendo em vista que a tecnologia utilizada para avaliação de produção de transcritos no trabalho de 2003 foi por gel de agarose com uma visão subjetiva das concentrações de RS mRNA. A tecnologia de RT-qPCR aqui utilizada é muito mais sensível e gera valores reais e objetivos de quantificação

Figura 9: Acúmulo de resveratrol (A) e RS mRNA (B) em folhas de amendoim em resposta ao tratamento de duas horas com UV, avaliada 0, 3 e 12 horas após o tratamento (S. D.: *standard deviation*). Fonte: Chung *et al.*, 2003.



5.6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- A produção de resveratrol em folhas induzidas por UV e coletadas nos momentos logo após a indução, 7h, 15h e 24h foi crescente em *A. stenosperma*, *A. ipaënsis*, *A. duranensis*, *A. hypogaea* e no anfidiplóide sintético (K30076 X V14167);
- O gene da Resveratrol sintase atingiu seu máximo de expressão imediatamente após a indução por UV, havendo um decrescente na expressão relativa nos tempos 7, 15 e 24h após indução nos genótipos avaliados.
- O comportamento da expressão do gene Resveratrol sintase foi decrescente enquanto que a produção de resveratrol foi crescente, corroborando que RS está diretamente relacionado à biossíntese de resveratrol.

6.0. Conclusão Geral

Com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- Espécies de outras seções do gênero *Arachis* também são capazes de produzir resveratrol, tendo este metabólito um potencial como marcador químico desta espécie;
- *Arachis procumbentes* é espécie capaz de produzir a maior concentração de resveratrol (843,87µg/g) já descrita na literatura quando comparada até mesmo com outras espécies de outros gêneros;
- Existe variação entre parentais diploides e híbridos tetraploides originados a partir do cruzamento de espécies silvestres e cultivares de *Arachis*, de modo que o nível de ploidia pode interferir no potencial de maior produção de resveratrol;
- O comportamento da Resveratrol sintase (RS) e da produção de resveratrol, quando observados diferentes tempos de coleta após indução, é inversamente proporcional. Logo após a indução o nível de transcritos atinge seu ponto mais alto, seguido de queda até 24h pós indução. Em contrapartida a produção do metabólito resveratrol é crescente no período de 0h a 24h após a indução.

7.0. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdou, Y. A., Gregory, W. C., Cooper, W. E. (1974). Sources and nature of resistance to *Cercospora arachidicola* Hori and *Cercosporidium personatum* (Beck & Curtis) Deighton in *Arachis* species. *Peanut Science*, 1(1), 6-11.
- Achakzai, A. K. K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S. A., Tareen, R. B. (2009). Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pak. J. Bot*, 41(5), 2129-2135.
- Amaya, J., Young, C. T., Hammons, R. O. (1977). The tryptophan content of the US commercial and some South American wild genotypes of the genus *Arachis*, a survey. *Oleagineux (France)*, 32,225-229.
- Arora, M. K., Strange, R. N. (1991). Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. *Plant Science*, 78(2), 157-163.
- 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).
- Baudoin, M. J. (2009). Los centros de origen de plantas cultivadas y sus parientes silvestres-Bolivia y su patrimonio de recursos genéticos nativos. *Libro rojo de parientes silvestres de cultivos de Bolivia*, 8.
- 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., Valls F. M., Lopes, C. R., Gimenes, M. (2010). Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. *BMC Plant Biology*, 10(1), 255.
- Bertioli, D. J., Cannon, S. B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A. D., Cannon, E. K., ... & Ren, L. (2016). The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaënsis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature Genetics*, 48(4), 438-446.
- Bo, S., Ciccone, G., Castiglione, A., Gambino, R., De Michieli, F., Villosi, P., Durazzo, M.; Cavallo-Perin, P. Cassader, M. (2013). Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Current medicinal chemistry*, 20(10), 1323-1331.

- 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.
- 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.
- Burow, M. D., Simpson, C. E., Starr, J. L., Paterson, A. H. (2001). Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics*, 159(2), 823-837.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. (2009). The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4), 1-12.
- Caddeo, C., Nacher, A., Vassallo, A., Armentano, M. F., Pons, R., Fernández-Busquets, X., Carbone, C., Valenti, D., Fada, A. M., Manconi, M. (2016). Effect of quercetin and resveratrol co-incorporated in liposomes against inflammatory/oxidative response associated with skin cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1), 153-163.
- Campos-Mondragón, M. G., De La Barca, A. C., Durán-Prado, A., Campos-Reyes, L. C., Oliart-Ros, R. M., Ortega-García, J., Angulo, O. (2009). Nutritional composition of new peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. *Grasas y aceites*, 60(2), 161-167.
- Caruso, I., Dal Piaz, F., Malafronte, N., De Tommasi, N., Aversano, R., Zotte, C. W., Scarano, M. T., Carputo, D. (2013). Impact of ploidy change on secondary metabolites and photochemical efficiency in *Solanum bulbocastanum*. *Natural product communications*, 8(10), 1387-1392.
- Carvalho, P.A.S.V. (2013). Concentração de resveratrol e expressão de Resveratrol sintase em espécies de *Arachis*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 78p.
- Castro, C.M., Wagner, C.M., Valls, J.F.M., Karia, C.T. (2007). Morphological

- characters with potential use as varietal descriptors in *Arachis pinto*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7, 279-287.
- 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.
- Chen, R. S., Wu, P. L., Chiou, R. Y. Y. (2002). Peanut roots as a source of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1665-1667.
- Chopra, R., Burow, G., Simpson, C. E., Chagoya, J., Mudge, J., & Burow, M. D. (2016). Transcriptome Sequencing of Diverse Peanut (*Arachis*) Wild Species and the Cultivated Species Reveals a Wealth of Untapped Genetic Variability. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(12), 3825-3836.
- 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, 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.
- Church, G.T., Starr, J.L. Simpson, C.E. (2005). A recessive gene for resistance to *Meloidogyne arenaria* in interspecific *Arachis* spp. hybrids. *Journal of Nematology* 37,178-184.
- Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. (2006) Fundamentos de Cromatografia, Editora UNICAMP: Campinas.
- Conagin, C.H.T.M. 1959. Desenvolvimento dos frutos nas espécies selvagens de amendoim (*Arachis* spp.). *Bragantia* 18, 51-70.
- Cook, B. G., Williams, R. J., Wilson, G. P. M. (1990). Register of Australian herbage plant cultivars. B. Legumes. 21. *Arachis*.(a) *Arachis pinto* Krap. et Greg. nom. nud.(Pinto peanut) cv. Amarillo. *Australian journal of experimental agriculture*. 30, 445-446.

- Danon, A., Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 437(1-2), 131-136.
- 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.
- Douillet-Breuil, A. C., Jeandet, P., Adrian, M., Bessis, R. (1999). Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4456-4461.
- Esteban, M. A., Villanueva, M. J., Lissarrague, J. R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 409-420.
- Fávero, A.P. (2004). Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.165p.
- Fávero, A.P., Simpson, C.E., Valls, J.F.M., Vello, N. (2006). Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. *Crop Science* 46, 1546-1522.
- 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(1), 110-117.
- Fávero, A. P., Pádua, J. G., Costa, T. S., Gimenes, M. A., Godoy, I. J., Moretzsohn, M. C., Michelotto, M. D. (2015). New hybrids from peanut (*Arachis hypogaea* L.) and synthetic amphidiploid crosses show promise in increasing pest and disease tolerance. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 16694-16703.
- Fernández, A., Krapovickas, A. (1994). Cromosomas y evolucion." *Arachis* (Leguminosae)". *Bonplandia*, 187-220.
- Frankel, E. N., German, J. B., Kinsella, J. E., Parks, E., Kanner, J. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341(8843), 454-457.

- Fraser, S. P., Peters, A., Fleming-Jones, S., Mukhey, D., Djamgoz, M. B. A. (2014). Resveratrol: Inhibitory effects on metastatic cell behaviors and voltage-gated Na⁺ channel activity in rat prostate cancer in vitro. *Nutrition and cancer*, 66(6), 1047-1058.
- 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.
- Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8), 663-673.
- 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
- Garcia, G. M., Stalker, H. T., Kochert, G. (1995). Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. *Genome*, 38(1), 166-176.
- 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. N., Grosso, N. R., Guzmán, C. A. (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. M., Kochert, G. (2000). Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section Caulorrhizae, genus *Arachis* (Leguminosae). *Euphytica*, 116(3), 187-195
- Global Statistical Review International nut dried fruit. https://www.nutfruit.org/wp-content/uploads/2015/11/global-statistical-review-2014-2015_101779.pdf. Acessado em 12 de janeiro de 2017.
- Good, R. (1953). *Geography of the flowering plants*. Longmans, Green And Co.; London.
- 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.

- Gregory, M. P., Gregory, W. C. (1979). Exotic germ plasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. *Journal of Heredity*, 70(3), 185-193.
- Grosso, N. R., Nepote, V., Guzmán, C. A. (2000). Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 806-809.
- 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.
- Hasan, M. M., Cha, M., Bajpai, V. K., Baek, K. H. (2013). Production of a major stilbene phytoalexin, resveratrol in peanut (*Arachis hypogaea*) and peanut products: a mini review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(3), 209-221.
- 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.
- Huang, H., Chen, G., Liao, D., Zhu, Y., Pu, R., Xue, X. (2017). The effects of resveratrol intervention on risk markers of cardiovascular health in overweight and obese subjects: a pooled analysis of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*. 17(12), 1329-1340.
- Huang, L., Jiang, H., Ren, X., Chen, Y., Xiao, Y., Zhao, X., Tang, M., Huang, J., Upadhyaya, H. D., Liao, B. (2012). Abundant microsatellite diversity and oil content in wild *Arachis* species. *PloS one*, 7(11), e50002.
- Ingham, J. L. (1976). 3, 5, 4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, 15(11), 1791-1793.
- Isleib, T. G., Pattee, H. E., Giesbrecht, F. G. (2004). Oil, sugar, and starch characteristics in peanut breeding lines selected for low and high oil content and their combining ability. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(10), 3165-3168.

- Jeandet, P., Bessis, R., Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(1), 41-46.
- Johnson, D. R., Wynne, J. C., Campbell, W. V. (1977). Resistance of wild species of *Arachis* to the two spotted spider mite, *Tetranychus Urticae* 1, 2, 3. *Peanut Science*, 4(1), 9-11.
- Kartika, J. G., Reyes, M. R., Susila, A. D. (2016). Review of literature on perennial peanut (*Arachis pintoi*) as potential cover crop in the tropics. *Greensboro. Indonesia*. 391-399.
- Kerridge, P. C., Hardy, B. (1994) Biology and agronomy of forage *Arachis*. *CIAT*, 227.
- Kim, D. H., Kim, M. J., Sung, B., Kang, Y. J., Hwang, S. Y., Hwang, N. L., Kim, N. D. (2016). Novel resveratrol analogue, HS-1793, inhibits hypoxia-induced HIF-1 and VEGF expressions and inhibits tumor growth of human breast cancer cells in a nude mouse xenograft model. *Cancer research*, 74, 5261-5261.
- Kliebenstein, D. J., Rowe, H. C., Denby, K. J. (2005). Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal*, 44(1), 25-36.
- 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.
- Koppolu, R., Upadhyaya, H. D., Dwivedi, S. L., Hoisington, D. A., Varshney, R. K. (2010). Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by using SSR markers. *BMC plant biology*, 10(1), 15.
- Krapovickas, A., Gregory, W. C. (1994). Taxonomia del genero "*Arachis* (Leguminosae)". *Bonplandia*, 1-186.
- Kumari, V., Gowda, M. V. C., Tasiwal, V., Pandey, M. K., Bhat, R. S., Mallikarjuna, N., Upadhyaya, H. D., Varshney, R. K. (2014). Diversification of primary gene pool through introgression of resistance to foliar diseases from synthetic amphidiploids to cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Crop Journal*, 2(2), 110-119.
- Lamuela-Raventos, R. M., Romero-Perez, A. I., Waterhouse, A. L., De La Torre-Boronat, M. C. (1995). Direct HPLC analysis of cis-and trans-resveratrol and

- piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 281-283.
- 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.
- Lascano, C. E., Thomas, D. (1988). Forage quality and animal selection of *Arachis pintoi* in association with tropical grasses in the eastern plains of Colombia. *Grass and Forage Science*, 43(4), 433-439.
- Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D. J., Guimarães, P. M., Pereira, T. D., Galhardo, I., Silva, J. P., Brasileiro, A.C.M., Oliveira, R. S., Silva, P. I. T., Vadez, V. Araujo, A. C. G. (2012). The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environmental and Experimental Botany*, 84, 17-24.
- Leal-Bertioli, S. C., Moretzsohn, M. C., Santos, S. P., Brasileiro, A. C., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J., Araujo, A. C. G. (2017)B. Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. *American Journal of Botany*, 104(3), 379-388.
- Leal-Bertioli, S. C., Moretzsohn, M. C., Santos, S. P., Brasileiro, A. C., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J., & Araujo, A. C. G. (2017). Correction to “Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication”. *American Journal of Botany*, 104(5), 793-793.
- 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.
- Li, L., Hai, J., Li, Z., Zhang, Y., Peng, H., Li, K., Weng, X. (2014). Resveratrol modulates autophagy and NF-κB activity in a murine model for treating non-alcoholic fatty liver disease. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 166-173.
- 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.
- Liu, Z., Carpenter, S. B., Bourgeois, W. J., Yu, Y., Constantin, R. J., Falcon, M. J., Adams, J. C. (1998). Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. *Tree Physiology*, 18(4), 265-270.

- Lopes RM, Agostini-Costa Tda S, Gimenes MA, Silveira D (2011) Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (9):4321-4330.
- Lopes, R. M., Silveira, D., Gimenes, M. A., Vasconcelos, P. A. S., Rosa de Belem, N. A., Silva, J. P., da Silveira Agostini-Costa, T. (2013). Characterization of resveratrol content in ten wild species of section *Arachis*, genus *Arachis*. *Genetic resources and crop evolution*, 60(8), 2219-2226.
- LSPA-Levantamento Sistemático Produção Agrícola. Rio de Janeiro v.29 n.2 p.1-83, fevereiro de 2015.
- Lu, Q., Zhao, Q., Yu, Q. W., Feng, Y. Q. (2015). Use of pollen solid-phase extraction for the determination of trans-resveratrol in peanut oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(19), 4771-4776.
- 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.
- Mallikarjuna, N., Sastri, D.C. (2002). Morphological, cytological and disease resistance studies of the intersectional hybrid between *Arachis hypogaea* L. and *A. glabrata* Benth. *Euphytica*, v. 126, p. 161-167.
- Mallikarjuna, N., Kranthi, K. R., Jadhav, D. R., Kranthi, S., Chandra, S. (2004). Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, 128(5), 321-328.
- Mallikarjuna, N., Jadhav, D. R., Reddy, K., Husain, F., Das, K. (2012). Screening new *Arachis* amphidiploids, and autotetraploids for resistance to late leaf spot by detached leaf technique. *European journal of plant pathology*, 132(1), 17-21.
- Mattivi, F., Nicolini, G. (1993). Influenza della tecnica di vinificazione sul contenuto di resveratrolo dei vini. *L'Enotechnico*, 29, 81-88.
- McNeely, J. A., Miller, K. R., Reid, W. V., Mittermeier, R. A., & Werner, T. B. (1990). *Conserving the world's biological diversity*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.

- Menezes, H. (2009). Innate and specific immunity in plants. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, 195 (30).
- Meng, C., Liu, J. L., Du, A. L. (2014). Cardioprotective effect of resveratrol on atherogenic diet-fed rats. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(11), 7899.
- Michelotto, M. D., Barioni Jr, W., de Resende, M. D. V., de Godoy, I. J., Leonardecz, E., Fávero, A. P. (2015). Identification of fungus resistant wild accessions and interspecific hybrids of the genus *Arachis*. *PloS one*, 10(6), e0128811.
- Michelotto, M. D., de Godoy, I. J., dos Santos, J. F., Martins, A. L. M., Leonardecz, E., Fávero, A. P. (2016). Identifying Amphidiploids Resistant to Foliar Fungal Diseases. *Crop Science*, 56(4), 1792-1798.
- Michelotto, M. D., de Godoy, I. J., Pirotta, M. Z., dos Santos, J. F., Finoto, E. L., Fávero, A. P. (2017). Resistance to thrips (*Enneothrips flavens*) in wild and amphidiploid *Arachis* species. *PloS one*, 12(5), e0176811.
- Mikami, S., Ota, I., Masui, T., Itaya-Hironaka, A., Shobatake, R., Okamoto, H., Takasawa, S., Kitahara, T. (2016). Effect of resveratrol on cancer progression through the REG III expression pathway in head and neck cancer cells. *International Journal of Oncology*, 49(4), 1553-1560.
- 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.
- Moda-Cirino, Vania. O uso de Recursos Fitogenéticos no Melhoramento Genético Vegetal. In: Renato Ferraz de Arruda Veiga e Manoel Abilio de Queiróz. (Org.). Recursos Fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil. 1ed. Viçosa - MG: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2015, v. 1, p. 331-335.
- Moraes, A. R. A. D., Lourenção, A. L., Godoy, I. J. D., Teixeira, G. D. C. (2005). Infestation by *Enneothrips flavens* Moulton and yield of peanut cultivars. *Scientia Agricola*, 62(5), 469-472.
- Moretzsohn, M. C., Leoi, L., Proite, K., Guimaraes, P. M., Leal-Bertioli, S. C. M., Gimenes, M. A., ... & Bertioli, D. J. (2005). A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 111(6), 1060-1071.

- Moretzsohn, M. C., Gouvea, E. G., Inglis, P. W., Leal-Bertioli, S., Valls, J. F., Bertioli, D. J. (2013). A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. *Annals of Botany*, 111(1), 113-126.
- 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.
- 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(1-2), 43-57.
- Nguepjob, J. R., Foncéka, D., Tossim, H. A., Sané, D., & Rami, J. F. (2015). Toward the enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) tolerance to drought using beneficial alleles from the wild species. 130.
- Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T., Rath, M. (2016). Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients*, 8(9), 552.
- Orsu, P., Murthy, B. V. S. N., Akula, A. (2013). Cerebroprotective potential of resveratrol through anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms in rats. *Journal of Neural Transmission*, 120(8), 1217-1223.
- Ortiz, A. M., Robledo, G., Seijo, G., Valls, J. F. M., & Lavia, G. I. (2017). Cytogenetic evidences on the evolutionary relationships between the tetraploids of the section Rhizomatosae and related diploid species (*Arachis*, Leguminosae). *Journal of Plant Research*, 1-17.
- Palmieri, D. A., Bechara, M. D., Curi, R. A., Gimenes, M. A., Lopes, C. R. (2005). Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae* (*Arachis*, Fabaceae). *Molecular Ecology Resources*, 5(1), 77-79.
- 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.
- Pattee, H. E., Stalker, H. T., Giesbrecht, F. G. (1998). Reproductive Efficiency in Reciprocal Crosses of *Arachis monticola* with *A. hypogaea* Subspecies 1. *Peanut Science*, 25(1), 7-12.
- Paula, Ailton Ferreira de. (2015). Caracterização morfológica, molecular e reprodutiva de híbridos interespecíficos de *Arachis* na busca de resistência a

pragas do amendoim." Dissertação de mestrado, Universidade Federal De São Carlos. 99p.

Pellegrini, D. Terra vermelha. São Paulo, *Moderna*, 1998.

Peanut butter for the hungry, 2013. Disponível em: www.peanutbutterforthehungry.org. Acesso em: 14 de setembro de 2015.

Peñaloza, A.P.S., Valls, J. F. M. (2005). Chromosome number and satellite chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 14,65-72.

Penalva, R., Esparza, I., Larraneta, E., González-Navarro, C. J., Gamazo, C., Irache, J. M. (2015). Zein-based nanoparticles improve the oral bioavailability of resveratrol and its anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxic shock. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(23), 5603-5611.

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 Research* , 30 (9), p. 10.

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.

Ramos, V.R. (2007). Caracterização da resistência às cercosporioses, lagarta do cartucho e lagarta da soja em espécies silvestres do gênero *Arachis*, para uso no melhoramento genético do amendoim. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 85p.

Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4713-4719.

Raman, V. S. (1958). Studies in the genus *Arachis*. IV. Hybrid between *A. hypogaea* and *A. monticola*. *Indian Oilseeds J*, 1, 20-23.

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. *Norvatis Foundation Symposium*. 216, 208-217.

- Robledo, G., Seijo, G. (2010). Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of DNAr loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics* 121, 1033-1046.
- Rudolf, J. R., Resurreccion, A. V. (2005). Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 10186-10192.
- 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.
- Santos, R.C, Freire, R. M. M; Lima, L. M. (2013). O Agronegócio do Amendoim no Brasil. *Embrapa*, 2., 585.
- Santos, S. P. D. (2013). Produção e caracterização de alotetraploides sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis*. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 89p.
- Savage, G. P., Keenan, J. I. (1994). The composition and nutritive value of groundnut kernels. In *The Groundnut Crop*, Springer Netherlands, 173-213.
- Schöppner, A., Kindl, H. E. L. M. A. N. T. (1984). Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *Journal of Biological Chemistry*, 259(11), 6806-6811.
- 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.
- Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernandez, A., Krapovickas, A., Ducasse, D. A., Bertioli, 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., Robledo, G., Ortíz, A., & Lavia, G. I. (2014). Classical and Molecular Cytogenetics in *Arachis*. *Genetics, Genomics and Breeding of Peanuts*, 37.
- Sharma, S. B., Ansari, M. A., Varaprasad, K. S., Singh, A. K., Reddy, L. J. (1999). Resistance to *Meloidogyne javanica* in wild *Arachis species*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46(6), 557-568.

- Sharma, S., Upadhyaya, H. D., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L. (2013). Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Frontiers in plant science*, 4, 309.
- Shi, J., He, M., Cao, J., Wang, H., Ding, J., Jiao, Y., Li, R., He, J., Wang, D., Wang, Y. (2014). The comparative analysis of the potential relationship between resveratrol and stilbene synthase gene family in the development stages of grapes (*Vitis quinquangularis* and *Vitis vinifera*). *Plant Physiology and biochemistry*, 74, 24-32.
- Siemann, E. H., Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), 49-52.
- Silvestri, M. C., Ortiz, A. M., Lavia, G. I. (2015). rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x= 9 species' of section *Arachis* (*Arachis*, Leguminosae). *Plant systematics and evolution*, 301(2), 555-562.
- Simpson, C. E. (1991). Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. *Peanut Science*, 18, 22-26.
- Simpson, C. E. Starr, J. L. (2001). Registration of 'COAN' peanut. *Crop Science*, 41, 918.
- Simpson, C.E. (2001). Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea*. *Peanut Science*, 28(2), 114-116.
- Singh, H. B., Arora, R. K., & Hardas, M. W. (1975). Untapped plant resources. In *Proc Indian Nat Sci Acad B*, 41, 194-203.
- Singh, A. K., Stalker, H. T., Moss, J. P. (1991). Cytogenetics and use of alien genetic variation in groundnut improvement. *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution. Part B*, 65-76.
- Singh, S. K., Banerjee, S., Lillard, J. W., Singh, R. (2016). Molecular mechanism of resveratrol induced cell death in multidrug resistance prostate cancer. *Cancer research*, 76 (14), 5043.
- Smartt, J., Gregory, W. C., Gregory, M. P. (1978). The genomes of *Arachis hypogaea*. 1. Cytogenetic studies of putative genome donors. *Euphytica*, 27(3), 665-675.
- Smith, B.W. (1950). *Arachis hypogaea*. Aerial flower and subterranean fruit. *American Journal of Botany* 37,802-815.
- 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., and Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30, 91–113.
- Stalker, H. T. (1984). Utilizing *Arachis cardenasii* as a source of *Cercospora* leafspot resistance for peanut improvement. *Euphytica*, 33, 529-538,
- Stalker, H. T., Simpson, C. E. (1995). Germplasm resources in *Arachis*. *Advances in peanut science*, 14-53.
- Stalker, H.T. (1991). A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. *American Journal of Botany* 78,630-637.
- Stalker, H.T., Moss, J.P. (1987). Speciation, cytogenetics and utilization of *Arachis* species. *Advances in Agronomy* 41, 1-40.
- 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
- 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. *Theoretical and Applied Genetics*. 111, 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.
- Thakur, R. P., Rao, V. P., Reddy, S. V., Ferguson, M. (2000). Evaluation of Wild *Arachis* Germplasm Accessions for In Vitro Seed Colonization and Anatoxin Production by *Aspergillus flavus*. *International Arachis Newsletter*, 20, 44-46.
- Tsukaya, H., Sawada, Y., Oikawa, A., Shiratake, K., Isuzugawa, K., Saito, K., Hirai, M. Y. (2015). Intraspecific comparative analyses of metabolites between diploid and tetraploid *Arabidopsis thaliana* and *Pyrus communis*. *New Negatives in Plant Science*, 1, 53-61.
- Valls, J. F. M., Simpson, C. E. (1994). Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. *Biology and agronomy of forage Arachis*, 1-18.
- Valls, J. F. M., Simpson, C.E. (2005). New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia* 14, 35-63.

- Valls, J. F. M. S. H. Santana. (2011). *Arachis triseminata* (Fabaceae), Recurso Genético Forrageiro Negligenciado da Bacia do Rio São Francisco. In: Simpósio da RGV Bahia, 4, 2011, Juazeiro. Resumo. Brasília.
- Valls, F. M. (2013) Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In: O agronegócio do amendoim no Brasil. 2 ed. Embrapa, v.2, p.47-63.
- Valls, J. F. M. (2013). *Arachis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29485>). Acesso em: 21 set 2014.
- Valls, J.F.M., Costa, L.C., Custodio, A.R. 2013. A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trierectoides*. *Bonplandia* 22(1):91-97.
- 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.
- Varman, P. V., Ganesan, K.N., Mothilal, A. (2000). Wild germplasm: potential source for resistance breeding in groundnut. *Journal of Ecobiology*, 12 (3), 223-228.
- Veiga, R. F. D. A., Queiroz-Voltan, R. B., Valls, J. F. M., Favero, A. P., & Barbosa, W. (2001). Caracterização morfológica de acessos de germoplasma de quatro espécies brasileiras de amendoim-silvestre. *Bragantia*, 60(3), 167-176.
- Veiga, Renato & Abílio de Queiróz, Manoel. (2015). Recursos Fitogenéticos: A base da agricultura sustentável no Brasil.
- Wang, M. L., Pittman, R. N. (2009). Resveratrol content in seeds of peanut germplasm quantified by HPLC. *Plant Genetic Resources*, 7(01), 80-83.
- Wang, S. Y., Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4977-4982.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Xu, C. G., Tang, T. X., Chen, R., Liang, C. H., Liu, X. Y., Wu, C. L., Wu, H. (2014). A comparative study of bioactive secondary metabolite production in diploid and tetraploid *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 116(3), 323-332.

- 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.
- Yang, Q., Wang, H. C., Liu, Y., Gao, C., Sun, L., Tao, L. (2016). Resveratrol Cardioprotection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Involves Upregulation of Adiponectin Levels and Multimerization in Type 2 Diabetic Mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 68(4), 304-312.
- 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., Felicio, 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.
- Zukovskij, P. (1970). The world gene pool of plants for breeding. Megagene centres and endemic microgene centres. *The world gene pool of plants for breeding. Megagene centres and endemic microgene centres*.

8.0 ANEXOS

8.1. ANEXO I

Tabela 11: Teores de resveratrol de folhas de espécies de cinco seções do gênero *Arachis* induzidas por radiação ultravioleta (UV) por 2:30hs e controle.

Seção	Espécie	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
			µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
<i>Arachis</i>	<i>A. praecox</i> V14682	UV	499,23	531,14	594,15	605,07	531,21	565,53	567,25
			537,16		618,69		568,36		
			557,03		602,36		97,02		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. krapovikashii</i> W1291	UV	449,27	444,90	405,43	405,72	362,42	439,18	429,94
			430,67		380,06		464,86		
			454,77		431,68		490,26		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. magna</i> V14724	UV	200,38	171,10	165,37	198,74	209,39	185,12	184,99
			155,8		192,28		200,99		
			157,12		238,58		144,99		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. magna</i> V13765	UV	160,94	195,74	178,36	178,36	165,28	156,04	176,72
			198,82		199,75		171,72		
			227,47		156,98		131,12		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. magna</i> V14727	UV	282,63	257,68	306,8039	298,20	363,31	343,02	299,63
			201,6		298,27		296,98		
			288,82		289,53		368,77		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. magna</i> V14750	UV	270,97	277,00	339,59	364,85	246,59	273,42	305,09
			268,74		367,41		300,25		
			291,28		387,54		273,42		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		

Tabela 11 (continuação): Teores de resveratrol de folhas de espécies de cinco seções do gênero *Arachis* induzidas por radiação ultravioleta (UV) por 2:30hs e controle.

Seção	Espécie	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
			µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
<i>Arachis</i>	<i>A. hoehnei</i> V9094	UV	51,4	49,20	91,07	91,59	67,40	63,69	68,16
			40,85		103,67		70,34		
			55,36		80,02		53,32		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. hoehnei</i> V9140	UV	90,35	95,64	152,91	141,45	70,06	88,44	108,51
			88,8		165,12		105,01		
			107,77		106,31		90,25		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. glandulífera</i> V033774	UV	448	437,11	591,39	557,65	623,21	580,78	525,18
			467		544,01		578,28		
			397		537,56		540,85		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. palustris</i> V14156	UV	447,04	465,29	713,07	752,46	596,78	626,85	614,87
			495,13		743,66		676,16		
			453,71		800,66		607,62		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. hypogaea</i> CV Caiapó	UV	219,32	215,33	273,37	255,68	316,88	348,55	273,19
			211,58		221,81		362,49		
			215,08		271,86		366,28		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. hypogaea</i> CV Runner IAC 886	UV	231,72	234,22	402,29	497,41	527,22	560,43	430,69
			241,68		557,21		552,19		
			229,27		532,74		601,89		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
	<i>A. monticola</i> V14165	UV	90,91	83,27	58,82	60,037	67,493	57,77	67,02
			75,7		58,07		53,6187		
			83,18		63,22		52,1843		
		Controle	traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		
			traços		Traços		traços		

Tabela 11 (continuação): Teores de resveratrol de folhas de espécies de cinco seções do gênero *Arachis* induzidas por radiação ultravioleta (UV) por 2:30hs e controle.

Seção	Espécie	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
			µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
<i>Caulorrhizae</i>	<i>A. pintoii</i> GK12787	UV	211,55	223,51	351,44	391,27	334,71	291,37	302,05
			200,06		427,48		282,11		
			258,91		394,9		257,3		
		Controle	traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		
<i>Extranervosae</i>	<i>A. villosulicarpa</i> V8816	UV	180,61	193,26	262,5	272,01	247,05	259,32	241,53
			162,55		276,65		276,56		
			236,62		276,89		254,34		
		Controle	traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		
<i>Triseminatae</i>	<i>A. triseminata</i> GK 12881	UV	669,6	651,22	802,21	793,21	802,49	791,83	745,42
			650,24		770,74		760,66		
			633,82		806,68		812,33		
		Controle	traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		
<i>Procumbentes</i>	<i>A. lignosa</i> V13570	UV	761,02	708,74	1008,44	1002,59	825,95	820,28	843,87
			744,55		1012,28		910,94		
			620,24		987,05		723,96		
		Controle	traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		
			traços		traços		traços		

8.2. Anexo 2

Tabela 12: Concentração de resveratrol em µg/g de folhas induzidas por UV e controle de anfidiplóides sintéticos, espécies silvestres de *Arachis* utilizadas como parentais e híbridos resultantes dos cruzamentos entre alotetraplóides e cultivares de *A. hypogaea*.

Espécie/ híbrido	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
		µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
A. stenosperma V10309	UV	34,76	36,24	33,22	44,84	36,76	36,77	39,28
		36,01		60,42		42,52		
		37,95		40,88		31,03		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
A. villosa V12812	UV	69,45	66,89	63,28	65,25	59,92	64,08	65,41
		62,55		70,26		65,32		
		68,67		62,21		66,99		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
A. ipaënsis K30076	UV	101,70	97,35	92,36	89,45	88,33	92,52	93,1
		98,00		87,00		91,92		
		92,34		89,00		97,30		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
A. batizocoi K9484	UV	152,78	193,12	176,69	170,11	209,22	231,59	198,28
		228,30		170,43		286,15		
		198,29		163,21		199,41		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
A. gregoryi V6389	UV	413,79	386,20	438,45	399,42	410,05	392,79	392,81
		369,92		399,34		375,6		
		374,89		360,48		392,73		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
A. duranensis	UV	467,21	436,58	404,13	443,80	450,02	436,15	438,84

V14167		426,95		493,72		423,85		
		415,59		433,54		434,57		
		traços		traços		traços		
Controle		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
Espécie/ híbrido	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
		µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
<i>A. ipaënsis</i> K30076 X <i>A. villosa</i> V12812	UV	58,17	103,51	143,88	97,01	67,5	66,05	88,86
		68,90		75,54		45,57		
		183,47		71,6		85,08		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>A. gregoryi</i> V6389 X <i>A. stenosperma</i> V10309	UV	253,05	265,31	302,91	275,14	232,74	244,43	261,62
		241,93		260,26		252,88		
		300,94		262,24		247,66		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. stenosperma</i> V10309	UV	287,30		188,64		169,22		290,04
		248,74		374,02		397,39		
		325,72		235,04		384,29		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. duranensis</i> SV2848	UV	513,58	501,40	493,02	499,35	522,83	539,08	513,28
		503,60		498,88		538,74		
		487,03		506,14		555,67		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. duranensis</i> V14167	UV	629,64	632,89	633,94	614,92	618,24	633,12	626,98
		628,86		624,97		658,25		
		640,18		585,84		622,87		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		

		traços		traços		traços		
<i>A. hypogaea</i> CV IAC Caiapó	UV	549,68	562,44	572,74	569,02	547,02	544,02	558,49
		562,35		578,93		555,74		
		575,29		555,39		529,31		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
Espécie/ híbrido	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
		µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
<i>A. hypogaea</i> CV Runner IAC 886	UV	170,57	271,69	288	302,8	129,6	251,17	275,22
		245,54		331,02		373,31		
		398,95		289,38		250,61		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>A. hypogaea</i> CV 505	UV	258,30	255,59	275,71	267,47	215,04	216,6	246,55
		227,79		267,38		214,92		
		280,68		259,33		219,84		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
Runner X [Runner X (<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. stenosperma</i> V10309)]	UV	326,24	345,86	377,38	387,41	299,08	321,88	351,72
		344,49		408,77		329,31		
		366,86		376,08		337,26		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
IAC Caiapó X [IAC Caiapó X (<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. stenosperma</i> V10309)]	UV	799,86	833,21	651,43	756,73	595,01	638,89	742,95
		821,65		755,39		673,55		
		878,13		863,37		648,12		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
CV 505 X [(<i>A. gregoryi</i> V6389 X <i>A. stenosperma</i> V10309)]	UV	434,57	516,72	602,91	509,43	591,31	554,33	526,83
		651,79		382,51		474,1		

Tabela 12 (continuação): Concentração de resveratrol em µg/g de folhas induzidas por UV e controle de anfidiplóides sintéticos, espécies silvestres de *Arachis* utilizadas como parentais e híbridos resultantes dos cruzamentos entre alotetraplóides e cultivares de *A. hypogaea*.

Espécie/ híbrido	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
		µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
<i>A. ipaënsis</i> K30076 X <i>A. villosa</i> V12812	UV	58,17	103,51	143,88	97,01	67,5	66,05	88,86
		68,90		75,54		45,57		
		183,47		71,6		85,08		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>(A. gregoryi</i> V6389 X <i>A.</i> <i>stenosperma</i> V10309) ^{4X}	UV	253,05	265,31	302,91	275,14	232,74	244,43	261,62
		241,93		260,26		252,88		
		300,94		262,24		247,66		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>(A. batizocoi</i> K9484 X <i>A.</i> <i>stenosperma</i> V10309) ^{4X}	UV	287,30		188,64		169,22		290,04
		248,74		374,02		397,39		
		325,72		235,04		384,29		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>(A. batizocoi</i> K9484 X <i>A.</i> <i>duranensis</i> SV2848) ^{4X}	UV	513,58	501,40	493,02	499,35	522,83	539,08	513,28
		503,60		498,88		538,74		
		487,03		506,14		555,67		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>(A. batizocoi</i> K9484 X <i>A.</i> <i>duranensis</i> V14167) ^{4X}	UV	629,64	632,89	633,94	614,92	618,24	633,12	626,98
		628,86		624,97		658,25		
		640,18		585,84		622,87		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>A. hypogaea</i>	UV	549,68	562,44	572,74	569,02	547,02	544,02	558,49

CV IAC Caiapó		562,35	578,93	555,74
		575,29	555,39	529,31
		traços	traços	traços
	Controle	traços	traços	traços
		traços	traços	traços

Tabela 12 (continuação): Concentração de resveratrol em µg/g de folhas induzidas por UV e controle de anfidiploides sintéticos, espécies silvestres de *Arachis* utilizadas como parentais e híbridos resultantes dos cruzamentos entre alotetraploides e cultivares de *A. hypogaea*.

Espécie/ híbrido	Tratam.	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
		µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
<i>A. hypogaea</i> CV Runner IAC 886	UV	170,57	271,69	288	302,8	129,6	251,17	275,22
		245,54		331,02		373,31		
		398,95		289,38		250,61		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
<i>A. hypogaea</i> CV 505	UV	258,30	255,59	275,71	267,47	215,04	216,6	246,55
		227,79		267,38		214,92		
		280,68		259,33		219,84		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
Runner X [Runner X (<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. stenosperma</i> V10309)]	UV	326,24	345,86	377,38	387,41	299,08	321,88	351,72
		344,49		408,77		329,31		
		366,86		376,08		337,26		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
IAC Caiapó X [IAC Caiapó X (<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. stenosperma</i> V10309)]	UV	799,86	833,21	651,43	756,73	595,01	638,89	742,95
		821,65		755,39		673,55		
		878,13		863,37		648,12		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
CV 505 X [(<i>A. gregoryi</i> V6389 X <i>A. stenosperma</i> V10309)]	UV	434,57	516,72	602,91	509,43	591,31	554,33	526,83
		651,79		382,51		474,1		
		463,81		542,87		597,59		
	Controle	traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		

8.3. Anexo 3

Tabela 13: Concentração de resveratrol em µg/g de folhas de cinco genótipos de *Arachis* controle e induzidas por UV coletadas em quatro tempos após indução.

Genótipo	Tempo de coleta	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
		µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
Anfidiploide sintético (K30076 X V14167)	Controle	traços		traços		traços		—
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
	0hpi	15,540	18,173	23,120	20,727	17,160	19,137	19,346
		16,330		16,570		21,340		
		22,650		22,490		18,910		
	7hpi	242,540	230,273	160,376	182,138	189,860	168,791	193,734
		239,060		178,800		183,470		
		209,220		207,237		133,043		
	15hpi	224,660	219,847	214,240	205,277	232,600	215,840	213,655
		200,390		199,540		247,870		
		234,491		202,050		167,050		
	24hpi	292,020	307,803	239,470	265,779	188,350	229,467	267,683
		333,010		270,200		268,600		
		298,380		287,667		231,450		
A. duranensis V14167	Controle	traços		traços		traços		—
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
	0hpi	19,360	18,600	17,800	19,463	17,910	22,854	20,306
		15,250		22,030		27,420		
		21,190		18,560		23,232		
	7hpi	198,630	186,580	177,340	182,703	150,690	177,093	182,126
		160,800		211,220		175,250		
		200,310		159,550		205,340		
	15hpi	324,420	357,833	389,780	435,250	368,858	396,009	396,364
		362,340		422,070		406,500		
		386,740		493,900		412,670		
	24hpi	442,380	409,207	457,290	411,917	425,610	436,120	419,081
		412,370		408,510		408,390		

<i>A. ipaënsis</i> <i>K30076</i>	Controle	372,870		369,950		474,360		—
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
	0hpi	26,110	22,457	26,680	22,297	16,400	18,690	21,148
		22,930		25,000		22,260		
		18,330		15,210		17,410		
	7hpi	229,310	198,473	149,540	167,137	176,470	172,960	179,523
		194,300		192,920		149,740		
		171,810		158,950		192,670		

Tabela 13 (continuação): Concentração de resveratrol em µg/g de folhas de cinco genótipos de *Arachis* controle e induzidas por UV coletadas em quatro tempos após indução.

Genótipo	Tempo de coleta	Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Média dos blocos
		µg/g	média	µg/g	média	µg/g	média	
A. ipaënsis K30076	15hpi	301,040	288,480	192,490	246,160	195,520	231,137	255,259
		275,280		250,580		230,010		
		289,120		295,410		267,880		
	24hpi	323,660	356,363	337,860	385,633	267,450	282,867	341,621
		355,150		389,120		304,930		
		390,280		429,920		276,220		
A. hypogaea CV Runner IAC 886	Controle	traços		traços		traços		—
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
	0hpi	7,480	7,197	11,230	11,730	10,650	8,997	9,308
		6,170		11,280		8,080		
		7,940		12,680		8,260		
	7hpi	174,220	138,582	157,144	155,819	132,290	124,173	139,525
		117,460		175,643		126,560		
		124,066		134,670		113,670		
	15hpi	399,120	369,877	351,409	330,960	304,660	338,185	346,341
		353,510		310,131		369,705		
		357,001		331,340		340,190		
	24hpi	319,170	350,850	287,960	301,876	369,960	323,400	325,375
		377,350		294,797		271,800		
		356,030		322,870		328,440		
A. stenosperma V10309	Controle	traços		traços		traços		—
		traços		traços		traços		
		traços		traços		traços		
	0hpi	13,720	11,197	12,660	12,270	10,890	11,157	11,541
		9,990		8,210		8,990		
		9,880		15,940		13,590		
	7hpi	156,234	182,161	167,480	186,953	192,666	194,469	187,861
		220,210		203,909		202,710		
		170,040		189,470		188,030		

15hpi	227,209	301,588	288,122	254,904	321,890	307,123	287,872
	330,916		277,650		288,710		
	346,640		198,940		310,770		
24hpi	296,360	319,364	354,670	374,457	309,996	328,775	340,865
	325,691		403,020		358,310		
	336,040		365,680		318,020		